



Bases genéticas y celulares de neuropatías periféricas hereditarias

Eduardo L. Calpena Corpas

TESIS DOCTORAL

2015

Programa de doctorado en Biotecnología

Directores:

Dra. Carmen Espinós Armero

Prof. Dr. Francesc Palau Martínez

Dña. Carmen Espinós Armero, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Miguel Servet e Investigadora Jefe en el Programa de Enfermedades Raras y Genéticas del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF), y

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Profesor Visitante de Pediatría, Universitat de Barcelona, Jefe del Servicio de Medicina Genética y Molecular del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (HSJD), Director del Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER) del HSJD y Director Científico del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER),

CERTIFICAN:

Que D. Eduardo L. Calpena Corpas, licenciado en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Bases genéticas y celulares de neuropatías periféricas hereditarias”.

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 14 de diciembre de 2015

Dra. Carmen Espinós Armero

Prof. Dr. Francesc Palau Martínez

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, el autor ha disfrutado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF) de una beca predoctoral FPU (Ref. AP2009-0642) concedida por el Ministerio de Educación y de un contrato asociado a proyecto de investigación (Ref. ISCIII-IRDiRC 2011) financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) en el CIBER de Enfermedades Raras.

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Bases genéticas y fisiopatología celular de las neuropatías periféricas hereditarias” (Ref. PS09/00095) e “Investigación traslacional y mecanismos de enfermedad en neuropatías periféricas hereditarias” (Ref. PI12/00453), concedidos por el Instituto de Salud Carlos III; “Identificación de genes responsables de enfermedades raras mediante secuenciación masiva: el modelo de una neuropatía recurrente hereditaria” (Ref. AP-207/11), concedido por la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana; “TREAT-CMT: Translational Research, Experimental Medicine and Therapeutics on Charcot-Marie-Tooth disease” (Ref. ISCIII-IRDiRC 2011), concedido por el Instituto de Salud Carlos III, International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC).

Agradecimientos

A pesar de que ha sido duro, a día de hoy me siento un privilegiado por todo lo que he aprendido en estos años. He aprendido mucho, muchísimo. Aunque he de reconocer que aquellas lecciones que mejor me sé son aquéllas que he aprendido a base de golpes, tras equivocarme o tras encontrarme con un muro de desconocimiento. No hay mejor enseñanza que la que viene dada por los errores que comete uno mismo. Así que mi primer agradecimiento es a los errores que he ido cometiendo y que me han permitido aprender y mejorar.

Tengo mucho, muchísimo que agradecer y a muchas, muchísimas personas que me han ayudado y acompañado de una manera u otra a lo largo de la tesis; espero no olvidarme de nadie, pero si es así, no me lo tengáis en cuenta. Comienzo dando las gracias a mis codirectores Carmina y Paco, por haberme permitido estar en vuestros laboratorios y por haberme apoyado. Carmina, he sentido tu apoyo desde el primer momento en que llegué, y esa confianza me ha permitido trabajar con mucha libertad. Siempre has tenido las puertas abiertas para cualquier cosa que he necesitado, y siempre has dado rienda suelta a mis ganas de investigar y a mi "hambre" científico; muchas gracias por todo, incluso por soportar mi cabezonería. Paco, muchas gracias por tu confianza y por todas tus enseñanzas en las reuniones de laboratorio. Siempre tenías críticas constructivas que nos hacían mejorar en nuestras presentaciones e investigaciones, y nos obligabas a mirar más allá. Ha sido un privilegio tener como codirectores investigadores tan destacables como vosotros, y sinceramente, espero que estéis orgullosos del trabajo que he realizado durante estos años.

A Ibo, gracias por todo el tiempo que me has dedicado. Siempre has hecho un hueco para tratar de resolver mis dudas y hasta mis paranoias filogenéticas... ¡en menudo bosque de árboles nos metimos! Gracias por introducirme en el mundo de la mosca y por dejarme siempre un hueco en vuestro lado del laboratorio. A Pili, gracias por todos sus consejos tanto científicos como personales, gracias por estar siempre disponible y por nuestros "intentos de conversaciones" en inglés. A TODOS mis compañeros de laboratorio, desde mis primeros años en el laboratorio de Genética y Medicina Molecular en el IBV, hasta los últimos instantes en el CIPF en los que estábamos repartidos por los laboratorios I53/I54/I55/I56. Muchas gracias a Arantxa (a ti te dejo para luego), Amalia, Lola, Paula, Vincenzo, Belén, David, Anna Estela, Manoli, Diana, Fátima, Víctor, Estela, María, Ana Pilar, Estrella, Azahara, Susana, Franzi, Stijn, Esther, Marta, Mireia, Benito, Janet, María Elena, Álvaro, Paula S., Cristina, Ana S.,...

Mención especial a algunos de los veteranos, porque de ellos pude aprender un poquito más. A Amalia, por todas las horas que compartimos en el laboratorio, los días que se nos hacían noches, apurando experimentos los fines de semana,... gracias por todo ese tiempo que me dedicaste a mí y a cualquiera que veías que necesitaba ayuda. Me ayudaste con el diseño de los primeros oligos, me socorriste con los primeros WB desastrosos,... muchas gracias Amalia, y que sepas que nunca olvidaré aquellos "Edu, que te peten!" que me dedicabas. A Paula (¡a Santi y a Jaume también!), por todas las conversaciones, por todos los consejos, por tus correcciones de mis escritos en inglés y por todo tu apoyo (desde Valencia hasta Quebec), y siempre con una sonrisa por delante. Tu enorme fortaleza ha sido un referente para todos los que te conocemos. Muchas gracias por todo. A Lola, por toda tu ayuda en todo; en especial, gracias por toda tu ayuda en mis primeras lecciones en el mundo de las PCR; siempre estabas disponible a echar una mano a cualquier persona y en cualquier ámbito. Eres un ejemplo para cualquiera. A Vincenzo,

por todo lo que aprendí a tu lado con el mundo que rodea a SH3TC2; gracias por todas las lecciones, enseñanzas y por todo el tiempo dedicado. A David, que aunque te hicieras el duro, sabes que en el fondo te gusta ayudar! Gracias por toda tu ayuda. Gracias a todos tus conocimientos del calcio, ¡llegamos a ser hasta portada de HMG! También quiero hacer un agradecimiento especial a otros compañeros no tan veteranos. A Manoli, eres el ejemplo personalizado del esfuerzo y la dedicación. Hemos aprendido muchísimo de ti y de tu disponibilidad infinita, ya sea para los experimentos o para hacernos tartas especiales, juegos personalizados y hasta batas para toreros. ¡Todos tenemos muchísimo que agradecerte! A Fátima y a Diana, por la bondad infinita que tenéis, siempre ayudando a todo el mundo, gracias por toda vuestra ayuda y por vuestro apoyo. A Víctor, a ti te debo parte de la fuerza que he necesitado en la recta final de la tesis. Muchas gracias por todo tu apoyo en esta montaña rusa que es la ciencia, por nuestras charlas científicas y no tan científicas. Juntos hemos podido aprender mucho el uno del otro.

También a los demás compañeros del IBV, por supuesto, con mención especial a la CdF. Me enorgullece haber formado parte, aunque sea como Becario (pringaete) en tan prestigiosa Comisión. Gracias por las fiestas de Halloween, por las fiestas del Dragón, por las Olimpiadas, por las fiestas de Navidad,... cómo olvidar a los miembros de la CdF, al President (Jordi), al Primer DJ (Carles), a la Primera Dama (Carla), a la Gerente (Alicia), a la Portavoz (y cantante, Carol), a la también Becaria Raquel, y a nuestro Presidente honorífico (Fer). Me hubiera encantado poder pasar más tiempo con todos vosotros, y poder sacar otra edición de la revista oficial de la CdF.

Gracias también a todas aquellas personas que han participado de una manera u otra en este trabajo. Gracias al laboratorio de Chema Millán, él y su grupo siempre han estado disponibles para cualquier cosa que pudiéramos necesitar. Al grupo de Rafa Artuch, por hacer que parecieran tan fáciles las colaboraciones con ellos. A Ignacio Marín y a Toni Marco, por sus lecciones de evolución, análisis filogenéticos y de genómica comparativa. Al laboratorio de Pascual Sanz, en especial a Ada por sus enseñanzas en biología molecular de clonaciones mágicas. Al laboratorio de Nuria Flames, en especial a Laura Chirivella por su ayuda con las hibridaciones in situ en tejidos de ratón. Al laboratorio de Vicente Rubio, en especial a Mariano Polo, por todas sus lecciones moleculares. Al grupo de Bioinformática del CIPF liderado por el Dr. Dopazo; gracias en especial a David Montaner por su ayuda con los análisis de ligamiento, a Jorque Manrique, Enrique Vidal y Paco García por siempre responderme a cualquier consulta y a sus múltiples ayudas.

Gracias a todos los Servicios a los que el “cagaprisas” de Edu les he dado la plasta para conseguir los resultados lo antes posible. A Eugenio y a Ana, del servicio de secuenciación del IBMCP, y a Laura y a Virginia del servicio de Genómica y Proteómica del CIPF, por ser tan eficientes y tener los resultados en tiempos récord. Gracias a Eva Serna del Servicio de Análisis Multigénico de la UCIM, por su ayuda en los estudios de genotipado genómico. Un millón de gracias a Mario, responsable del Servicio de Microscopia electrónica del CIPF, por su paciencia, por su gran profesionalidad y por su ayuda con los protocolos, por su increíble rapidez procesando muestras, y siempre todo con una sonrisa, muchas gracias. Gracias a los informáticos del IBV y del CIPF, por ser tan pacientes con nosotros, y en especial a Manolo, por habernos instalado siempre todo lo que podía para que pudiéramos trabajar en las mejores condiciones posibles. Gracias a Amparo Almero, responsable de la biblioteca del IBV, por ser tan eficiente y conseguimos los artículos cuando no podíamos conseguirlos de ninguna de las maneras. Gracias al personal de limpieza (en especial a Susana y a Estrella), de mantenimiento, de seguridad (en especial a Jorge y a sus tertulias futboleras) y al personal de recepción (en especial a Esther y a Pili,

por la amabilidad, cariño y eficiencia con la que siempre hacen todo), tanto del IBV como del CIPF por lo bien que nos han tratado siempre.

Por último, gracias a mi familia y a Arantxa (sí, también vas en el epígrafe de mi familia). A mi familia le debo prácticamente todo lo que soy, incluyendo algo que debiera ser tan sencillo como ser agradecido en la vida. A mis padres, por darme cariño durante toda la vida, por ayudarme en todo, por apoyarme en todo, por serlo todo para mí. Sin vuestro esfuerzo no habría estudiado en Salamanca, no habría estudiado Biotecnología, no habría llegado hasta aquí. Gracias por soportar mi cabezonería. Sé que soy muy cabezón en casi todo, pero eso me ha permitido poder afrontar el reto de superar una tesis. Esta tesis va dedicada a ellos, a mi madre por su enorme generosidad y cariño, y especialmente a mi padre, ya que mi pasión por la ciencia me viene heredada de él, y porque estoy seguro que bien orgulloso estará cada vez que abra esta tesis. Eres el ejemplo de lo que debe ser un académico y científico, no solo por todo lo que has conseguido, sino por los valores que siempre has defendido y transmitido. A mis hermanos, porque ellos fueron mis primeros modelos a seguir y copiar, y de los que he aprendido y me han dado mucho en la vida. Gracias a mi hermana por todo su cariño (también el de Paco y sobris, Diego y Lola, los pequeños gigantes de la familia), a mi hermano Rafa, por demostrar que con perseverancia todo se consigue, y a mi hermano Alfonso, porque puede con todo.

Y finalmente a ti, Arantxa, gracias por todo. Tú me has llevado de la mano hasta aquí. Sin ti no habría llegado hasta el final de la tesis, me habría faltado toda la energía, la fuerza y la felicidad que tú me das. Mi tesis te ha puesto muchos retos: soportarme en mis días de frustración, aguantar mis días malos (últimamente casi todos), quedarnos sin puentes por estar trabajando, mi crisis de primer día de escritura,... ¡e incluso has tenido que pegarte madrugones para llevarme algún día a trabajar o a congresos! Siempre has conseguido hacerme reír, por muy mal que fueran las cosas, y además, por muy dura que fuera la semana, siempre estaba tranquilo pensando que llegarían nuestros viernes, nuestros momentos de "pizzis time", que hace que todo merezca la pena, contigo a mi lado. Por soportarme, por hacerme feliz, por hacerme volar, por hacerme soñar,..., y ahora, por ayudarme a hacerme (casi) doctor, ¡GRACIAS!

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Introducción general.....	5
1. Neuropatías periféricas hereditarias.....	7
2. Genética de las neuropatías periféricas hereditarias.....	8
3. Nuevos genes en neuropatías periféricas hereditarias.....	9
4. Búsqueda de nuevos genes en neuropatías periféricas hereditarias.....	10
5. Análisis de mutaciones y caracterización de nuevos genes candidatos.....	11
6. Presencia de modificadores genéticos en neuropatías periféricas hereditarias.....	12
Capítulo I: CARACTERIZACIÓN DE LAS BASES GENÉTICAS DE NUEVAS FORMAS DE NEUROPATÍAS RECURRENTE HEREDITARIAS.....	13
1. <u>Introducción del Capítulo I.....</u>	15
Neuropatías recurrentes hereditarias.....	15
Neuropatía Hereditaria con Sensibilidad para la Parálisis por Presión (HNPP).....	15
Amiotrofia Neurálgica Hereditaria (HNA).....	16
Eritromelalgia Primaria.....	17
2. <u>Hipótesis y objetivos Capítulo I.....</u>	21
3. <u>Resultados y línea argumental del Capítulo I.....</u>	22
3.1. Familia fCMT-129.....	23
3.1.1 Identificación de una región candidata de 12,39 Mb en el cromosoma 21.....	23
3.1.2 Ausencia de mutaciones patológicas en los exones de los genes codificantes de proteínas y miRNAs contenidos en la región candidata del cromosoma 21q21.....	26
3.1.3 Ausencia de deleciones y/o duplicaciones patológicas en la región candidata del cromosoma 21q21.....	28
3.2. Familia fCMT-266.....	33
3.2.1. Búsqueda de la mutación responsable de la neuropatía en la fCMT-266.....	33
3.2.1.1 Identificación de una región candidata en el cromosoma 17.....	33
3.2.1.2 Identificación de mutaciones candidatas mediante secuenciación de exoma en pacientes de la fCMT-266.....	34
3.2.1.3 La mutación en <i>SMYD4</i> cosegrega con la enfermedad en la familia fCMT-266.....	37
3.2.2. <i>SMYD4</i> , gen candidato de estar implicado en la neuropatía de la fCMT-266.....	37
3.2.2.1 <i>Smyd4</i> se expresa en sistema nervioso.....	39
3.2.2.2 <i>SMYD4</i> es una proteína fundamentalmente citoplasmática.....	42
3.2.2.3 La mutación p.K82E no afecta a la localización subcelular de <i>SMYD4</i>	43
3.2.2.4 <i>SMYD4</i> puede actuar como represor transcripcional.....	43
3.2.2.5 <i>SMYD4</i> interacciona con HSP90.....	45
3.2.3. Estudio del papel de <i>SMYD4</i> en el sistema nervioso periférico.....	49
3.2.3.1 Filogenia de la familia de las proteínas <i>Smyd</i> en metazoos.....	50
3.2.3.2 Relaciones evolutivas con otras proteínas SET y MYND de especies no animales.....	53

3.2.3.3	Catálogo completo y clasificación de las proteínas Smyd en <i>D. melanogaster</i>	56
3.2.3.4	Caracterización funcional de los genes <i>Smyd4</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.2.3.5	Los genes <i>Smyd4</i> de <i>D. melanogaster</i> son importantes para el desarrollo normal del PNS.....	62
3.2.3.6	La sobreexpresión de la proteína humana SMYD4 WT o la forma mutante p.K82E, provoca la pérdida de fotorreceptores.....	65
4.	<u>Discusión general del Capítulo I</u>	71
5.	<u>Conclusiones del Capítulo I</u>	73
	Capítulo II: BÚSQUEDA DE MODIFICADORES GENÉTICOS EN LA NEUROPATÍA DE CHARCOT MARIE TOOTH CMT2K DEBIDA A MUTACIONES DOMINANTES EN EL GEN GDAP1	75
1.	<u>Introducción del Capítulo II</u>	77
	La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: clínica y clasificación.....	77
	Modificadores genéticos en CMT.....	79
	Funciones de GDAP1.....	81
2.	<u>Hipótesis y objetivos del Capítulo II</u>	85
3.	<u>Resultados y línea argumental del Capítulo II</u>	87
	3.1. JPH1 es un candidato a ser modificador de GDAP1.....	87
	3.2. JPH1 rescata los defectos en el SOCE de células deficientes en GDAP1.....	89
	3.3. Rastreo mutacional del gen <i>JPH1</i> en familias CMT2K con la mutación dominante GDAP1 p.R120W.....	91
	3.4. El portador de la mutación GDAP1 p.R120W junto con la variante JPH1 p.R213P presenta un cuadro clínico más grave.....	92
	3.5. JPH1 p.R213P no rescata los defectos en el SOCE de las células deficientes en GDAP1.....	93
	3.6. Defectos en el manejo del calcio debido a la combinación de la mutación GDAP1 p.R120W y la variante JPH1 p.R213P.....	95
	3.7. Regulación de la expresión de JPH1 en el sistema nervioso periférico.....	96
	3.8. Los genes <i>JPH</i> tienen regiones 3'-UTR largas y que en el caso de <i>JPH1</i> está conservada en vertebrados.....	98
	3.9. Rastreo mutacional de la región 3'-UTR del gen <i>JPH1</i> en familias CMT2K con la mutación dominante GDAP1 p.R120W.....	99
	3.10. Los portadores de la mutación GDAP1 p.R120W junto con la variante <i>JPH1</i> c.*1962G>A presentan un cuadro clínico más grave.....	100
	3.11. La variante <i>JPH1</i> c.*1962G>A afecta a los niveles de expresión.....	101
	3.12. La combinación de alteraciones en Jp y Gdap1 potencia el daño neural en <i>D. melanogaster</i>	102
	3.13. Cribado mutacional de <i>JPH1</i> en la serie de CMT sin diagnóstico genético.....	110
	3.14. Los genes <i>JPH</i> como modificadores de otras enfermedades neurológicas.....	113
	3.15. Los genes <i>JPH</i> como modificadores de rutas de señalización en <i>D. melanogaster</i>	115
	3.16. Jp puede actuar como modificador de la ruta de Notch.....	117
4.	<u>Conclusiones del Capítulo II</u>	121
	Pacientes, Materiales y Métodos	123
	1. Pacientes.....	125
	1.1. fCMT-129.....	125

1.2. fCMT-266.....	125
1.3. Familias CMT2K.....	126
1.4. Familias CMT sin diagnóstico genético.....	126
2. Material biológico.....	127
2.1. Cepas bacterianas.....	127
2.2. Líneas celulares inmortalizadas de mamíferos.....	127
2.3. Líneas de <i>D. melanogaster</i>	128
2.4. Anticuerpos.....	130
3. Metodología de Genética Humana.....	130
3.1. Cartografiado genómico.....	130
3.2. Cartografiado fino.....	130
3.3. Análisis de ligamiento.....	132
3.4. Análisis de haplotipo.....	132
3.5. Selección de genes candidatos en el estudio genético en la fCMT-129.....	132
3.6. Análisis mutacional.....	132
3.7. Hibridación genómica comparada (CGH).....	133
3.8. Secuenciación de exoma mediante <i>Next Generation Sequencing</i>	133
4. Análisis filogenéticos y estudios de genómica comparativa.....	134
4.1. Búsqueda de homólogos de la familia de proteínas Smyd, alineamientos de secuencias y reconstrucción filogenética.....	134
4.2. Estudio genómico comparativo del <i>locus</i> de <i>GDAP1</i> y <i>GDAP1L1</i>	135
4.3. Búsqueda de regiones reguladoras conservadas en la familia génica de las <i>JPH</i> en vertebrados.....	135
5. Métodos moleculares.....	136
5.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	136
5.1.1. Extracción de DNA.....	136
5.1.2. Extracción de RNA.....	137
5.1.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos.....	137
5.2. Amplificación de los ácidos nucleicos.....	137
5.3. Vectores, clonaciones, subclonaciones y mutagénesis dirigida.....	138
5.3.1. Vectores.....	138
5.3.2. Clonaciones y subclonaciones.....	139
5.3.3. Mutagénesis dirigida.....	139
5.4. Transfección de células de mamífero.....	140
6. Generación de moscas transgénicas.....	140
6.1. Generación de moscas transgénicas para la sobreexpresión de SMYD4 humano...140	
6.2. Generación de línea para la sobreexpresión del gen <i>Jp</i> (<i>CG4405</i>).....	141
7. Análisis de expresión de genes.....	143
7.1. Obtención del cDNA mediante retrotranscripción, RT-PCR y qRT-PCR.....	143
7.2. Datos de expresión High-Throughput de <i>D. melanogaster</i>	144
7.3. Hibridación in situ de embriones de <i>D. melanogaster</i>	144
7.3.1. Generación de las sondas de RNA para hibridaciones <i>in situ</i> de embriones de <i>D. melanogaster</i>	144

7.3.2. Recolección, fijación y procesamiento de los embriones de <i>D. melanogaster</i>	145
7.3.3. Hibridación y detección.....	146
7.4. Hibridación <i>in situ</i> en cortes de embriones de ratón.....	147
7.4.1. Generación de las sondas de RNA para hibridaciones <i>in situ</i> en cortes de embriones de ratón.....	147
7.4.2. Prehibridación, hibridación, detección y montaje.....	147
8. Análisis de proteínas.....	149
8.1. Preparación de extractos proteicos totales a partir de células de mamífero en cultivo.....	149
8.2. Detección de la proteína SMYD4 en tejidos humanos.....	149
8.3. Preparación de extractos proteicos a partir de tejidos de ratón.....	149
8.4. Preparación de extractos proteicos por fraccionamiento subcelular.....	149
8.5. Electroforesis, transferencia e inmunodetección mediante Western Blot.....	150
8.6. Estudios de interacción de proteínas mediante ensayo de coinmunoprecipitación.....	150
8.7. Búsqueda de interactores mediante inmunoprecipitación seguido de cromatografía líquida y espectrometría de masas.....	151
9. Microscopía.....	152
9.1. Microscopía de campo claro.....	152
9.1.1. Análisis de fenotipos externos en individuos adultos de <i>D. melanogaster</i>	152
9.1.2. Preparación de cutículas de individuos adultos de <i>D. melanogaster</i> para su visualización al microscopio.....	152
9.1.3. Análisis microscópico de la estructura de la retina en ojo adulto.....	152
9.2. Microscopía de fluorescencia.....	153
9.2.1. Inmunofluorescencia en células en cultivo.....	153
9.2.2. Análisis subcelular de SMYD4 WT y p. K82E mediante microscopía de fluorescencia.....	154
9.2.3. Preparación de tejidos <i>D. melanogaster</i> para su análisis mediante microscopía de fluorescencia.....	154
9.2.3.1 Montaje de tejido muscular de larva.....	154
9.2.3.2 Preparación de tórax de individuos adultos para inmunodetección de criosecciones en microscopio confocal.....	154
9.2.3.3 Preparación de cabezas para inmunodetección de criosecciones en microscopio confocal.....	155
9.3. Microscopía electrónica.....	155
9.3.1. Microscopio electrónico de barrido.....	155
9.3.2. Microscopio electrónico de transmisión.....	155
10. Ensayos funcionales.....	156
10.1. Tratamientos celulares.....	156
10.1.1. Efecto de la geldanamicina sobre los niveles proteicos de SMYD4.....	156
10.1.2. Efecto de la thapsigarguina sobre la expresión de <i>GDAP1</i> y <i>JPH1</i>	156
10.2. Ensayos de tipo luciferasa.....	156
10.2.1. Estudios de represión transcripcional mediante ensayo luciferasa.....	156

10.2.2. Análisis de variantes en región 3'-UTR mediante ensayo luciferasa.....	157
10.3. Minigenes.....	158
10.4. Medidas de calcio citosólico.....	159
Anexos.....	161
Apéndice (compendio de publicaciones y manuscritos en preparación).....	183
Bibliografía.....	185

Abreviaturas

BCA	Ácido bicinconónico	NPH	Neuropatías periféricas hereditarias
BSA	Albúmina de suero bovino	Nt	Nucleótidos
cDNA	DNA complementario	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
CDS	Secuencia codificante	Pb	Pares de bases
CGH	Hibridación genómica comparada	PBS	Tampón fosfato salino
CMAP	Potenciales de acción muscular compuesto	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CMT	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	PFA	Paraformaldehído
CMTNS	CMT <i>neuropathy score</i>	PNS	Sistema nervioso periférico
CNS	Sistema nervioso central	RE	Reticulo endoplasmático
CTD	Dominio C-terminal	RNA	Ácido ribonucleico
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	RNAi	RNA <i>interference</i>
dbSNP	Base de datos de polimorfismos	ROS	Especies reactivas del oxígeno
DIG	Digoxigenina	RTK	Receptor tirosina-kinasa
DMSO	Dimetil sulfoxido	SEM	Microscopio electrónico de barrido
DNA	Ácido desoxirribonucleico	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
DRG	Ganglios de la raíz dorsal	SNAP	Potenciales de acción sensitivos del nervio
GA	Geldanamicina	SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
gDNA	DNA genómico	SNV	Variante de nucleótido simple
GFP	Proteína verde fluorescente	SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
GST	Glutatión S-transferasa	TA	Temperatura ambiente
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo	TCL	Lisado celular total
HD	Enfermedad de Huntington	TEM	Microscopio electrónico de transmisión
HDAC	Desacetilasa de histonas	TG	Thapsigargina
HNA	Amiotrofia neurálgica hereditaria	TPR	Dominios <i>tetratricopeptide repeat</i>
HNPP	Neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la presión	tRNA	RNA transferente
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	UTR	<i>Untranslated region</i>
JMC	<i>Junctional membrane complex</i>	UV	Ultravioleta
Kb	Kilobases	VCN	Velocidad de conducción nerviosa
KD	<i>Knock-down</i>	WB	<i>Western blot</i>
KMT	Lisina metiltransferasa	WES	Secuenciación del exoma
LOD	<i>Log of Odds</i>	WGS	Secuenciación del genoma
MAF	Frecuencia del alelo menos frecuente	WT	<i>Wild type</i>
MAM	Membranas asociadas a mitocondria	$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial
Mb	Megabases		
miRNA	<i>micro RNA</i>		
ML	<i>Maximum likelihood</i>		
MRI	Resonancia magnética de imagen		
mRNA	RNA mensajero		
NGS	<i>Next generation sequencing</i>		
NJ	<i>Neighbour joining</i>		

Resumen

Capítulo I: CARACTERIZACIÓN DE LAS BASES GENÉTICAS DE NUEVAS FORMAS DE NEUROPATÍAS RECURRENTES HEREDITARIAS

Las neuropatías recurrentes hereditarias, en las que los enfermos presentan grados parciales de recuperación, no son habituales y normalmente se deben a mutaciones en los genes *PMP22*, *SEPT9* o *SCN9A*. Contamos con dos extensas familias (fCMT-129 y fCMT-266) en las que los pacientes presentan neuropatías recurrentes hereditarias y en las que previamente habíamos descartado la implicación de los genes candidatos conocidos. Mediante cartografiado genómico y análisis de ligamiento hemos identificado dos nuevos *loci*, uno en el cromosoma 21q21 en la fCMT-129 y otro en el cromosoma 17p13.3 en la fCMT-266, hasta ahora no relacionados con este grupo de enfermedades. Los haplotipos construidos con marcadores pertenecientes a las regiones identificadas, cosegregan perfectamente con la enfermedad en cada familia. En la fCMT-129 hemos descartado la presencia de mutaciones en los exones de todos los genes codificantes de proteínas o miRNAs contenidos en la región candidata, así como la presencia de grandes deleciones y/o duplicaciones. En la fCMT-266 hemos identificado la mutación *SMYD4* p.K82E en la región candidata como principal candidata de la neuropatía. Hemos caracterizado la expresión de *SMYD4* en el sistema nervioso periférico así como su relevancia en dicho tejido empleando *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. Nuestros hallazgos indican que hay nuevos *loci* genéticos implicados en neuropatías recurrentes hereditarias, y ponen de manifiesto la heterogeneidad genética y clínica asociada a este grupo de enfermedades.

Capítulo II: BÚSQUEDA DE MODIFICADORES GENÉTICOS EN LA NEUROPATÍA DE CHARCOT MARIE TOOTH CMT2K DEBIDA A MUTACIONES DOMINANTES EN EL GEN *GDAP1*.

Las mutaciones en el gen *GDAP1* causan diferentes formas de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Las mutaciones con herencia dominante en este gen conducen a CMT2K, que se caracteriza por la presencia de variabilidad clínica intrafamiliar debido a penetrancia incompleta y expresividad variable, sugiriendo la existencia de modificadores genéticos. Hemos identificado y caracterizado el gen *JPH1* como modificador genético y funcional de *GDAP1*. Ambos genes constituyen un *cluster* conservado de genes funcionalmente relacionados en vertebrados. La sobreexpresión de *JPH1* rescata los defectos en el mecanismo del SOCE (*store-operated calcium entry*) presente en células deficientes en *GDAP1*. En un cribado mutacional del gen *JPH1* en una serie de 29 pacientes CMT2K portadores de la mutación *GDAP1* p.R120W hemos identificado la mutación *JPH1* p.R213P en un paciente con un cuadro clínico agravado. La combinación de las mutaciones *GDAP1* p.R120W y *JPH1* p.R213P en células provoca defectos más acusados en la homeostasis del calcio. Niveles alterados de *JPH1* en pacientes CMT2K también podrían contribuir en las consecuencias fenotípicas de las mutaciones en *GDAP1*, lo que hemos comprobado usando *D. melanogaster* como organismo modelo. Es la primera vez que se describe un modificador genético en formas de CMT2. La investigación empleando los modelos de *D. melanogaster* nos ha permitido demostrar el posible papel de las proteínas *JPH* como modificadores de otra enfermedad neurológica, como es la enfermedad de Huntington, así como establecer por primera vez una relación entre los genes *JPH* y la ruta de señalización de Notch.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Neuropatías periféricas hereditarias

Las neuropatías periféricas hereditarias (NPH) constituyen un grupo diverso de enfermedades, clínica y genéticamente heterogéneo, que producen una degeneración progresiva de los nervios periféricos. En función de las neuronas o axones afectados, clásicamente se han clasificado en: neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), en neuropatías motoras hereditarias (NMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH) y neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH) (Dyck, 1975, Dyck et al., 1993), que a su vez se pueden subdividir en varios subtipos.

La inmensa mayoría de las NPH muestran un curso progresivo, aunque algunas cursan de forma episódica y recurrente, con recaídas-remisiones sucesivas; es el caso de la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión (HNPP, acrónimo en inglés) y de la amiotrofia neurálgica hereditaria (HNA, acrónimo en inglés) (Chance, 2006, Timmerman et al., 2006, Klein et al., 2013a).

En el grupo de las NSMH se distinguen varias formas: la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), el síndrome de Déjérine-Sottas (DS), la neuropatía hipomielinizante congénita (NHC) y la HNPP (Dyck et al., 1993). En clasificaciones más modernas, el término CMT refiere de forma general a las NSMH (Reilly and Shy, 2009, Saporta and Shy, 2013). Aunque sólo es foco de nuestra atención en este trabajo las NPH en las que la neuropatía es la parte única o primaria de la enfermedad (Tabla I1A), hay que tener en cuenta que la neuropatía periférica puede presentarse como parte de un trastorno neurológico generalizado o multisistémico (Tabla I1B) (Reilly and Shy, 2009).

Tabla I1. Clasificación de las neuropatías hereditarias.

A. Neuropatías hereditarias en las que la neuropatía es la parte única o primaria de la enfermedad	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)
	Neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la parálisis por presión (HNPP)
	Neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH) / Neuropatías sensitivas hereditarias (NSH)
	Neuropatías motoras hereditarias (NMH)
	Amiotrofia neurálgica hereditaria (HNA)
B. Neuropatías hereditarias en las que la neuropatía es parte de un trastorno neurológico generalizado o multisistémico	Polineuropatía amiloide familiar (PAF)
	Alteraciones del metabolismo lipídico
	Porfirias
	Trastornos con defectos en la reparación y mantenimiento del DNA
	Neuropatías asociadas con enfermedades mitocondriales
	Neuropatías asociadas con ataxias hereditarias
Otras	

De entre las NPH, CMT es la más frecuente: se trata de una enfermedad rara que está entre los trastornos hereditarios neurológicos más comunes, con una prevalencia aproximada de 17-40 afectados por cada 100.000 individuos, siendo en la población española de 28/100.000 (Combarros et al., 1987, Martyn and Hughes, 1997).

2. Genética de las neuropatías periféricas hereditarias

El primer *locus* responsable de una neuropatía periférica se cartografió en 1982 (Bird et al., 1982). Sin embargo, no fue hasta el año 1991 cuando se identificó la primera, y todavía más frecuente, causa genética de neuropatía periférica hereditaria. Se descubrió en el llamado *locus* CMT1A, cartografiado previamente en 1989 (Raeymaekers et al., 1989, Vance et al., 1989), una duplicación de 1,4 Mb en el cromosoma 17p11.2 (Lupski et al., 1991, Raeymaekers et al., 1991), que incluye el gen *PMP22* que codifica la proteína *peripheral myelin protein 22*, y que se produce por un mecanismo de entrecruzamiento desigual entre cromátides no hermanas durante la meiosis (Palau et al., 1993). Mutaciones en este gen causan CMT1A, una forma desmielinizante de CMT y que es responsable de más del 50% de los casos de CMT con diagnóstico genético (Murphy et al., 2011, Saporta et al., 2011, Sivera et al., 2013). Poco tiempo después, en 1993 se descubrió que una delección en la misma región cromosómica 17p11.2 causa otra forma de neuropatía periférica hereditaria, la HNPP (Chance et al., 1993), mientras que mutaciones puntuales en *PMP22* causan tanto CMT1A como HNPP.

La publicación del Genoma Humano en 2001 (Lander et al., 2001, Venter et al., 2001), junto con el desarrollo de tecnologías de *high-throughput*, permitió acelerar el descubrimiento de nuevos genes y mutaciones en este tipo de enfermedades. Desde entonces, nuestro conocimiento sobre las bases genéticas de las NPH no ha parado de crecer, con más de 80 genes implicados identificados hasta el momento (Figura I1) (Timmerman et al., 2014).

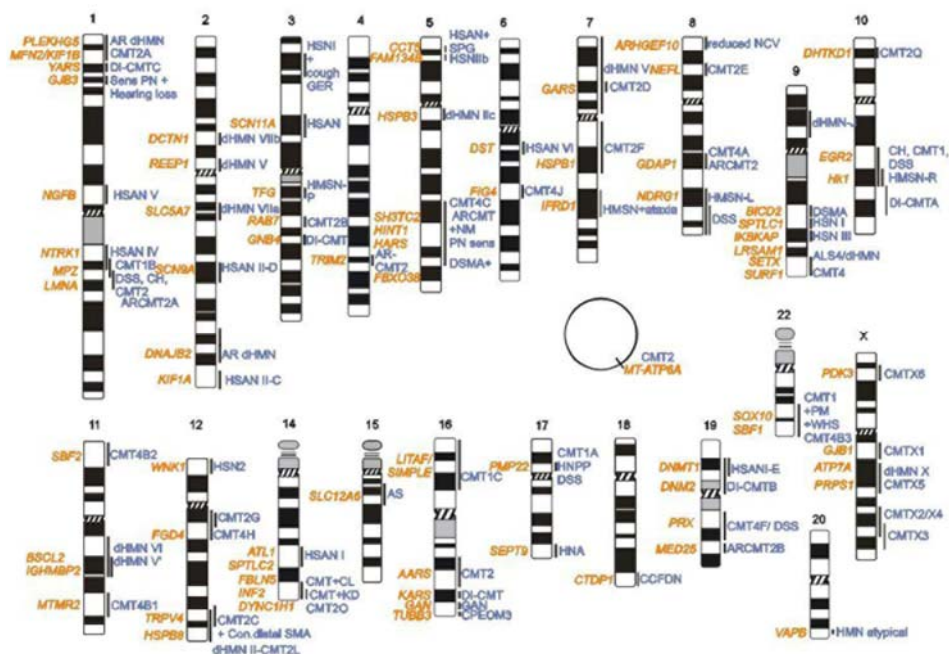


Figura I1. Genes y *loci* implicados en neuropatías periféricas hereditarias. En la figura se muestran los más de 80 genes (en naranja) y *loci* correspondientes (línea vertical) en el genoma humano cuyas mutaciones son responsables de neuropatías periféricas hereditarias. En azul se indican la nomenclatura de cada una de las neuropatías correspondientes. Figura adaptada de la revisión de Timmerman y colaboradores (Timmerman et al., 2014).

Los genes implicados en NPH codifican proteínas con funciones muy diversas, incluyendo componentes estructurales de la mielina, factores de transcripción, metilación del DNA, síntesis y recambio de proteínas, organización del citoesqueleto, transporte axonal, tráfico vesicular, dinámica mitocondrial, regulación del retículo endoplasmático, canales iónicos, homeostasis de calcio, y metabolismo entre otros (Figura I2) (Patzko and Shy, 2011, Rossor et al., 2013, Harel and Lupski, 2014). Todo ello apunta hacia diferentes

mecanismos y rutas importantes para el mantenimiento de la función normal del nervio periférico (Figura I2).

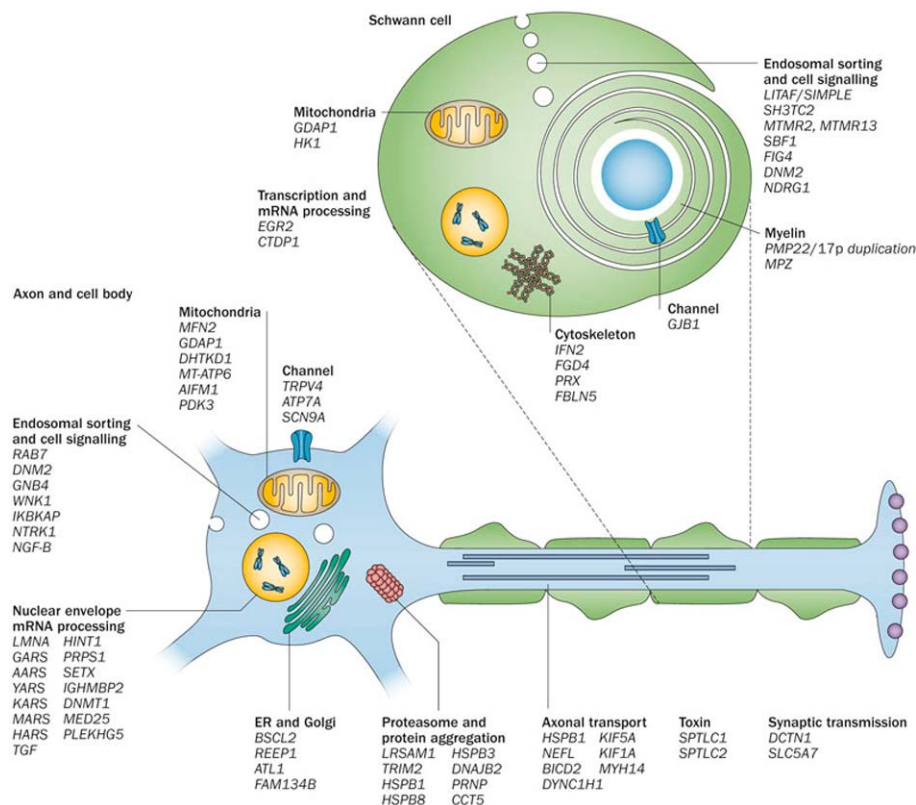


Figura I2. Genes conocidos implicados en neuropatías periféricas hereditarias y su mecanismo patológico. Se ilustra en el contexto del sistema nervioso periférico diversas proteínas cuyas mutaciones son responsables de neuropatías periféricas hereditarias, indicándose los procesos funcionales y celulares en los que participan. Imagen adaptada de Rossor y colaboradores (Rossor et al., 2013).

Algunos de los genes implicados en NPH se expresan únicamente en el sistema nervioso periférico (PNS, acrónimo en inglés) donde desempeñan una función específica, como es el caso de los genes que codifican para componentes estructurales de la mielina (por ejemplo *PMP22*, *MPZ*); sin embargo, otros muchos tienen una expresión ubicua y con funciones generalizadas, como los genes que codifican las aminoacil-tRNA sintetasas (por ejemplo *GARS*, *HARS*, *YARS*), o las *small heat shock proteins* (por ejemplo *HSPB1*, *HSPB3*, *HSPB8*). Resulta sorprendente cómo mutaciones en proteínas ubicuas son capaces de producir de forma aislada una degeneración de los nervios periféricos, aunque se suele atribuir a la longitud de éstos (Niemann et al., 2006, Sevilla et al., 2008, Timmerman et al., 2014). El hecho de que una neurona y su axón puedan tener hasta un metro de longitud contribuye a su particular susceptibilidad frente a alteraciones en diferentes procesos celulares que deben estar perfectamente regulados. Por ejemplo, los requerimientos energéticos de los procesos de transporte en estas largas neuronas exceden con creces a aquéllos de otros tipos celulares. La alteración de este complicado sistema de mantenimiento puede conllevar la degeneración.

3. Nuevos genes en neuropatías periféricas hereditarias

El diagnóstico genético es crucial, ya que permite a los pacientes y a sus familiares recibir un consejo genético y permite descartar casos potencialmente tratables de

neuropatía adquirida (Reilly et al., 2011). A pesar del gran número de genes conocidos implicados en NPH, un número relevante de pacientes carecen de diagnóstico genético. En las últimas series clínicas de pacientes de CMT, tras la búsqueda de mutaciones causales en los genes CMT conocidos, se consigue el diagnóstico genético en el 60-80% de los casos (Saporta et al., 2011, Murphy et al., 2012, Sivera et al., 2013), por lo que todavía muchos pacientes quedan sin diagnóstico genético, especialmente en las formas axonales (CMT2) donde aproximadamente el 40% de los pacientes permanecen sin diagnóstico genético y evidencia la existencia de otros genes responsables de CMT todavía por descubrir. Este hecho es aún más pronunciado en el caso de la HNA; hasta la fecha únicamente se han descrito mutaciones patológicas en el gen *SEPT9*. En la cohorte estudiada por Collie y colaboradores (Collie et al., 2010), tan sólo identificaron mutaciones en *SEPT9* en el 55% (30/55) de los casos de HNA, y en al menos tres familias no obtuvieron ligamiento con el *locus* 17q25 de *SEPT9*, demostrando que deben haber otros genes implicados en HNA.

Todo ello apunta a que aún quedan genes implicados en NPH por identificar, cuyo descubrimiento ampliaría la lista de mecanismos patológicos, permitiendo una mejor comprensión de este tipo de enfermedades y el descubrimiento de nuevas posibles dianas para lograr un tratamiento terapéutico.

4. Búsqueda de nuevos genes en neuropatías periféricas hereditarias

Una vez descartados los genes conocidos que podrían estar relacionados con la enfermedad, la elección de la estrategia a seguir para identificar la mutación responsable depende de los recursos disponibles y/o bien de los conocimientos que se tengan de la patogénesis de la enfermedad. Clásicamente la metodología empleada para la identificación de nuevos genes implicados en enfermedades mendelianas se ha basado en el cartografiado genómico y el análisis de ligamiento, y que permitió la identificación de los primeros genes implicados en NPH. Esta metodología requería mucho tiempo y esfuerzo, aunque el desarrollo de las tecnologías *high-throughput* ha facilitado enormemente este proceso. Sin embargo, se requiere un número alto de pacientes y familias muy extensas, actualmente excepcionales sobre todo en el ámbito de las enfermedades raras.

El desarrollo de nuevas aproximaciones basadas en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), ha reducido el coste y el tiempo del análisis de regiones genómicas extensas, y con éstas, el estudio de un menor número de individuos resulta eficaz. Esto favorece especialmente la determinación de las causas subyacentes a enfermedades mendelianas con una importante heterogeneidad genética (Wang et al., 2013). Uno de estos procedimientos es la secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS), que ya ha demostrado su eficacia en la detección de la mutación causal en una familia CMT (Lupski et al., 2010), aunque su coste sigue siendo alto y el análisis de la información obtenida muy complejo. Una estrategia más abordable que permite abaratar costes y simplificar el estudio, es la secuenciación del exoma (*whole exome sequencing*, WES) (Wang et al., 2013), donde se analizan únicamente las regiones exónicas y sus secuencias intrónicas flanqueantes. Esta metodología se ha empleado con éxito en la identificación de nuevos genes implicados en NPH y otras enfermedades mendelianas, aunque también se está implementando cada vez más como herramienta diagnóstica (Schabhuttl et al., 2014, Timmerman et al., 2014, Drew et al., 2015).

A pesar de todo, actualmente sigue suponiendo un reto identificar y distinguir la mutación causal de entre las miles de variantes que se obtienen mediante secuenciación masiva. Mediante WES, en cada individuo se suelen identificar aproximadamente 20.000 variantes, lo que puede dificultar enormemente la tarea si no se dispone de información adicional (Bamshad et al., 2011, Cooper and Shendure, 2011, Lyon and Wang, 2012, Sunyaev, 2012, Boycott et al., 2013, Palotie et al., 2013). Por ello, la combinación de esta metodología junto con otra aproximación complementaria, como es el cartografiado genómico y el análisis de ligamiento, supone una enorme ventaja para acotar la búsqueda e identificar la mutación causal (Bailey-Wilson and Wilson, 2011, Teare and Santibanez Koref, 2014, Ott et al., 2015).

5. Análisis de mutaciones y caracterización de nuevos genes candidatos

Una vez identificada una mutación en un nuevo gen como candidata de ser responsable de la enfermedad en la familia estudiada, su validación puede convertirse en una ardua tarea (Lyon and Wang, 2012). La identificación de mutaciones en el mismo gen en otras familias no relacionadas con la misma enfermedad supone la evidencia más potente, aunque no siempre es posible disponer de otras familias, sobre todo en el caso de enfermedades raras.

Los estudios funcionales pueden servir para obtener un apoyo adicional sobre la causalidad de una mutación sobre un fenotipo dado. Los estudios experimentales pueden consistir desde análisis *in vitro* de las consecuencias moleculares de la mutación (niveles de expresión, actividad enzimática, estabilidad de la proteína,...) hasta incluso la recapitulación *in vivo* del fenotipo en un organismo modelo. Sin embargo, evaluar el efecto de una mutación codificante requiere un mínimo de conocimiento previo sobre la función de la proteína en cuestión, y esto sigue siendo una incógnita para la mayoría de las proteínas humanas.

El uso de organismos modelos es una herramienta fundamental para descubrir la función de nuevos genes e incluso para demostrar la implicación de genes candidatos en enfermedades. Aunque no siempre se puede abordar su uso, ya sea por la falta de genes homólogos en dichos organismos o por el elevado coste que puede suponer su implementación. Cada vez más se están empleando en investigación biomédica modelos animales fácilmente manipulables y con un bajo coste económico, como es el caso de *Drosophila melanogaster*. Se ha utilizado como organismo experimental en estudios genéticos desde 1909, por lo que se conoce mucho sobre su manipulación genética. Se han desarrollado multitud de herramientas genéticas que facilitan su utilización en investigación, y de entre las cuales destaca el sistema GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993), que permite dirigir la sobreexpresión o el silenciamiento del gen de interés a cualquier región/tejido de *D. melanogaster*.

Se estima que aproximadamente el 75% de los genes humanos conocidos responsables de enfermedades tienen su homólogo correspondiente en el genoma de *D. melanogaster* (Reiter et al., 2001, Lloyd and Taylor, 2010). Por tanto, es entendible que su uso en investigación biomédica no pare de crecer (Wangler et al., 2015), y no sólo para esclarecer la función de genes (Bakal, 2011), sino que se ha convertido en una herramienta fundamental para la generación de modelos de enfermedades humanas y para comprender los mecanismos de enfermedad (Chen and Crowther, 2012, Yamamoto et al., 2014), para identificar modificadores genéticos (Lenz et al., 2013) e incluso para descubrir dianas terapéuticas y posibles fármacos (Pandey and Nichols, 2011). Y estas aplicaciones

también se han venido introduciendo en el campo de las enfermedades que afectan al sistema nervioso (Hirth, 2010). Por ello, su utilización como organismo modelo puede servir como una potente herramienta donde validar la función de genes candidatos en el sistema nervioso así como para identificar posibles mecanismos de enfermedad.

6. Presencia de modificadores genéticos en neuropatías periféricas hereditarias

Aunque por sí mismos no sean causantes de enfermedad, variantes comunes pueden actuar como modificadores de un fenotipo modulando el efecto de la mutación responsable de la enfermedad (Genin et al., 2008). De este modo, los modificadores genéticos se pueden definir como genes que influyen en la expresión fenotípica de otro gen (Genin et al., 2008). En los últimos años estamos siendo testigos de un creciente interés en la búsqueda de potenciales modificadores genéticos en multitud de enfermedades, incluyendo neuropatías hereditarias (Cutting, 2010, Kearney, 2011, Venturini et al., 2012, Wirth et al., 2013, Bonifert et al., 2014, Brewer et al., 2014). En ciertas formas de NPH caracterizadas por presentar una gran variabilidad inter y/o intrafamiliar, como por ejemplo CMT1A o las formas de NPH debidas a mutaciones dominantes en los genes *BSCL2*, *GDAP1*, *MFN2* o *TRPV4*, o incluso recesivas como en *LMNA*, se postula la existencia de modificadores genéticos (Irobi et al., 2004, Tazir et al., 2004, Del Bo et al., 2008, Sivera et al., 2010, Klein et al., 2011, van Paassen et al., 2014).

Se pueden abordar distintas estrategias para la identificación de modificadores genéticos, entre las que destacan los estudios de ligamiento, estudios de asociación, estudios globales mediante búsquedas sistemáticas (*screenings* o cribados) o estudios más dirigidos analizando genes o rutas candidatas (Genin et al., 2008, van Ham et al., 2009). Su identificación puede ser clave para apuntar hacia nuevas rutas que puedan ser dianas terapéuticas, pero además, mutaciones en los posibles genes modificadores podrían ser responsables de enfermedad en otras formas de neuropatías hereditarias.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE LAS BASES GENÉTICAS DE NUEVAS FORMAS DE NEUROPATÍAS RECURRENTE HEREDITARIAS

1. Introducción del Capítulo I

Neuropatías recurrentes hereditarias

Las NPH en las que la neuropatía se presenta de forma recurrente y episódica, y en las que los enfermos presentan grados parciales de recuperación no son habituales (Chance, 2006, Klein, 2007). Los trastornos hereditarios más comunes que pertenecen a este grupo de neuropatías recurrentes son fundamentalmente dos: (i) la neuropatía hereditaria con susceptibilidad a la presión (HNPP; MIM 162500), y (ii) la amiotrofia neurálgica hereditaria (HNA; MIM 162100) (Chance, 2006). Adicionalmente, cuando la neuropatía se presenta con episodios de eritromelalgia, se suele considerar (iii) la eritromelalgia primaria (MIM 133020).

Neuropatía Hereditaria con Sensibilidad para la Parálisis por Presión (HNPP)

Se trata de un trastorno autosómico dominante que se manifiesta en forma de episodios recurrentes de neuropatía sensitivo-motora focal e indolora (Chance, 2006, van Paassen et al., 2014). Puede causar episodios periódicos de entumecimiento, debilidad muscular y atrofia. Descrita por primera vez por De Jong en 1947, HNPP es una neuropatía compresiva: muchos episodios están precedidos por una compresión menor o trauma del nervio periférico afectado; aunque también se ha descrito su desencadenamiento debido a ejercicio físico extremo (Ichikawa and Nezu, 2005). La edad de aparición de los primeros síntomas ocurre normalmente durante la segunda o tercera década, aunque se han descrito casos en los que aparecen en la infancia o incluso a partir de la octava década de vida (Ichikawa and Nezu, 2005, van Paassen et al., 2014). En biopsias de nervio periférico se observan cambios histopatológicos como desmielinizaciones segmentarias y engrosamientos mielínicos característicos, conocidos como formaciones tomaculosas.

En la mayoría de los casos (85-90%), HNPP se debe a la delección del gen *PMP22* (Chance et al., 1993, van Paassen et al., 2014). Como se había comentado anteriormente, la duplicación de *PMP22* (cromosoma 17p11.2) causa CMT1A (MIM 118220), mientras que mutaciones puntuales en este mismo gen pueden causar tanto HNPP como CMT1A (Jetten and Suter, 2000, van Paassen et al., 2014). Las mutaciones puntuales en *PMP22* responsables de HNPP, pueden afectar al *splicing*, generar codones de parada o incluso producir cambios de pauta de lectura (*frameshifts*) que dan lugar a un alelo nulo (Bort et al., 1997, van Paassen et al., 2014).

La proteína PMP22 es un componente estructural de la mielina compacta de los nervios periféricos y está implicada en el control del ciclo celular, en la proliferación y diferenciación de las células de Schwann, en el mantenimiento axonal, y en la regulación de la estabilidad y el grosor de la mielina (Adlkofer et al., 1995, Giambonini-Brugnoli et al., 2005). La haploinsuficiencia de *PMP22*, ya sea por la delección genómica de 1,4 Mb en el cromosoma 17p11.2 o por mutaciones puntuales que dan lugar a un alelo no funcional, es responsable de HNPP. Los pacientes de HNPP muestran una reducción en los niveles de PMP22 tanto a nivel de mRNA como de proteína (Gabriel et al., 1997, Schenone et al., 1997). Además, los modelos murinos heterocigotos para la delección de *Pmp22* muestran características histopatológicas comparables a las presentes en pacientes de HNPP (Adlkofer et al., 1995).

Amiotrofia Neurálgica Hereditaria (HNA)

Es un trastorno autosómico dominante caracterizado por episodios recurrentes de neuropatía plexobraquial con alteraciones sensitivas, debilidad muscular y atrofia, precedido por dolor intenso en el miembro afectado (Chance, 2006, van Alfen, 2011). Los episodios asociados con HNA suelen desarrollarse en la segunda o tercera década, pero también pueden aparecer durante la infancia. Los síntomas pueden desencadenarse por factores externos como infecciones e inmunizaciones, pero también por estrés emocional o incluso por ejercicio físico intenso. En las mujeres pueden presentarse episodios durante o después del embarazo. Los episodios pueden durar semanas o meses, y son a menudo seguidos por debilidad residual y déficit sensorial en los miembros afectados. En algunos casos se han asociado algunas características dismórficas menores, incluyendo entre otros hipotelorismo, baja estatura, paladar hendido o sindactilia. Estudios patológicos muestran degeneración axonal en nervios distales a los plexos afectados (Chance, 2006).

A finales de los 90 mediante análisis de ligamiento en familias HNA se identificó el *locus* HNA en el cromosoma 17q25 (Pellegrino et al., 1996, Pellegrino et al., 1997, Stogbauer et al., 1997, Meulemann et al., 1999, Watts et al., 2002). Pero no fue hasta 2005 cuando Kuhlenbäumer y colaboradores identificaron en seis familias mutaciones en el gen *SEPT9* localizado en el *locus* HNA (Kuhlenbaumer et al., 2005). Se caracterizaron las mutaciones no sinónimas p.R88W y p.S93F, y la mutación c.-131G>C en la región 5'-UTR del transcrito alfa (isoforma v3). Las mutaciones de cambio de aminoácido han sido posteriormente identificadas en otras familias que no comparten haplotipo común, lo que sugiere que son mutaciones recurrentes (Hannibal et al., 2009).

Posteriormente en 18 familias HNA con ligamiento en el cromosoma 17q25 se identificaron duplicaciones en *SEPT9* (Landsverk et al., 2009, Collie et al., 2010). Doce de estas familias presentan la misma duplicación intragénica de 38 Kb, y dado que comparten haplotipo común, se propuso un efector fundador. En las otras seis se identificaron otras duplicaciones en *SEPT9* que no comparten el haplotipo fundador. Salvo en una familia en la que se identificó la duplicación del gen *SEPT9* completo, todas las duplicaciones contienen en tándem y en pauta como mínimo el exón de 645 pb donde se habían localizado previamente las mutaciones no sinónimas, dando lugar a una proteína de mayor tamaño con la repetición de un dominio rico en prolinas (Landsverk et al., 2009, Collie et al., 2010). No se han descrito diferencias clínicas aparentes entre los pacientes con mutaciones puntuales en el exón de 645 pb y los que tienen duplicación, ya sea de este exón o del gen completo.

SEPT9 se expresa de forma ubicua, aunque se caracteriza por presentar hasta 18 transcritos diferentes (McDade et al., 2007). *SEPT9* es miembro de la familia de las septinas, una familia conservada de GTPasas formadoras de filamentos del citoesqueleto; en humanos hay al menos 13 miembros implicados en diferentes procesos celulares: citocinesis, tráfico de vesículas, dinámica de la actina, regulación de los microtúbulos, exocitosis, establecimiento de la polaridad celular, motilidad celular, e incluso apoptosis (Mostowj and Cossart, 2012).

Aunque no se conoce completamente el proceso por el cual las mutaciones en *SEPT9* causan HNA, se han identificado una serie de mecanismos alterados que podrían estar implicados en la fisiopatología. Las formas mutantes de *SEPT9* portadoras de los cambios no sinónimos, no responden a la señalización vía Rho/Rhotekin, y tienen alterada su interacción con *SEPT4* y *SEPT11* (Sudo et al., 2007). Además, se ha descrito que la mutación *SEPT9* p.R88W, localizada en un motivo de unión a microtúbulos, provoca

efectos adversos sobre la agrupación de los microtúbulos y el crecimiento asimétrico de las neuritas (Bai et al., 2013). Por otro lado, las mutaciones de *SEPT9* que conducen a cambios no sinónimos a nivel de proteína, a nivel de mRNA se localizan en regiones 5'-UTR de otras variantes transcripcionales de *SEPT9*; estas mutaciones provocan que en condiciones de estrés por hipoxia, se produzca un fuerte incremento de la eficiencia de la traducción, dando lugar a niveles alterados de la isoforma v4 (McDade et al., 2007). La duplicación del gen entero identificado en una de las familias sugiere que HNA también puede ser causada por el incremento de dosis de la proteína *SEPT9* normal (Collie et al., 2010).

En una de las series clínicas más extensas de familias HNA, solo se han identificado mutaciones causales en *SEPT9*, incluyendo mutaciones puntuales y duplicaciones, en el 55% de las familias (Collie et al., 2010). De hecho, en las diversas series clínicas, hasta la fecha se ha demostrado que al menos cinco familias HNA no están ligadas al *locus* de *SEPT9*, por lo que se postula la existencia de otros genes implicados en HNA que permanecen desconocidos (van Alfen et al., 2000, Kuhlenbaumer et al., 2001, Watts et al., 2001, Hannibal et al., 2009).

Eritromelalgia Primaria

Se trata de un trastorno neuropático con un patrón de herencia autosómico dominante. Tiene como aspectos clínicos más destacables ataques intermitentes de enrojecimiento, hinchazón, aumento de temperatura y dolor ardiente en las extremidades (Drenth et al., 2005, Waxman and Dib-Hajj, 2005, Drenth et al., 2008). Los pacientes desarrollan síntomas a edades tempranas, en su mayoría dentro de la primera década, aunque en algunos casos el inicio puede estar en la mediana edad. Por lo general, los ataques de dolor y la sensación de quemazón se desencadenan por el calor y el ejercicio, pero en los casos más avanzados, los síntomas pueden progresar a varias crisis al día. Los estudios de la termorregulación del sudor así como los hallazgos histopatológicos, con una reducción en la densidad de los nervios intraepidérmicos, son consistentes en varios de los pacientes, con una neuropatía de fibra fina (Davis et al., 2006a, Davis et al., 2006b).

Los análisis de ligamiento establecieron que el *locus* implicado en eritromelalgia primaria se localizaba en el cromosoma 2q. (Drenth et al., 2001). Posteriormente Yang y colaboradores acotaron la región candidata e identificaron mutaciones en el gen *SCN9A* (2q24) en pacientes con eritromelalgia primaria (Yang et al., 2004). Mutaciones en este mismo gen también son responsables del trastorno con dolor extremo paroxístico (PEPD, acrónimo en inglés; MIM 167400) y del trastorno autosómico recesivo conocido como insensibilidad congénita al dolor (HSAN2D o CIP, acrónimo en inglés; MIM 243000)(Waxman, 2011).

El gen *SCN9A* codifica para la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje tipo IX (*SCN9A* o Nav1.7). Este tipo de canales juegan un papel esencial en la generación y conducción de los potenciales de acción, y por tanto son importantes para la señalización eléctrica para la mayoría de las células excitables. Son proteínas integrales de membrana y están compuestas de un gran subunidad alfa, que forma el poro dependiente de voltaje y selectivo de iones, y una subunidad beta más pequeña que puede modular la cinética y la dependencia de voltaje del canal (Drenth and Waxman, 2007). Existen nueve subunidades alfa diferentes (Nav1.1-Nav1.9), cada una con una distribución tisular y celular particular. *SCN9A* se expresa predominantemente en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y en las de los ganglios simpáticos; además, la proteína *SCN9A* se

encuentran mayoritariamente en las neuronas nociceptivas del DRG, implicadas en la detección y transmisión del dolor (Drenth and Waxman, 2007).

Las mutaciones de ganancia de función en *SCN9A* que hacen que se active más fácilmente el canal provocando un incremento en la señalización del dolor en neuronas del DRG, son las responsables de la eritromelalgia primaria (Dib-Hajj et al., 2005); además, las mutaciones con mayor hiperexcitabilidad correlacionan con una aparición más temprana de los síntomas (Han et al., 2009). Las mutaciones de ganancia de función que interfieren con la inactivación del canal causan PEPD (Fertleman et al., 2006); mientras que la CIP, se debe a mutaciones de pérdida de función, que impiden la formación de un canal funcional (Cox et al., 2006).

El gen *SCN9A* es bastante polimórfico, lo que complica el diagnóstico genético en ciertos casos, sobre todo los esporádicos. De hecho, algunas de las mutaciones descritas con anterioridad se ha visto con el tiempo que corresponden a polimorfismos benignos, algunos relativamente frecuentes (Klein et al., 2013b). Por otro lado, mutaciones en el gen *SCN9A* son responsables de una baja proporción de los casos de eritromelalgia primaria; en 2008, Drenth y colaboradores de entre los 15 casos de eritromelalgia primaria, incluyendo seis casos esporádicos y nueve con antecedentes familiares, identificaron mutaciones en *SCN9A* únicamente en un paciente; se han observado resultados similares en otras series clínicas, por lo que se postula la existencia de otros genes implicados en eritromelalgia primaria (Drenth et al., 2008, Klein et al., 2013b).

Recientemente se han ido descubriendo nuevos genes implicados en neuropatías dolorosas, como *TRPA1* y *NAGLU*, o los genes *SCN10A* y *SCN11A* (Kremeyer et al., 2010, Faber et al., 2012, Zhang et al., 2013, Huang et al., 2014, Tetreault et al., 2015); sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún otro gen implicado en eritromelalgia primaria.

Contamos con dos extensas familias cuyos probandos fueron diagnosticados de neuropatía recurrente hereditaria con una herencia probablemente autosómica dominante: la fCMT-129, remitida por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid, y la fCMT-266, remitida por el Servicio de Neurología del Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia. Las crisis del probando de la fCMT-129, con un fuerte dolor de las extremidades superiores afectadas, se desencadenaron tras la realización de una intensa actividad deportiva; mientras que las crisis en los enfermos de la fCMT-266 pueden aparecer acompañadas de eritromelalgia. Hasta el momento se han descrito únicamente tres genes (*PMP22*, *SEPT9* y *SCN9A*) cuyas mutaciones son responsables de neuropatías recurrentes hereditarias que podrían ser compatibles con las presentes en ambas familias. Tras un exhaustivo estudio genético, previamente se descartaron mutaciones en estos genes como responsables de las neuropatías diagnosticadas en los probandos de las familias fCMT-129 y fCMT-266. La delección de *PMP22* se descartó mediante MLPA (acrónimo del inglés *multiplex ligation-dependent probe amplification*) y posibles mutaciones puntuales en este mismo gen se descartaron mediante secuenciación Sanger. Los *loci* de *SEPT9* y *SCN9A* se descartaron mediante análisis de haplotipo y ligamiento (Anexos 1 y 2). Adicionalmente se analizó mediante secuenciación Sanger el gen *SEPT9* en el probando de la familia fCMT-129 y el gen *SCN9A* en el probando de la familia fCMT-266, como los genes potencialmente candidatos debido a la clínica característica de cada una de las familias. En el probando de la familia fCMT-129 se identificó la variante génica novel NM_001113493.1:c.-125C>T en el gen *SEPT9*. Sin embargo esta mutación no cosegregaba con la enfermedad (Anexo 2).

Con todo, nos encontramos un escenario en el que en ambas familias, diagnosticadas de padecer neuropatías recurrentes hereditarias, habíamos descartado mutaciones en los genes candidatos conocidos hasta la fecha. Dada la baja tasa de éxito en el diagnóstico genético que se consigue en este tipo de neuropatías debido posiblemente al desconocimiento de otros genes implicados, como se ha postulado especialmente en los casos de HNA y de eritromelalgia primaria, es posible que las neuropatías en ambas familias se deban a mutaciones en genes no relacionados hasta la fecha con estas patologías.

2. Hipótesis y objetivos del Capítulo I

Hipótesis

Los pacientes de las familias fCMT-129 y fCMT-266 han sido diagnosticados de padecer neuropatías recurrentes hereditarias. Habiendo descartado en ambas familias los posibles genes candidatos conocidos, se trataría de nuevas formas clínicas debidas a mutaciones en otros genes no relacionados hasta la fecha con este tipo de patologías.

Por ello postulamos que todavía hay genes sin conocer cuyas mutaciones son responsables de neuropatías recurrentes hereditarias, y que contando con dos extensas familias, una aproximación eficaz para identificarlos es mediante cartografiado genómico y análisis de ligamiento.

Objetivos

Identificación de las bases genéticas de dos nuevas formas de neuropatías recurrentes hereditarias mediante cartografiado genómico y estudios de ligamiento genético en dos familias en las que previamente fueron descartadas mutaciones en genes candidatos conocidos.

3. Resultados y línea argumental del Capítulo I

Para permitir una comprensión más clara de los resultados obtenidos en este capítulo, se han separado los resultados procedentes de los estudios genéticos realizados en las dos familias:

3.1 Resultados y línea argumental del estudio en la familia fCMT-129

3.2 Resultados y línea argumental del estudio en la familia fCMT-266

3.1 Familia fCMT129

3.1.1 Identificación de una región candidata de 12,39 Mb en el cromosoma 21

Se llevó a cabo un estudio de cartografiado genómico y un posterior análisis de ligamiento con el fin de identificar regiones candidatas de contener la mutación responsable de la neuropatía presente en la fCMT-129. El análisis reveló tres posibles regiones candidatas con valores LOD (Z) positivos localizadas en los cromosomas 2, 3 y 21. En la Tabla 1 se resumen los marcadores SNPs que delimitan las regiones candidatas, así como sus posiciones genómicas y el tamaño de la región cromosómica que comprenden. En la Figura 1 están representados los valores LOD del análisis de ligamiento multipuntual respecto a la posición que ocupan los marcadores en el cromosoma correspondiente de las regiones candidatas.

Tabla 1. Marcadores SNPs que delimitan las regiones con valores LOD positivos ($\theta = 0,00$). Se indican los valores LOD máximos y el tamaño de las regiones candidatas detectadas.

Cromosoma 2		Cromosoma 3		Cromosoma 21	
SNP	Posición	SNP	Posición	SNP	Posición
rs6742336	176195604	rs4686511	189077907	rs2223078	18431170
rs17755177	187969086	rs1436649	189946318	rs17706342	28845190
Tamaño	11,77 Mb	Tamaño	0,87 Mb	Tamaño	10,41 Mb
Z _{máx}	0,61	Z _{máx}	1,21	Z _{máx}	3,01

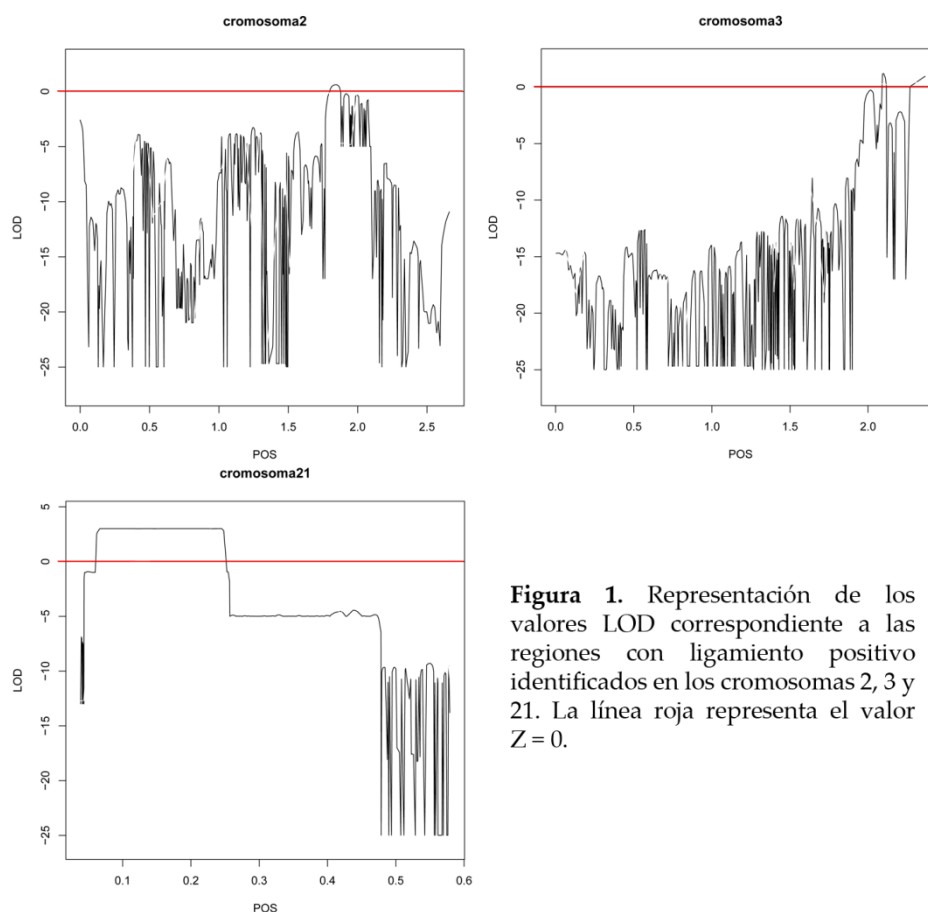


Figura 1. Representación de los valores LOD correspondiente a las regiones con ligamiento positivo identificados en los cromosomas 2, 3 y 21. La línea roja representa el valor $Z = 0$.

Para ahondar en los resultados obtenidos, se realizó un cartografiado fino empleando marcadores microsatélites localizados en las regiones candidatas anteriormente identificadas. El haplotipo construido con los marcadores microsatélites pertenecientes a las regiones candidatas localizadas en los cromosomas 2 y 3 (Tabla M7) no cosegregaba con la enfermedad (Figura 2). Además se descartó la existencia de ligamiento, ya que se obtuvieron valores de $Z = -\infty$ ($\theta = 0,00$) para todos los marcadores microsatélites estudiados para ambos cromosomas. En cambio, el haplotipo correspondiente a los marcadores del cromosoma 21q21 sí que cosegregaba con la enfermedad (Figura 3).

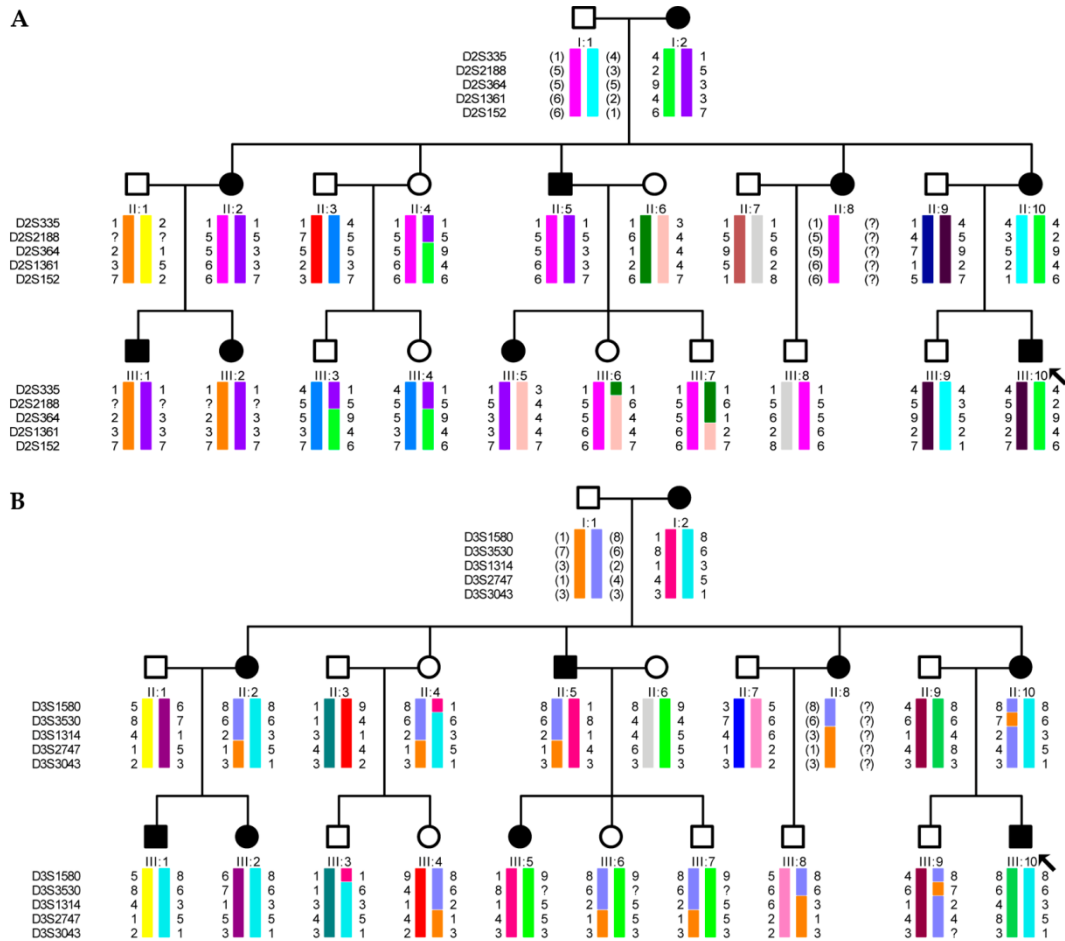


Figura 2. Análisis de haplotipos y de segregación de los marcadores microsatélites de las regiones candidatas de los cromosomas 2 (A) y 3 (B). Genotipos inferidos entre paréntesis.

Los marcadores microsatélites elegidos para el cartografiado del cromosoma 21 se recogen en la Tabla M7. Al confirmarse el ligamiento con la enfermedad ($Z_{\text{máx}} = 3,135$ y $\theta = 0,00$ para los tres marcadores considerados), y con el fin de delimitar la región candidata identificando puntos de recombinación, se incluyeron marcadores microsatélites adicionales (Tabla M8). En la Figura 3 se observa que todos los afectados son portadores del haplotipo representado con la barra de color negro presente en el probando, estando ausente en los individuos sanos, confirmando la cosegregación de este haplotipo con la enfermedad en la familia fCMT-129. Además, se detectaron recombinaciones presentes en los afectados II:5, III:5 y III:10 que permiten delimitar el *locus* responsable a una región de 12,39 Mb acotada por los marcadores *D21S1432* y *D21S1265* (Figura 3). Hasta la fecha no se había relacionado este *locus* del cromosoma 21q21 con neuropatías hereditarias.

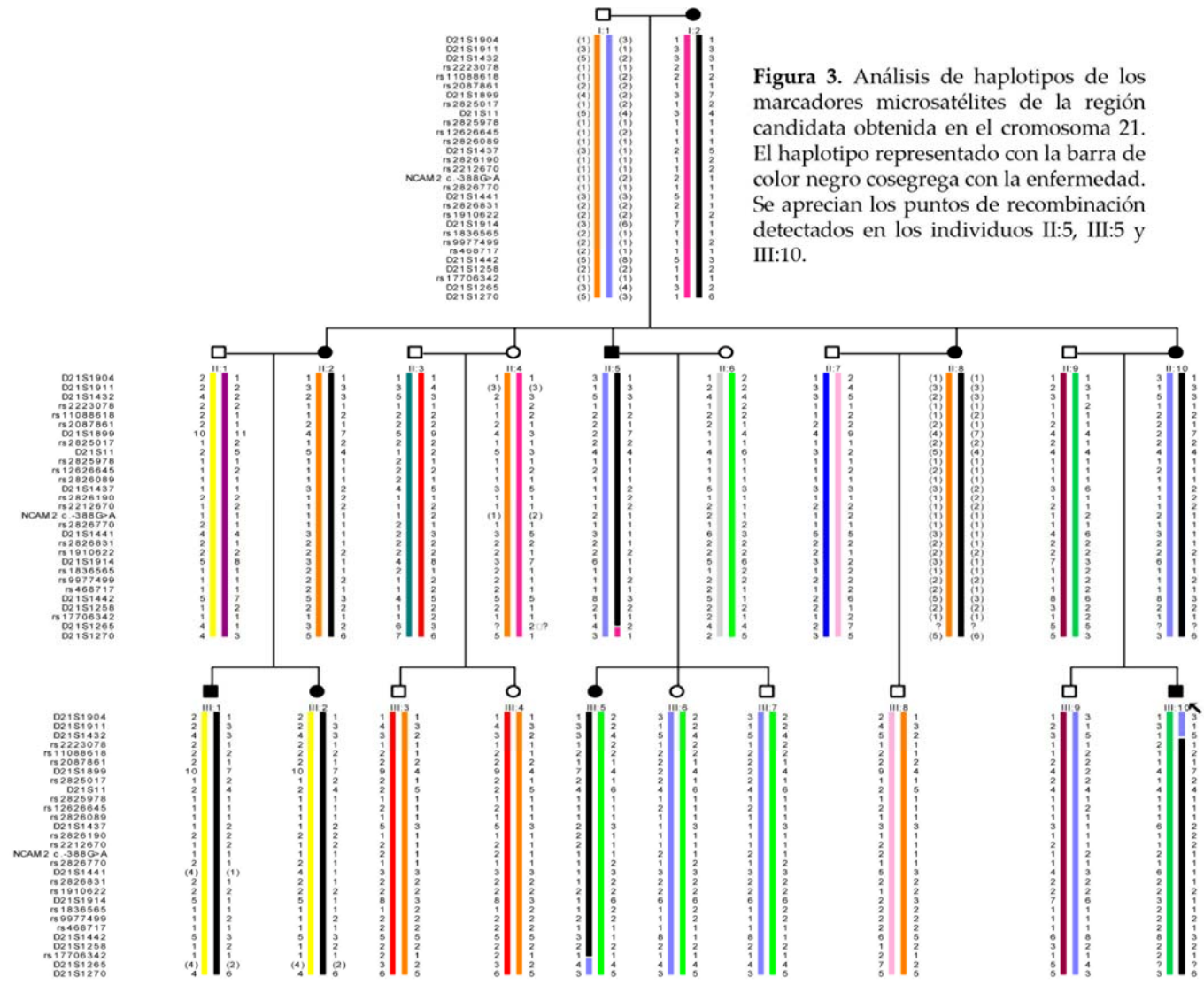


Figura 3. Análisis de haplotipos de los marcadores microsatélites de la región candidata obtenida en el cromosoma 21. El haplotipo representado con la barra de color negro cosegrega con la enfermedad. Se aprecian los puntos de recombinación detectados en los individuos II:5, III:5 y III:10.

3.1.2 Ausencia de mutaciones patológicas en los exones de los genes codificantes de proteínas y miRNAs contenidos en la región candidata del cromosoma 21q21

Combinando la información de las diferentes bases de datos (NCBI y Ensembl), en la región comprendida entre los marcadores *D21S1432* y *D21S1265* se obtienen 146 genes/transcritos, 15 de los cuales son genes codificantes de proteínas. El resto son genes codificantes de diversos tipos de moléculas de RNA, así como posibles transcritos procesados e incluso pseudogenes (Tabla 2).

Tabla 2. Genes contenidos en la región candidata de 12,39 Mb del cromosoma 21.

Tipo de genes	Nº de genes
Genes codificantes de proteínas	15
Otros genes	
lincRNAs	53
miRNAs	9
miscRNAs	6
rRNAs	1
snoRNAs	2
snRNAs	10
Pseudogenes	35
<i>Antisense</i>	6
Transcritos procesados	9
Total	146

La herramienta bioinformática Endeavour reveló que los genes de mayor interés contenidos en la región candidata eran: *ADAMTS1*, *BTG3*, *CHODL*, *GABPA*, *JAM2* y *NCAM2*. La estrategia de priorización de este programa se basa en cómo de similar es un gen candidato respecto a un perfil (función, secuencia, expresión, interacciones,...) obtenido a partir de genes que ya se conocen que están implicados en el proceso en estudio, en este caso, respecto al perfil de los genes implicados en neuropatías recurrentes hereditarias (*PMP22*, *SEPT9* y *SCN9A*). Además, en tanto que se trata de una neuropatía que afecta al sistema nervioso periférico, mediante la herramienta Biomart se priorizaron los genes que se expresan en éste: *ADAMTS1*, *APP*, *ATP5J*, *BTG3*, *C21orf91*, *GABPA*, *JAM2*, *MRPL39* y *NCAM2*. Combinando estas dos aproximaciones, se seleccionaron los genes *ADAMTS1*, *BTG3*, *JAM2*, *NCAM2* y *GABPA* como potencialmente candidatos. La secuenciación de las regiones exónicas de dichos genes no reveló cambios que pudieran ser patológicos, por lo que se continuaron secuenciando los diferentes genes hasta completar el listado de todos los genes codificantes de proteínas y de miRNAs contenidos en la región candidata (Tabla M9). Además de los nueve genes codificantes de miRNA de la Tabla 2, se estudiaron otros dos genes adicionales contenidos en miRBase.

Se identificaron 71 cambios al secuenciar los exones y las regiones intrónicas flanqueantes de todos los genes codificantes de proteínas (15) y de miRNAs (11) en afectados de la familia fCMT-129 (Tabla 3). Sin embargo, se descartó que pudieran ser patológicos debido a que son polimorfismos benignos validados en la base de datos dbSNP de NCBI con una MAF>0,1, porque se han detectado en nuestra población control y/o porque no cosegregan con la enfermedad en la familia.

Tabla 3. Variantes identificadas en la secuenciación de los genes codificantes para proteínas y miRNAs de la región del cromosoma 21.

Gen	dbSNP	Posición genómica en Cr.21 ^a	MAF
<i>ADAMTS1</i>	rs416905	g.28217446A>G	A=0.337
	rs402007	g.28217320C>G	C=0.337
	rs434857	g.28217178T>G	T=0.338
	rs445784	g.28216692G>T	G=0.348
	rs409630	g.28216674G>C	C=0.168
	rs428785	g.28216595C>G	C=0.338
	rs436525	g.28212760G>A	G=0.435
	rs56251528	g.28210854C>T	T=0.061
	rs370850	g.28216066C>T	C=0.339
	rs422803	g.28216038C>A	C=0.338
	rs58586842/rs417301	g.28215987T>C	T=0.34
	rs57269482/rs3838077	g.28215837delC	-=0.34
	rs3838076	g.28215827_28215828insACA	-=0.368
	rs400852	g.28216059A>G	G=0.213
<i>ADAMTS5</i>	rs55933916	g.28338423C>G	G=0.111
	rs226794	g.28302355A>G	A=0.224
	rs151065	g.28296324A>G	A=0.228
<i>APP</i>	rs11299404	g.27543243delC ^b	C=0.006
	rs3737415	g.27348460T>G	G=0.427
	rs3737414	g.27348447A>G	G=0.284
	rs3737413	g.27348372A>G	G=0.284
<i>ATP5j</i>	rs3216073	g.27101900delT	-=0.302
	rs73161764	g.27097053G>T	T=0.231
<i>BTG3</i>	rs3833345	g.18966726_18966729delCAAA	NA ^c
<i>C21orf91</i>	rs9653741	g.19191735T>C	T=0.249
	rs243556	g.19190427C>T	C=0.133
	rs1047978	g.19169155G>C	C=0.300
	rs2824493	g.19165942C>T	T=0.293
<i>CHODL</i>	rs66495770	g.19628810dupT	NA ^c
<i>CXADR</i>	rs211964	g.18885546C>G	G=0.135
<i>CYYR1</i>	rs966410	g.27852724A>G	G=0.426
<i>GABPA</i>	rs17001334	g.27106656A>G	G=0.154
	rs66996867	g.27124132G>T	T=0.175
	rs35919477	g.27137244delT	NA ^c
	rs56048433	g.27141277_27141278insATT	-=0.164
	rs7276647	g.27141292A>G	G=0.176
<i>JAM2</i>	rs8133602	g.27056250A>G	G=0.144
	rs8134513	g.27086916C>A	A=0.192
<i>MRPL39</i>	rs3989369	g.26978950A>G	A=0.086

Gen	dbSNP	Posición genómica en Cr.21 ^a	MAF
	rs725493	g.26975995G>A	G= 0.239
	rs140202502	g.26973663_26973664insTATACT	= 0.24
	rs1135618	g.26969703T>C	T= 0.238
	rs13048408	g.26966317A>G	G= 0.452
	rs1057885	g.26965205T>C	T= 0.239
	rs1135638	g.26965148G>A	G= 0.239
	rs2829809	g.26965100C>A	C= 0.355
	rs2829807	g.26961086T>C	C= 0.471
	rs2829806	g.26960189T>G	G= 0.471
NCAM2	rs7510540	g.22370494A>G	G= 0.425
	rs34246223	g.22656410delT	NA ^c
	rs111713483	g.22658545_22658551delTTTGTGA	TTTGTGA= 0.19
	rs232467	g.22696837C>G	C= 0.367
	rs232518	g.2274618T>C	C= 0.398
	rs2826833	g.22804674C>T	T= 0.463
	rs762441	g.2283914G>C	C= 0.412
	rs762442	g.22839295T>C	C= 0.440
	rs898397	g.22839306T>C	C= 0.398
	rs2250501	g.22840930A>C	C= 0.412
	rs2250508	g.22841123G>A	A= 0.412
	rs2017705	g.22881251A>G	G= 0.152
PRSS7	rs2824803	g.19770117T>C	C= 0.297
	rs2824751	g.19713821C>T	T= 0.170
	rs2824721	g.19670118G>A	G= 0.297
	rs1540000	g.19666901T>A	A= 0.248
	rs4395327	g.19666530T>C	T= 0.275
	rs6517807	g.19666526C>T	C= 0.298
	rs59972471	g.19651242_19651243delTT	NA ^c
C21orf37	rs208893	g.18814243T>C	T= 0.449
	rs5842640	g.18814247_1881424insT	NA ^c
hsa-mir-548x	rs6517825	g.20058298C>T	C= 0.023
hsa-mir-4759	rs233894	g.28326276G>A	G= 0.14

MAF: *Minor allele frequency*, NA: *Non available*. ^aNCBI GRCh37.p13. ^bEl probando porta esta delección en homocigosis. ^cSNPs validados sin MAF anotada en bases de datos públicas; estos polimorfismos fueron detectados en nuestra población control, y por lo tanto, fueron descartados como variantes patológicas.

3.1.3 Ausencia de deleciones y/o duplicaciones patológicas en la región candidata del cromosoma 21q21

Habiendo descartado la presencia de mutaciones patológicas en los exones de los genes codificantes de proteínas y miRNAs, llevamos a cabo un estudio de hibridación genómica comparada (CGH, acrónimo en inglés) con el fin de identificar posibles deleciones y/o

duplicaciones en la región candidata. El estudio se llevó a cabo a partir de gDNA procedente de cuatro individuos de la fCMT-129: dos enfermos (II:5 y III:5) y dos sanos (II:6 y III:6), para poder analizar la segregación. El estudio no reveló la presencia de deleciones y/o duplicaciones en dicha región (Figura 4).

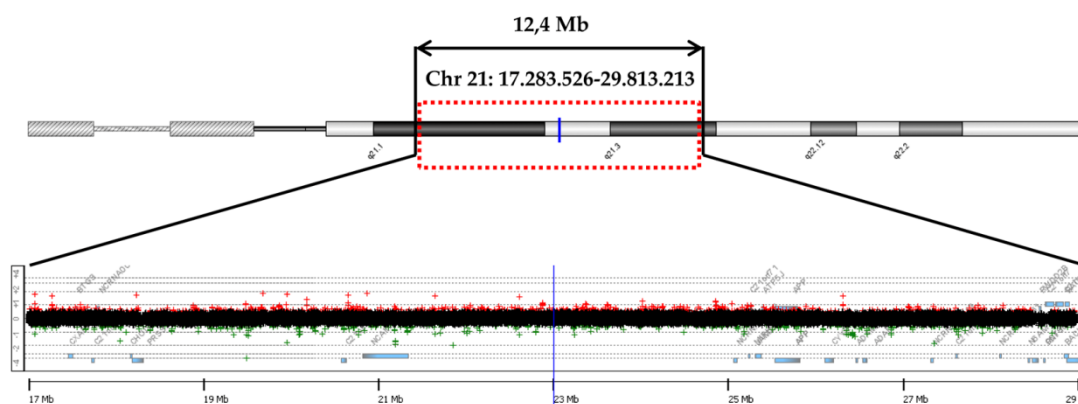


Figura 4. Búsqueda de deleciones y/o duplicaciones genómicas mediante CGH. El estudio de CGH se realizó en DNAs de los individuos II:5, II:6, III:5 y III:6 de la familia fCMT-129, pertenecientes al mismo núcleo familiar para poder estudiar la segregación de posibles deleciones/inserciones. La imagen corresponde a los resultados obtenidos con el DNA del paciente III:5. En la parte superior se señala la región candidata estudiada en el cromosoma 21.

Hasta el momento se han descrito únicamente tres genes responsables de neuropatías recurrentes hereditarias que presentan un patrón de herencia autosómico dominante (*PMP22*, *SEPT9* y *SCN9A*). Estos genes fueron descartados como posibles responsables de la neuropatía diagnosticada en el probando de la familia fCMT-129. El conocimiento de la función de estos genes, podría permitir el planteamiento *a priori* de una serie de candidatos posicionales de acuerdo a una posible relación funcional con alguno de estos genes ya descritos. El gen *PMP22* codifica para una proteína integral de membrana que es el componente principal de la mielina en el sistema nervioso periférico (Jetten and Suter, 2000). *SEPT9* es miembro de la familia de las septinas implicadas en diferentes funciones celulares entre las que destaca su relevancia en el citoesqueleto (Mostowy and Cossart, 2012). *SCN9A* codifica para un canal de sodio dependiente de voltaje, con un papel importante en la señalización de la nocicepción (Cummins et al., 2007, Drenth and Waxman, 2007). Partiendo de la base de esta información, de los genes codificantes de proteínas conocidos contenidos en la región crítica del cromosoma 21q21 (Tabla M9), ninguno tiene una relación funcional evidente con *PMP22*, *SEPT9* o *SCN9A*. Sin embargo, en el *locus* identificado hay genes con funciones relevantes en el sistema nervioso u otras funciones que pueden permitir considerarlos como potenciales candidatos posicionales. Cabe mencionar los genes *NCAM2*, *CHODL*, *APP* y *GABPA*.

NCAM2 forma parte de la familia de las NCAM (*neural cell adhesion molecules*), que están implicadas en importantes procesos celulares como migración neuronal, supervivencia celular, crecimiento de las neuritas, así como en la formación y plasticidad de las sinapsis (Nielsen et al., 2009). En ratón, *Ncam2* se expresa de forma casi exclusiva en tejido neuronal, predominantemente en el sistema sensorial olfativo (Alenius and Bohm, 1997, Yoshihara et al., 1997). *NCAM2* interviene modulando el crecimiento de neuritas, la guía axonal, la formación sináptica en el sistema olfativo y la formación de haces dendríticos en el cerebro (Ichinohe et al., 2003, Hamlin et al., 2004). En ratones deficientes del gen *Ncam2*, se produce una alteración de la organización compartimental de axones y dendritas en el glomérulo olfatorio. Recientemente, estudiando el desarrollo de la médula

espinal en ratones *knock-out* de *Ncam2*, se ha demostrado que *Ncam2* regula la proliferación de células madre neuronales de la médula espinal, modulando a nivel post-transcripcional el receptor ErbB2 (Deleyrolle et al., 2015). ErbB2 tiene un papel fundamental en la biología del nervio periférico, y de hecho, alteraciones en la ruta de señalización de Neuregulin-1/ErbB pueden conllevar defectos en el sistema nervioso periférico (Woldeyesus et al., 1999, Newbern and Birchmeier, 2010, Gouttenoire et al., 2013). En mamíferos, los transcritos de *NCAM2* se han encontrado en muchos otros tejidos diferentes del cerebro (Paoloni-Giacobino et al., 1997), incluyendo el sistema nervioso periférico (Reymond et al., 2002). Se ha relacionado a *NCAM2* en varias enfermedades neurológicas. Aunque *NCAM2* se encuentra fuera de la región genómica denominada región crítica del Síndrome de Down (SD) del cromosoma 21 se ha propuesto a *NCAM2* como uno de los genes candidatos implicados en el desarrollo de SD; el aumento de expresión de *NCAM2* como resultado de la trisomía del cromosoma 21 incrementaría su dosis y podría tener efectos perjudiciales en el desarrollo (Paoloni-Giacobino et al., 1997, Makino and McLysaght, 2010, Winther et al., 2012). Mediante estudios de asociación se ha propuesto este gen como candidato para el desarrollo de autismo o de la enfermedad de Alzheimer (Han et al., 2010, Hussman et al., 2011). Recientemente se han identificado deleciones que incluyen el gen *NCAM2* en pacientes con defectos en el neurodesarrollo (Petit et al., 2015).

APP es una proteína transmembrana que está ampliamente expresada en tejidos tanto en desarrollo como en tejidos adultos (Lorent et al., 1995). Aunque el papel de APP en neuropatologías humanas ha sido bien estudiado, su papel fisiológico no es muy conocido, si bien, parece estar implicado en el crecimiento de las neuritas, la adhesión neuronal y la axonogénesis (Thinakaran and Koo, 2008). APP es conocido como el precursor de los péptidos beta-amiloides implicados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Hay pocos datos que tengan en cuenta el papel de APP en el sistema nervioso periférico. APP se expresa en axones sensitivos y motores (Nikolaev et al., 2009, Caldwell et al., 2013). Después de una lesión en nervio periférico, APP aumenta su expresión en DRG, y tras la reinervación, la expresión de APP vuelve a su nivel basal (Scott et al., 1991). Se ha demostrado que la sobreexpresión de APP previene el dolor neuropático y la muerte de motoneuronas después de una lesión en nervio periférico en ratones (Kotulska et al., 2010). Estos resultados sugieren que APP podría desempeñar una función reparadora en el sistema nervioso periférico.

GABP es un factor de transcripción ubicuo implicado en la regulación transcripcional de genes que codifican proteínas involucradas en una variedad de procesos celulares, como la diferenciación de adipocitos, la respiración mitocondrial, y la señalización neuromuscular (Patton et al., 2006). También se le conoce como NRF2 (*Nuclear respiratory factor 2*). Es un complejo formado por dos subunidades (alfa y beta) (LaMarco et al., 1991). La subunidad alfa, codificada por el gen *GABPA* (*NRF2A*), contiene el dominio ETS de unión al motivo 5'-GGAA-3' en el DNA. Se ha visto que GABP *in vitro* es capaz de regular la expresión de proteínas neuromusculares como la utrofina, la acetilcolina esterasa y las subunidades δ y ϵ (AChR ϵ) del receptor de acetilcolina a través del motivo N-box (5'-CCGGAA-3') del promotor, aunque su función *in vivo* aún no es muy conocida (Duclert et al., 1996, Chan et al., 1999, Khurana et al., 1999). En pacientes que sufren síndrome miasténico congénito postsináptico (CMS, acrónimo en inglés; MIM 608931), se han identificado mutaciones en el N-box del gen que codifica la AChR ϵ implicando a GABP en una función neuromuscular (Nichols et al., 1999, Ohno et al., 1999). La eliminación de *Gabpa* en ratones provoca letalidad embrionaria (Ristevski et al., 2004). El estudio de

ratones *knock-out* condicionales indicaron que la expresión de *Gabpa* en el músculo esquelético no es esencial para la formación de fibras musculares, el crecimiento de axones de motoneuronas hacia el músculo, ni para la formación de los AchRs postsinápticos (Jaworski et al., 2007, O'Leary et al., 2007); sin embargo, la pérdida de expresión de *Gabpa* da lugar a alteraciones en la morfología y función de las uniones neuromusculares en músculo esquelético (O'Leary et al., 2007). NRF1 junto con NRF2 (GABP), son responsables de la expresión de genes nucleares que rigen la función respiratoria mitocondrial, también en neuronas (Ongwijitwat and Wong-Riley, 2005, Scarpulla, 2008). De hecho, NRF2 acopla la actividad neuronal y el metabolismo energético mediante la co-regulación transcripcional de todas las subunidades de la citocromo c oxidasa (COX), una enzima clave en la generación de energía (Priya et al., 2014). En pacientes con esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante inflamatoria que provoca la neurodegeneración del CNS, se ha demostrado la implicación de la desregulación de este factor en la fisiopatología, produciendo una disminución en la expresión de los genes que codifican las subunidades de la cadena de transporte de electrones (Pandit et al., 2009)

Uno de los candidatos posicionales más interesantes es el gen *CHODL*. Este gen codifica la proteína condrolectina, una lectina de tipo C sin una función definida. Sin embargo, se ha suscitado un gran interés sobre este gen debido a que tanto sus niveles de expresión como su *splicing* se ven afectados en modelos de atrofia muscular espinal (SMA, acrónimo en inglés; MIM 253300) (Baumer et al., 2009); SMA se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas motoras espinales debido a la reducción de los niveles de proteína SMN (*survival motor neuron*), como consecuencia de mutaciones en el gen *SMN1*. Estudios recientes han demostrado la importancia que tiene *CHODL* *in vivo* para el crecimiento de axones motores, y además, se ha visto que afecta tanto a la supervivencia celular como al crecimiento neuronal en modelos *in vitro* e *in vivo* de SMA (Zhong et al., 2012, Sleight et al., 2014). De hecho, la sobreexpresión de *Chodl* rescata los defectos en el crecimiento de neuronas motoras en modelos de SMA en pez zebra (Sleight et al., 2014). La vinculación de la desregulación de *CHODL* en la fisiopatología de la degeneración de neuronas motoras en SMA hace que este gen sea un candidato prometedor a estar implicado en otras enfermedades neurológicas.

En los pacientes de la fCMT-129, la secuenciación de las regiones exónicas de los genes potencialmente candidatos, así como del resto de genes que se expresan en el sistema nervioso periférico, revelaron gran cantidad de cambios descritos como polimorfismos, pero no se detectó ningún cambio potencialmente patológico. La secuenciación del resto de genes codificantes de proteínas dio lugar a los mismos resultados. Tampoco se identificaron mutaciones en los genes codificantes de miRNAs contenidos en la región candidata. Se analizaron un total de 26 genes codificantes: 15 genes codificantes de proteínas, y 11 genes codificantes de miRNA.

Recientemente se han superado las 100.000 mutaciones responsables de enfermedades hereditarias encontradas en 3.700 genes diferentes incluidas en la Base de Datos de Mutaciones en Genes Humanos (HGMD, acrónimo en inglés). La gran mayoría de éstas corresponden a mutaciones en regiones codificantes (86%), mientras que el resto se localizan en secuencias intrónicas (11%) o reguladoras (3%, promotor, secuencias no traducidas o regiones flanqueantes) (Cooper et al., 2010). Es por ello que, a pesar de que se han descartado las regiones codificantes de los genes estudiados en la región candidata, la mutación responsable de la neuropatía podría encontrarse en regiones intrónicas profundas, por ejemplo en ISEs (*intronic splicing enhancers*) o en ISSs (*intronic splicing*

silencers), que afectasen al procesamiento de los intrones; o en secuencias reguladoras, ya sean en los propios promotores o incluso en *enhancers* o en silenciadores, que pueden ser susceptibles de cambios patogénicos. Dathe y colaboradores describieron una microduplicación de 5,5 Kb que contiene una secuencia no codificante conservada y con función *enhancer* demostrada, a 110 Kb del gen *BMP2*, que causa braquidactilia tipo 2A (MIM 112600) (Dathe et al., 2009).

Las CNVs (*copy number variations*), también pueden ser responsables de patologías (Beckmann et al., 2008, Cooper et al., 2010, Fanciulli et al., 2010, Lee and Scherer, 2010). Son ejemplo de ello los casos ya mencionados anteriormente de la duplicación o la delección de la región de 1,4 Mb de la región cromosómica 17p11.2-12 que incluye al gen *PMP22*, responsable de CMT1A (Raeymaekers et al., 1991) o HNPP (Chance et al., 1993), respectivamente. Sin embargo, se descartó la existencia de delecciones/duplicaciones en la región candidata del cromosoma 21q21 mediante CGH.

Cabría destacar también que a pesar de que en la región hay relativamente pocos genes codificantes de proteínas, hay gran cantidad de genes que se expresan y que dan lugar a un producto no codificante, o que al menos no es codificante de un producto que pueda tener una función conocida. Se conoce relativamente poco acerca de mutaciones en genes no codificantes de proteínas. Se ha descrito en un gen con impronta (*GNAS*) que da lugar a un transcrito antisentido del *locus GNAS*, una presunta delección patogénica que causa pseudohipoparatiroidismo tipo 1B (MIM 603233) (Bastepe et al., 2005). Incluso se han identificado mutaciones capaces de reactivar al pseudogén *CRYGEP1* asociadas con la formación de cataratas hereditarias tipo Coppock (MIM 604307) (Brakenhoff et al., 1994, Plotnikova et al., 2007).

Atendiendo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, las siguientes aproximaciones dirigidas hacia la identificación de la mutación responsable de la neuropatía diagnosticada en el probando de la familia fCMT-129, deberían centrarse en recurrir a una estrategia de secuenciación masiva que cubra toda la región, con el objetivo de poder estudiar las regiones intrónicas profundas y los genes no codificantes anotados en la región, que de otra forma sería casi inabordable.

En conclusión, el estudio genético realizado ha permitido acotar una región de 12,39 Mb en el cromosoma 21q21 que contendría el *locus* responsable de una nueva forma clínica de neuropatía recurrente hereditaria, y el cribado mutacional ha posibilitado descartar mutaciones en las secuencias estudiadas de todos los genes codificantes de proteínas y miRNAs contenidos en dicha región, así como la presencia de delecciones y/o duplicaciones.

3.2 Familia fCMT-266

3.2.1 Búsqueda de la mutación responsable de la neuropatía en la fCMT-266

3.2.1.1 Identificación de una región candidata en el cromosoma 17

Se llevó a cabo un estudio de cartografiado genómico y un posterior análisis de ligamiento con el fin de identificar regiones candidatas de contener la mutación responsable de la neuropatía presente en la fCMT-266. La Tabla 4 recoge todas las regiones con valores LOD (Z) > 2 identificadas en el estudio. De entre los resultados destaca la región candidata localizada en el cromosoma 17, en la que varios SNPs consecutivos alcanzan valores Z de 3,01 (Figura 5A) y que es la única región con un pico definido. Un segundo análisis mediante análisis de ligamiento no paramétrico (menos potente pero más permisivo con posibles errores en el estatus de algún individuo) llevado a cabo en colaboración con el Dr. C. Rivolta (Department of Medical Genetics, University of Lausanne, Suiza), no reveló otras posibles regiones candidatas.

Tabla 4. Regiones con valores Z > 2 obtenidas en el análisis de ligamiento de la familia fCMT-266.

Z _{máx}	SNPs flanqueantes	Región (UCSC Hg19)	Tamaño (pb)	Genes en la región (UCSC)
2,31	rs1892543-rs2383626	chr1:187434767-187456405	21.639	No genes anotados
2,16	rs1327077 (único)*	chr1:199345057-199345057	*	No genes anotados
2,68	rs10738555-rs6475390	chr9:19925073-20005757	80.685	No genes anotados
3,01	rs2787702 (único)*	chr10:63307475-63307475	*	No genes anotados
2,07	rs4617924 (único)*	chr17:114669-114669	*	RPH3AL
3,01	rs902966-rs7223663	chr17:1233635-1587639	354.005	YWHAE, CRK, MYO1C, INPP5K, PITPNA, SLC43A2, SCARF1, RILP, PRPF8
2,79	rs8067685-rs7359575	chr17:1707762-1874153	166.392	SMYD4, RPA, RTN4RL1
2,27	rs8080237 (único)*	chr17:2719341-2719341	*	RAP1GAP2
2,90	rs9303170-rs2318030	chr17:3210368-3285752	75.385	Pseudogén (OR3A4P)
2,18	rs16973309-rs9889534	chr17:66795479-66808389	12.911	No genes anotados
2,45	rs2825882-rs2212530	chr21:21283010-21293970	10.961	No genes anotados

*En el caso de las regiones debidas a un único SNP, se buscaron posibles genes localizados cerca (50 Kb alrededor). En un análisis posterior se confirmó que las regiones señaladas en gris corresponden a una única región candidata, flanqueada por los marcadores rs902966-rs7359575.

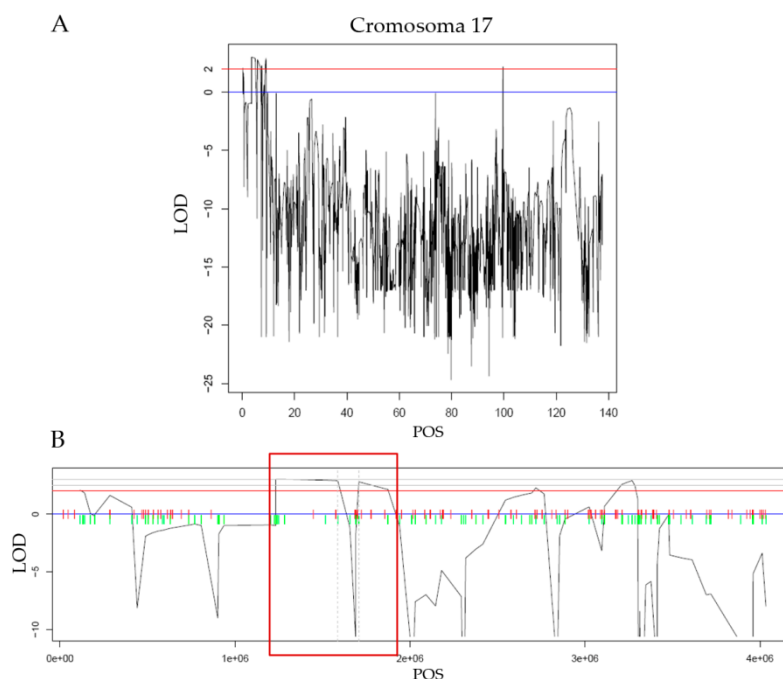


Figura 5. Región candidata del cromosoma 17 en la familia fCMT-266. (A) Representación de los valores LOD correspondiente al ligamiento positivo identificado en el cromosoma 17 en la familia fCMT-266. (B) Representación detallada de la región candidata del cromosoma 17. En rojo se encuadra el pico de interés donde se observan caídas puntuales del valor LOD.

Una visualización detallada de la región candidata identificada en el cromosoma 17 (Figura 5B) permite identificar caídas puntuales de los valores LOD debido a tres SNPs (rs8074026, rs729873 y rs17821469). El análisis de estos marcadores mediante secuenciación de Sanger en los miembros de la familia fCMT-266 permitió determinar que estas caídas se debían a errores de genotipado. Tras su corrección, se confirmó ligamiento positivo para una región continua de 640 Kb del cromosoma 17 (17p13.3) comprendida entre los marcadores rs902966-rs7359575 (chr17:1233635-1874153; hg19), alcanzándose valores máximos de Z de 3,01. El análisis del haplotipo construido con SNPs de la región delimitada en el cromosoma 17 reveló que la enfermedad cosegrega con éste (Figura 6). Todos los afectados son portadores del haplotipo representado con la barra de color negro presente en la probando, estando ausente en los individuos sanos.

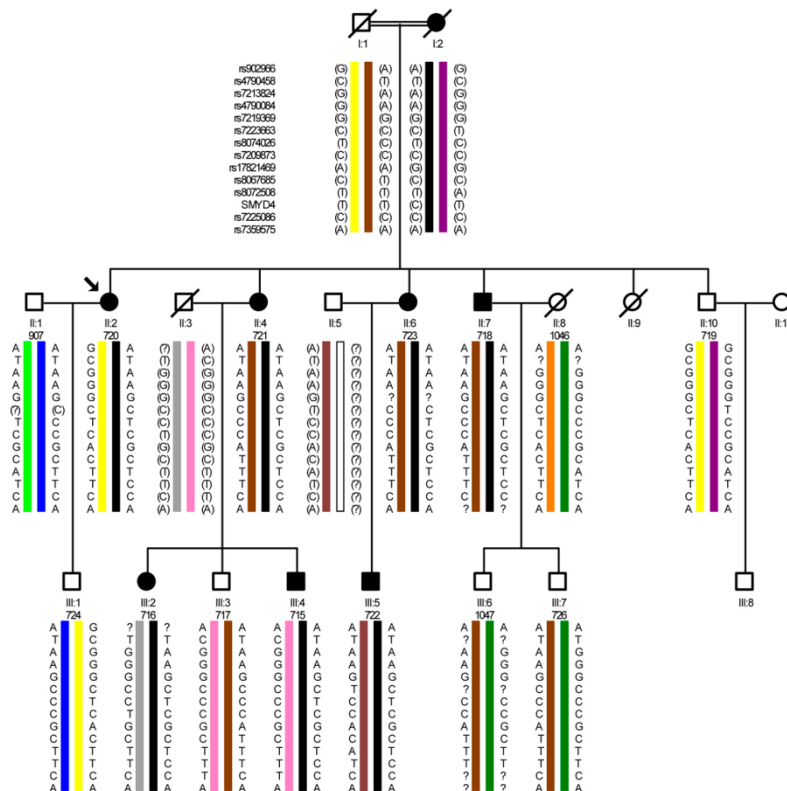


Figura 6. Análisis de haplotipos y de segregación de los SNPs de la región candidata del cromosoma 17 en la familia fCMT-266. Los genotipos inferidos se muestran entre paréntesis.

3.2.1.2 Identificación de mutaciones candidatas mediante secuenciación de exoma en pacientes de la fCMT-266

La secuenciación del exoma de cuatro pacientes de la fCMT-266 (individuos II:2, II:7, III:2 y III5) dio lugar a la identificación de más de 240.000 variantes nucleotídicas en cada paciente, de las que alrededor de 47.000 son comunes en los cuatro pacientes (Tabla 5). En el Anexo 3 se recogen los datos correspondientes a la cobertura y otros parámetros obtenidos en la secuenciación de exoma.

Tabla 5. Variantes identificadas mediante secuenciación de exoma en pacientes de la fCMT-266.

	II:2	II:7	III:2	III:5	Comunes
3'UTR*	4672	5444	5555	4931	1079
5'UTR*	2361	2826	2851	2513	596
Inserciones/delecciones complejas	13	17	16	12	0
<i>Downstream</i>	25881	31774	32067	28060	5669
Sitios esenciales de <i>splicing</i>	128	170	145	172	42
<i>Frameshift</i> en regiones codificantes	282	326	351	313	83
Intergénicas	2238	3113	2609	2300	598
Intrónicas	75943	92948	92944	80164	14525
Transcrito NMD**	7842	8907	9513	8454	1708
Variante no sinónima	19274	20859	21613	20560	5311
Codón parcial	3	1	2	2	0
Regiones reguladoras	498	718	595	538	108
Sitios de <i>splicing</i>	5127	5762	5906	5364	1298
Ganancia de codón de parada	143	178	132	152	42
Pérdida de codón de parada	33	43	32	38	19
Variante sinónima	21124	23536	24494	23312	5362
<i>Upstream</i>	18467	22756	22493	19955	4082
miRNA maduro	5	7	7	3	2
En gen no codificante	29591	35562	36136	30685	6412
Total	213625	254947	257461	227528	46936

*UTR= *untranslated region*; **NMD= *nonsense mediated decay*.

Si nos centramos únicamente en aquellas variantes localizadas en regiones codificantes, correspondientes a SNVs (*single nucleotide variants*) y pequeñas indels, y que no sean polimorfismos descritos en las bases de datos (dbSNP, 1000G, CNAG), se siguen obteniendo cientos de variantes comunes en los cuatro pacientes (Tabla 6).

Tabla 6. Número de variantes SNVs y pequeñas indels identificadas en regiones codificantes. Se indica si están en heterocigosis (Het) o en homocigosis (Hom) en cada individuo. Se indica el número de estas variantes que son comunes en los cuatro individuos estudiados.

	Variantes	SNVs	Indels pequeñas	Ausente en dbSNP, 1000G, CNAG
II:2 (het)	24302	21631 (89%)	2671(11%)	1753(7%)
II:2 (hom)	16651	15080 (91%)	1571(9%)	363(2%)
II:7 (het)	29165	25943 (89%)	3222(11%)	2455(8%)
II:7 (hom)	20237	18265 (90%)	1972(10%)	480(2%)
III:2 (het)	29819	26634 (89%)	3185 (11%)	2202 (7%)
III:2 (hom)	19143	17232 (90%)	1911(10%)	381(2%)
III:5 (het)	26468	23779 (90%)	2689(10%)	1902(7%)
III:5 (hom)	16826	15300 (91%)	1526(9%)	308(2%)
Het comunes	2837	2719 (96%)	118(4%)	125(4%)
Hom comunes	6411	5945 (93%)	466(7%)	56(1%)

En la Tabla 7 se recogen las variantes candidatas seleccionadas obtenidas a partir de los análisis bioinformáticos del CNAG y del BIER, obtenidos de forma independiente. El resultado de cruzar la información de estas variantes con los genes localizados en regiones candidatas de acuerdo a los datos de ligamiento (Tabla 4) se muestran en la Figura 7A.

Tabla 7. Variantes candidatas seleccionadas a partir de los análisis del CNAG y del BIER a partir de los datos de exoma de la familia fCMT-266.

CNAG			
Posición genómica	Cambio	Gen	Efecto
1:38425921-38425921	T/C	<i>SF3A3</i>	SNV no sinónimo
1:55183366-55183366	C/A	<i>TTC4</i>	SNV no sinónimo
1:79095370-79095370	T/G	<i>IFI44L</i>	SNV no sinónimo
1:155886568-155886568	A/C	<i>KIAA0907</i>	SNV no sinónimo
2:11735466-11735466	G/A	<i>GREB1</i>	SNV no sinónimo
2:20132182-20132182	T/G	<i>WDR35</i>	SNV no sinónimo
3:49020756-49020756	G/C	<i>ARIH2</i>	SNV no sinónimo
5:108719205-108719205	C/A	<i>PJA2</i>	SNV no sinónimo
8:18656768-18656768	C/G	<i>PSD3</i>	SNV no sinónimo
9:35809551-35809551	A/C	<i>NPR2</i>	SNV no sinónimo
10:96112756-96112756	A/C	<i>NOC3L</i>	SNV no sinónimo
11:10823550-10823550	G/A	<i>EIF4G2</i>	SNV no sinónimo
11:120349051-120349051	A/C	<i>ARHGEF12</i>	SNV no sinónimo
12:112516511-112516511	G/A	<i>NAA25</i>	SNV no sinónimo
16:105391-105391	G/T	<i>SNRNP25</i>	SNV no sinónimo
17:1715300-1715300	T/C	<i>SMYD4</i>	SNV no sinónimo
19:815835-815835	G/A	<i>MIR3187</i>	SNV no sinónimo
19:52023268-52023268	C/G	<i>SIGLEC6</i>	SNV no sinónimo

BIER			
Posición genómica	Cambio	Gene	Efecto
1:15894328-15894328	G/A	<i>DNAJC16</i>	SNV no sinónimo
2:20132182-20132182	T/G	<i>WDR35</i>	SNV no sinónimo
2:187505669-187505669	G/C	<i>ITGAV</i>	SNV no sinónimo
3:164907744-164907744	C/T	<i>SLITRK3</i>	SNV no sinónimo
10:61829520-61829520	C/G	<i>ANK3</i>	SNV no sinónimo
14:36207766-36207766	C/T	<i>RALGAPA1</i>	SNV no sinónimo
17:1715300-1715300	T/C	<i>SMYD4</i>	SNV no sinónimo
17:48736616-48736616	C/A	<i>ABCC3</i>	SNV ganancia STOP
20:2575506-2575506	C/A	<i>TMC2</i>	SNV ganancia STOP

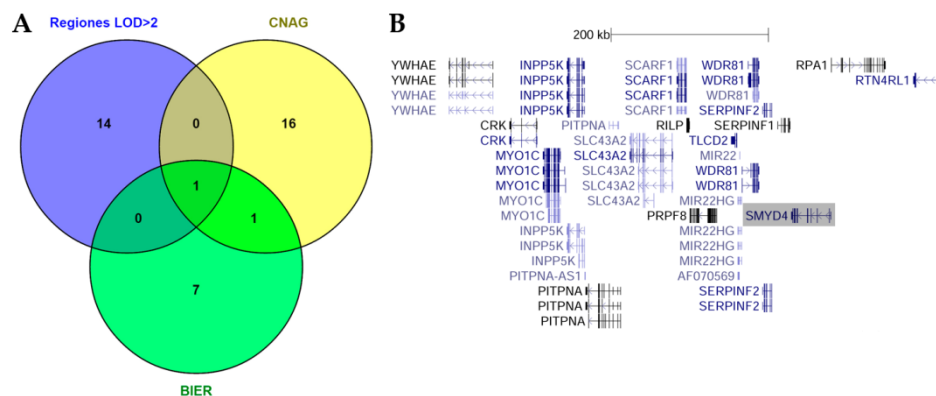


Figura 7. Variantes candidatas identificadas en la familia fCMT-266. (A) Diagrama de intersección de las variantes candidatas identificadas mediante secuenciación de exoma y procesamiento mediante dos

plataformas bioinformáticas (CNAG y BIER) con los genes localizados en regiones con ligamiento positivo. (B) Región candidata del cromosoma 17 que incluye el gen *SMYD4* (señalado en gris).

Sólo una única variante identificada mediante secuenciación de exoma está localizada dentro de una de las regiones con ligamiento positivo, y que precisamente está incluida en la región del cromosoma 17 (Figura 7B), señalada anteriormente como principal candidata. La variante identificada se localiza en la posición genómica chr17:1715300-1715300 (Hg19) y provoca el cambio nucleotídico T>C. Se trata de la mutación NM_052928.2:c.244A>G en el gen *SMYD4*, que causa el cambio no sinónimo de aminoácido *SMYD4* p.K82E. Se realizaron búsquedas exhaustivas específicas para rescatar otras posibles variantes de interés que pudieran estar incluidas en la misma región. Las variantes adicionales rescatadas se encuentran listadas en el Anexo 4, pero todas ellas fueron descartadas por ser polimorfismos benignos y/o por no cumplir con el patrón de herencia esperado.

3.2.1.3 La mutación en *SMYD4* cosegrega con la enfermedad en la familia fCMT-266

La secuenciación por Sanger del gen *SMYD4* en todos los individuos de la familia fCMT-266 confirmó la existencia en heterocigosis de la mutación NM_052928.2:c.244A>G identificada mediante secuenciación masiva, y además se comprobó que la mutación cosegrega con la enfermedad (Figura 8). La mutación *SMYD4* NM_052928.2:c.244A>G. no ha sido identificada en 132 controles sanos procedentes del Banco de DNA de Salamanca ni en ninguna de las bases de datos consultadas. Con todo ello, la mutación en *SMYD4* se consideró como la mutación candidata de ser responsable de la neuropatía hereditaria presente en la fCMT-266.

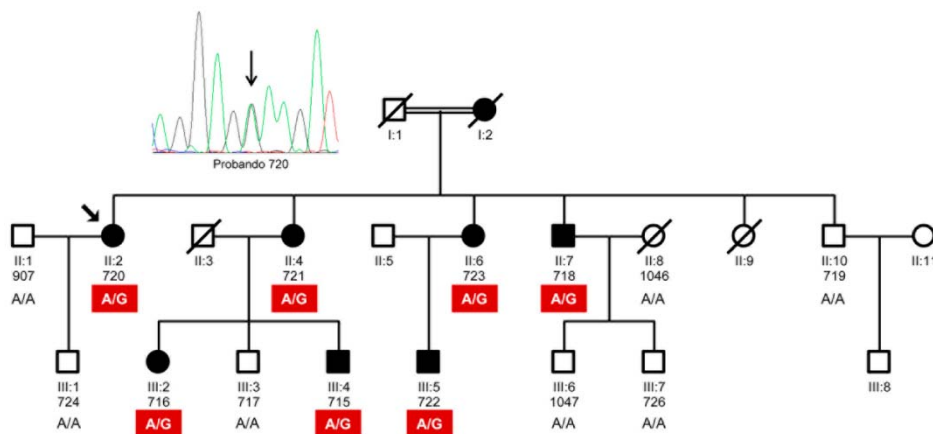


Figura 8. Análisis de segregación de la mutación *SMYD4* c.244A>G en la familia fCMT-266. Se acompaña del electroferograma con la mutación identificada en el probando (II:2).

3.2.2 *SMYD4*, gen candidato de estar implicado en la neuropatía de la fCMT-266

SMYD4 pertenece a la familia de proteínas conocida como SMYD (*SET and MYND containing proteins*), compuesta por cinco miembros en vertebrados (*SMYD1-5*) y que han sido implicados en diversas funciones biológicas que van desde la regulación del desarrollo hasta cáncer (Leinhart and Brown, 2011, Du et al., 2014, Spellmon et al., 2015). Las proteínas SMYD se caracterizan por la presencia de los dominios SET y MYND. El dominio SET es responsable de la actividad lisina metiltransferasa (KMT, acrónimo en inglés); en las proteínas SMYD, este dominio está interrumpido por un dominio MYND,

implicado en interacciones entre proteínas y en el reclutamiento de cofactores. También es característica la presencia de un dominio post-SET rico en cisteínas. SMYD1-4 tienen un dominio C-terminal (CTD, acrónimo en inglés) tipo TPR, que está ausente en SMYD5. Además, SMYD4 presenta un dominio TPR adicional en la región amino terminal, y es precisamente en este dominio TPR donde se localiza la mutación SMYD4 p.K82E identificada en los pacientes de la familia fCMT-266. Los dominios TPR son importantes en modular interacciones proteína-proteína. Aunque la actividad KMT no ha sido demostrada en el caso específico de SMYD4, las proteínas SMYD en general son capaces de metilar histonas y proteínas no histonas, participando de muy diversas formas en la regulación celular, incluyendo remodelación de la cromatina, regulación de la transcripción, transducción de señales así como control del ciclo celular (Spellmon et al., 2015).

Las proteínas SMYD pueden regular la remodelación de la cromatina y la accesibilidad de genes mediante la metilación de histonas e interactuando con mediadores transcripcionales. SMYD1-3 metilan residuos de lisina 4 de la histona H3 (H3K4), el cual es un sitio de metilación que promueve la activación de la transcripción (Hamamoto et al., 2004, Tan et al., 2006, Abu-Farha et al., 2008, Sirinupong et al., 2010). Sin embargo, las proteínas SMYD no tienen un efecto global sobre la metilación H3K4, siendo selectiva de regiones promotoras específicas (Cock-Rada et al., 2012, Medjkane et al., 2012). SMYD1 se une directamente a la clase I y II de las desacetilasas de histonas (HDAC, acrónimo en inglés) provocando represión transcripcional (Gottlieb et al., 2002). SMYD2 es capaz de dimetilar en H3K36 *in vitro* y reprimir la transcripción a través de la interacción con el complejo co-represor de desacetilasas de histonas Sin3A (Brown et al., 2006). Tanto SMYD2 como SMYD3 interactúan con la RNA polimerasa II y con la RNA helicasa HELZ, lo que les permite regular la expresión génica facilitando la elongación transcripcional (Hamamoto et al., 2004, Diehl et al., 2010). De hecho, la sobreexpresión de SMYD3 en células HEK293 es capaz de incrementar la expresión de oncogenes, genes homeobox y genes del ciclo celular (Hamamoto et al., 2004). SMYD4 fue identificado como supresor tumoral en cáncer de mama (Hu et al., 2009), regulando la expresión del gen *PDGFRA* (Hu et al., 2009). Un posible homólogo de SMYD4 en *D. melanogaster* actúa como represor transcripcional, reclutando HDACs de clase I (Thompson and Travers, 2008). SMYD5 se asocia con el complejo co-represor NCoR y regula la expresión de genes proinflamatorios a través de la trimetilación H4K20, incluyendo la represión del *toll-like receptor 4* (*TLR4*) en macrófagos (Stender et al., 2012).

Las proteínas SMYD catalizan la metilación de varias proteínas no histonas. En ciclo celular, SMYD2 metila a p53 y a Rb (Huang et al., 2006, Saddic et al., 2010, Cho et al., 2012). SMYD2 media la represión de la actividad de p53 a través de su metilación en la lisina 370 (K370) (Huang et al., 2006). En respuesta a daño del DNA, la metilación de PARP1 (K528) por SMYD2 regula su actividad de poli-ADP-ribosilar (Piao et al., 2014). En señalización intracelular, SMYD3 media la metilación de dos importantes quinasas, como MAP3K2 y VEGFR1 (Kunizaki et al., 2007, Mazur et al., 2014). La metilación de MAP3K2 (K260) por SMYD3 potencia la activación de la señalización oncogénica de Ras (Mazur et al., 2014). SMYD3 aumenta la capacidad enzimática de VEGFR1 mediante su metilación, favoreciendo la tumorigénesis (Kunizaki et al., 2007). Debido a su implicación en cáncer, se ha suscitado un interés especial en esta familia proteica, fundamentalmente en SMYD2 y SMYD3, y de hecho, las KMT se han convertido en nuevas dianas terapéuticas en cáncer (Wagner and Jung, 2012, Colon-Bolea and Crespo, 2014, Peserico et al., 2015).

Las proteínas SMYD, especialmente SMYD1-3, son reguladores fundamentales del desarrollo y función del músculo esquelético y cardíaco (Du et al., 2014). SMYD1 es necesario para el desarrollo cardíaco a través de la diferenciación y maduración de cardiomiocitos (Gottlieb et al., 2002), y su expresión en corazón está directamente dirigida por MEF2 (Phan et al., 2005). *SMYD1* se expresa durante el desarrollo en pez zebra y se requiere para un correcto desarrollo del músculo esquelético, organización de las miofibrillas y contracción muscular (Tan et al., 2006), así como para la sarcomerogénesis (Just et al., 2011). Además de SMYD1, SMYD2 también se expresa en el músculo cardíaco durante la cardiogénesis (Diehl et al., 2010) y ambas proteínas se expresan durante desarrollo muscular en *Xenopus laevis* (Kawamura et al., 2008). Estudios de silenciamiento en pez zebra han demostrado la importancia de SMYD2 en el correcto desarrollo del músculo esquelético (Donlin et al., 2012), así como el requerimiento de SMYD3 para un desarrollo muscular normal, donde además, su silenciamiento da lugar a la expresión anormal de marcadores de corazón y factores de regulación miogénica (Fujii et al., 2011). Si bien son necesarios para procesos de desarrollo específicos, la desregulación de proteínas SMYD puede participar en el desarrollo de cáncer (Leinhart and Brown, 2011, Hamamoto et al., 2015). En comparación con SMYD1-3, los miembros más conocidos, poco se sabe acerca de SMYD4 y SMYD5.

En cuanto a SMYD4, se sabe que juega un papel en la supresión de tumor en la carcinogénesis de mama (Hu et al., 2009), ya que la pérdida de un alelo de SMYD4 en células mamarias epiteliales resulta en tumorigénesis, mientras que su re-expresión causa la supresión del crecimiento de las células tumorales. Además, SMYD4 a menudo se elimina o se reprime en meduloblastoma, un tipo de tumor cerebral (Northcott et al., 2009). Por otro lado, los estudios de silenciamiento de un posible homólogo de *SMYD4* en *D. melanogaster* sugieren que es un modulador transcripcional implicado en desarrollo muscular (Thompson and Travers, 2008).

A pesar de la importancia de las proteínas SMYD en el desarrollo y la función muscular, también se expresan en otros tejidos. *Smyd2* se expresa en cerebro y en corazón en embriones de ratón (Brown et al., 2006). Tanto en ratones neonatos como adultos, *Smyd2* se expresa de manera amplia en una gran variedad de tejidos, incluyendo cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, timo, pulmón, bazo u ovario (Brown et al., 2006, Diehl et al., 2010), a diferencia de *Smyd1*, que se expresa de forma más restringida en timo, músculo cardíaco y esquelético (Hwang and Gottlieb, 1997, Brown et al., 2006, Diehl et al., 2010). *Smyd3* se expresa fundamentalmente en músculo esquelético (Hamamoto et al., 2004) y timo (Brown et al., 2006), aunque también se detecta expresión en otros tejidos como cerebro, riñón y ovario (Brown et al., 2006), mientras que *Smyd5* se expresa de forma uniforme en los diferentes tejidos, incluyendo cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, pulmón o bazo (Diehl et al., 2010). En cuanto a la expresión de *Smyd4*, únicamente se sabe que un posible homólogo en *D. melanogaster* se expresa en mesoderma (Thompson and Travers, 2008), pero se desconoce su patrón de expresión en mamíferos.

3.2.2.1 *Smyd4* se expresa en sistema nervioso

Considerando que la familia fCMT-266 está afectada de una neuropatía periférica quisimos comprobar si *SMYD4* se expresa en sistema nervioso, con especial interés en determinar si está presente en el PNS. Para ello, se analizó la expresión de *Smyd4* mediante RT-PCR a partir de tejidos de ratón adulto. Como se puede ver en la Figura 9A, se detectó expresión de *Smyd4* en todos los tejidos analizados, incluyendo el sistema

nervioso central (cerebro y médula espinal) y periférico (nervio ciático). Además, mediante hibridación *in situ* en cortes de embrión de ratón (edad embrionaria E14.5) y usando una sonda específica para detectar la expresión de *Smyd4*, se observó una expresión preponderante de *Smyd4* en sistema nervioso (cerebro, médula y DRG), como se aprecia en la Figura 9B. La existencia de expresión de *SMYD4* en el sistema nervioso tanto de ratón como de humano, se ve apoyada por la información contenida en las bases de datos que contienen datos de expresión como *Expression Atlas* (EMBL-EBI), *Mouse Genomes Project* (Wellcome Trust Sanger Institute) o *Mouse Genome Informatics* (The Jackson Laboratory).

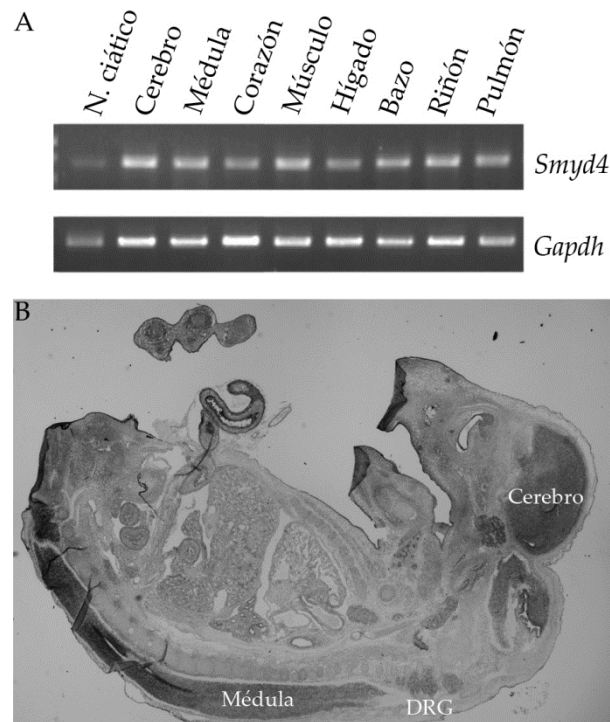


Figura 9. Análisis de la expresión de *Smyd4*. (A) RT-PCR a partir de cDNA de los tejidos indicados procedentes de ratón adulto usando oligonucleótidos específicos para amplificar *Smyd4*. Como control de expresión se ha empleado el gen *Gapdh*. (B) Hibridación *in situ* sobre cortes de embrión de ratón (E14.5) usando una sonda específica para detectar la expresión de *Smyd4*.

Una evidencia de que en humanos *SMYD4* se expresa en el PNS, resulta del hecho de que la CDS (acrónimo del inglés *coding DNA sequence*) completa de *SMYD4* obtenida para generar la construcción pEGFP-SMYD4 (detallado en la sección correspondiente de Material y métodos), fue clonada a partir de cDNA procedente de la línea de células de Schwann humanas HEI-193. En humanos, dado que la delección de *SMYD4* se ha relacionado con el desarrollo de meduloblastoma (Northcott et al., 2009, Lawlor and Thiele, 2012), un tipo de tumor cerebral, hace pensar que posiblemente tenga un papel relevante en sistema nervioso. Resulta de particular interés la presencia de expresión de *Smyd4* en DRG, ya que de acuerdo a la clínica que presenta la familia fCMT-266, con crisis recurrentes de eritromelalgia en algunos pacientes de la familia, es probable que el daño primario se produzca en ese tejido. Por tanto, la presencia de expresión de *Smyd4* en el PNS supone un apoyo adicional a la consideración de que la mutación en *SMYD4* es una buena candidata para ser la causante de la neuropatía periférica en la familia fCMT-266.

En tejidos humanos y a nivel proteico, parece que su presencia también es ubicua (Figura 10A). Se detecta *SMYD4* en todos los tejidos analizados, incluyendo el sistema nervioso central (cerebro), aunque hay diferencias en cuanto a abundancia y presencia de

productos de diferente tamaño entre tejidos. Como se ha comentado en la introducción, no es excepcional que mutaciones en proteínas ubicuas puedan dar lugar a neuropatías periféricas, como mutaciones en las aminoacil-tRNA sintetasas (Yao and Fox, 2013), o incluso la neuropatía recurrente HNA causada por mutaciones en *SEPT9* (Scott et al., 2005, Mostowy and Cossart, 2012).

En humanos se han predicho y anotado en bases de datos al menos dos isoformas de SMYD4: la forma larga de 89 KDa, que contendría todos los dominios característicos (TPR, SET y MYND) y una forma corta de 62 KDa, que carecería del dominio TPR amino terminal (Figura 10). Los diferentes tamaños observados, como las isoformas tejido-específicas identificadas en cerebro y en músculo (Figura 10A), podrían deberse a isoformas no descritas, aunque también podrían deberse a modificaciones post-traduccionales de la proteína. En el caso de SMYD1, se ha demostrado que se sumoiliza, y que esta modificación es importante para su translocación al citoplasma durante la miogénesis (Berkholz et al., 2014). Sin embargo, no se predicen posibles sumoilaciones en el caso de la proteína SMYD4 humana (predicador GPS-SUMO, (<http://sumosp.biocuckoo.org/>)), aunque no habría que descartar otras posibles modificaciones post-traduccionales, como el procesamiento proteolítico descrito para SMYD3 (Silva et al., 2008).

A partir de extractos totales de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, mediante WB se determinó la existencia de las dos isoformas de SMYD4 (89 y 62 KDa) en células derivadas de sistema nervioso humano (Figura 10B). Además se confirmó la especificidad de estas bandas debido a la reducción en sus niveles cuando se silencia de forma transitoria la expresión de *SMYD4* mediante transfección con *siRNA* específico de *SMYD4* (Figura 10B)

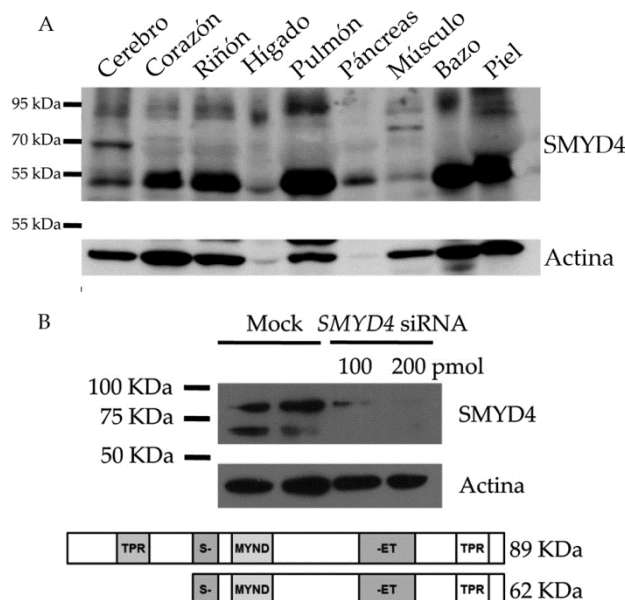


Figura 10. Detección de SMYD4 en tejidos y células humanas. (A) WB de tejidos humanos usando el anticuerpo anti-SMYD4 (Novus Biologicals). (B) Análisis de SMYD4 mediante WB en extractos totales de células SH-SY5Y transfectadas con cantidades crecientes (100 o 200 pmol) de *SMYD4 siRNA* o con la mezcla de transfección sin *siRNA* (Mock) como control. Como control de carga se detectó la actina. En la parte inferior se puede ver un esquema con las dos isoformas predichas de SMYD4 en humanos.

3.2.2.2 SMYD4 es una proteína fundamentalmente citoplasmática

Habiendo caracterizado el patrón de expresión tisular de SMYD4, quisimos estudiar su localización subcelular, para posteriormente evaluar si la mutación SMYD4 p.K82E pudiera alterarla. El análisis *in silico* con programas de predicción de localización basados en la secuencia de la proteína (PSORT II) sugerían que la proteína SMYD4 humana (identificador Uniprot Q8IYR2) podría estar localizada fundamentalmente en núcleo (69,6 % de probabilidad) y citoplasma (13,0 %), y en menor medida en otras localizaciones concretas (membrana plasmática 8,7 %, vesículas de secreción 4,3 % y aparato de Golgi 4,3%).

El análisis mediante WB de extractos de células SH-SY5Y, tras fraccionamiento subcelular, demuestra que las dos isoformas predichas para SMYD4 están presentes en el citoplasma (Figura 11), aunque parece que puede haber otras isoformas adicionales en el núcleo.

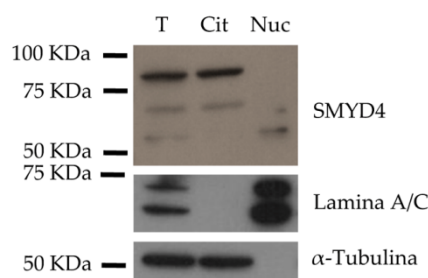


Figura 11. Análisis de la distribución subcelular de SMYD4 mediante WB en extractos tras fraccionamiento. Se analizaron las fracciones total (T), citoplasmática (Cit) y nuclear (Nuc) obtenidos a partir de células SH-SY5Y. Como control de carga de la fracción citoplasmática se detectó la α -Tubulina, mientras que en la fracción nuclear se detectó la Lamina A/C.

El análisis mediante microscopía de fluorescencia de células sobreexpresando la forma larga (89 KDa) de SMYD4 como proteína de fusión con la proteína fluorescente GFP (SMYD4-GFP) muestra que la proteína se localiza preferentemente en el citoplasma, y en menor medida en el núcleo, de células derivadas de diferentes tejidos (Figura 12). El patrón de SMYD4-GFP en las diferentes líneas es bastante similar.

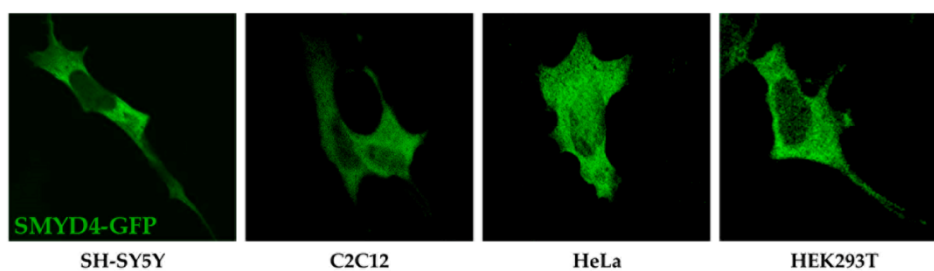


Figura 12. Localización subcelular de SMYD4-GFP sobreexpresada en células SH-SY5Y (neural), C2C12 (muscular), HeLa (epitelial) y HEK293T (embrionaria de riñón).

Hasta la fecha, en cuanto a SMYD4, únicamente Donlin y colaboradores, quienes analizaron la distribución subcelular de proteínas KMTs en células HEK293T, entre las que se encontraban las proteínas de la familia SMYD (Donlin et al., 2012), habían observado que SMYD4 sobreexpresada muestra un patrón fundamentalmente citoplasmático. Nosotros hemos confirmado dicho resultado, y además, hemos observado el mismo patrón en líneas celulares derivadas de diferentes tejidos. Adicionalmente, la proteína codificada por el gen *CG14122*, un posible homólogo de *SMYD4* en *D. melanogaster*, muestra un patrón citoplasmático y nuclear en células S2, mientras que se

observa un patrón puramente citoplasmático en estadios tardíos del embrión (Thompson and Travers, 2008). Las proteínas SMYD1-3, los miembros más estudiados de las SMYD, son particularmente abundantes en el citoplasma (Du et al., 2014), lo que es consistente con la falta de señal de localización nuclear (NLS, acrónimo en inglés) y la presencia de la señal de exportación nuclear (NES, acrónimo en inglés) en esta familia proteica (Donlin et al., 2012). Sin embargo, también se ha descrito su localización nuclear (Sims et al., 2002, Hamamoto et al., 2004), lo que sugiere que las proteínas SMYD pueden ser transportadas al núcleo por asociación con otros factores, y por tanto, pueden tener funciones duales en el núcleo y citoplasma. Por ejemplo, *Smyd1* muestra una localización nuclear en mioblastos C2C12 *in vitro*, mientras que se transloca al citoplasma durante la diferenciación a miotubos (Sims et al., 2002), y de hecho, se ha visto que la proteína *Smyd1* se localiza en la línea M sarcomérica en fibras diferenciadas de músculo esquelético y cardíaco (Just et al., 2011, Li et al., 2011). Este patrón subcelular tan dinámico sugiere que *Smyd1*, como ejemplo de un representante de la familia SMYD, puede desempeñar múltiples funciones dependiendo de su localización.

3.2.2.3 La mutación p.K82E no afecta a la localización subcelular de SMYD4

Una vez establecido el patrón subcelular de la proteína SMYD4 WT sobreexpresada, quisimos determinar si la mutación SMYD4 p.K82E pudiera alterar su localización. Mediante microscopía de fluorescencia comparamos la localización citoplasmática de SMYD4-GFP WT y de la forma mutante p.K82E obtenida tras su sobreexpresión en células HEK293T. Como se puede ver en el gráfico de la Figura 13, no se observaron diferencias en la distribución subcelular debido a la mutación p.K82E. En ambos casos se obtiene una localización citoplasmática del 79-80%. Por tanto, la mutación p.K82E no altera la localización subcelular de SMYD4. Los valores observados para la localización citoplasmática de SMYD4, tanto la forma WT como la mutante, son muy parecidos a los encontrados por Donlin y colaboradores, quienes analizaron la distribución subcelular de proteínas KMTs en células HEK293T, entre las que se encontraban las proteínas de la familia SMYD (Donlin et al., 2012). En el caso específico de SMYD4, observaron una localización citoplasmática del 87% (rango 75-92%).

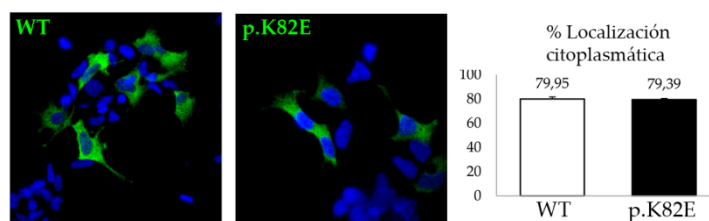


Figura 13. Distribución subcelular de SMYD4-GFP WT y p.K82E. Células HEK293T fueron transfectadas con pEGFP-SMYD4 WT o p.K82E. Se determinó el % de señal de fluorescencia citoplasmática mediante Image J. Se analizaron al menos 33 células transfectadas.

3.2.2.4 SMYD4 puede actuar como represor transcripcional

El homólogo de *SMYD4* propuesto en *D. melanogaster* puede actuar como represor transcripcional mediante la interacción y reclutamiento de HDAC de clase I (Thompson and Travers, 2008). Además, se ha demostrado que otras proteínas SMYD en vertebrados, como *Smyd1* y *Smyd2*, tienen capacidad de funcionar como represores transcripcionales (Gottlieb et al., 2002, Brown et al., 2006). Sin embargo, se desconoce si en vertebrados

SMYD4 puede funcionar como tal. Por ello, nos planteamos estudiar mediante ensayo luciferasa si la proteína SMYD4 humana es capaz de actuar como represor transcripcional y si la mutación p.K82E pudiera afectar dicha actividad.

La interacción de GAL4-SMYD4 con los sitios de unión a GAL4, situados entre los sitios de unión a LexA y el gen reportero luciferasa del plásmido pL8G5-Luc, produce una disminución de la expresión de la luciferasa, en comparación cuando están LexA-VP16 y GAL4 sin SMYD4 (Figura 14A). Además, no se observa esta represión cuando se emplea un plásmido sin los sitios de unión a GAL4 (pL8-Luc), lo que impide que se pueda unir GAL4-SMYD4, confirmando la especificidad de la represión anteriormente observada (Figura 14B). Cuando se introduce la forma mutante p.K82E (Figura 14A), se observa un ligero incremento en la represión (disminuyen los niveles del reportero), aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Estos resultados demuestran por primera vez que la proteína SMYD4 de vertebrados, tomando la proteína humana como representante, es capaz de funcionar como represor transcripcional, y podría explicar cómo SMYD4 sería capaz de regular la expresión de ciertos genes, como por ejemplo, la del *platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFRA) (Hu et al., 2009).

Por otro lado, estos resultados indican que la mutación SMYD4 p.K82E no es capaz de alterar significativamente su función como represor transcripcional, al menos en las condiciones estudiadas. Sería interesante realizar experimentos similares actuando sobre dianas génicas específicas de SMYD4. Por otro lado, y teniendo en cuenta que la proteína SMYD4, tanto endógena (Figura 11) como sobreexpresada (Figuras 12 y 13), tiene preferencia por la localización citoplasmática, es posible que realice funciones extranucleares adicionales, como se ha puesto de manifiesto para otras SMYD en vertebrados (Du et al., 2014, Spellmon et al., 2015). Pudiera ser que la mutación SMYD4 p.K82E modifique alguna de estas funciones hasta ahora desconocidas.

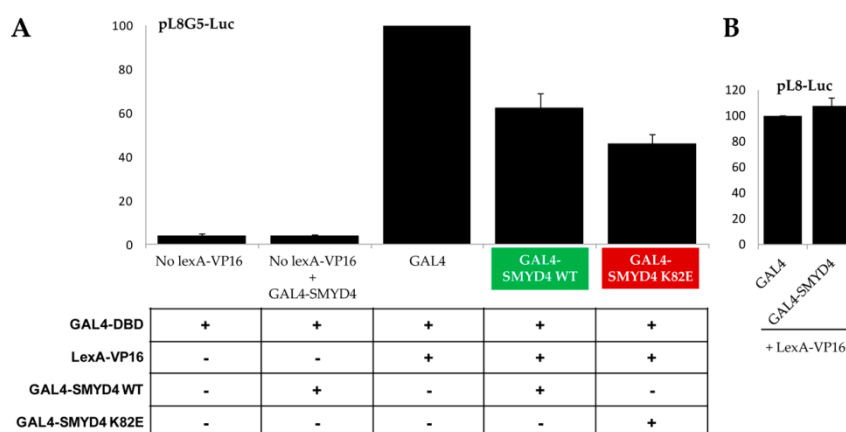


Figura 14. Medida de la represión transcripcional de SMYD4 mediante ensayo luciferasa. (A) Se transfectaron células HeLa con el vector pL8G5-Luc junto con los vectores de expresión de mamíferos p.GAL4, p.LexA-VP16, y p.GAL4-SMYD4 WT o el mutante p.K82E. La actividad luciferasa se normalizó frente a la eficiencia de la transfección medida por los niveles del reportero renila cotransfectado en cada condición. En (B) se muestran los resultados obtenidos al emplear como control experimental el vector pL8-Luc que carece de sitios de unión a GAL4. Los resultados corresponden a cinco o a tres experimentos independientes, en los casos de pL8G5-Luc o de pL8-Luc respectivamente, y se muestra la media de la activación (en %) relativizada frente al control con el activador transcripcional LexA-VP16 pero sin GAL4-SMYD4.

3.2.2.5 SMYD4 interacciona con HSP90

Las proteínas SMYD, para ejercer su función interaccionan físicamente con diversas proteínas (Abu-Farha et al., 2008, Abu-Farha et al., 2011, Spellmon et al., 2015). Teniendo en cuenta que la mutación SMYD4 p.K82E se localiza en un dominio TPR, un dominio implicado en interacciones proteína-proteína (D'Andrea and Regan, 2003), una posible hipótesis es que la mutación pudiera afectar a la interacción con otras proteínas. Es por ello, que quisimos identificar posibles interactores específicos de la proteína SMYD4 humana, hasta ahora desconocidos, para posteriormente analizar si la mutación SMYD4 p.K82E pudiera influir en la interacción.

Se identificaron posibles interactores específicos mediante inmunoprecipitación (Figura 15A) acoplada a cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (IP-LC-MS/MS). En la Tabla 8 se resumen los posibles interactores de SMYD4 identificados en el estudio.

Tabla 8. Posibles interactores identificados durante el estudio mediante IP-LC-MS/MS.

Proteína	ID. Uniprot	Nº péptidos (réplica 1/réplica 2)	
		Control	SMYD4-GFP
SMYD4	Q8IYR2	0/0	138/89
GFP	P42212	0/0	39/20
HSP90AA1	P07900	0/0	28/20
K1C13	P13646	0/0	14/16
LMNA	P02545	0/0	2/1
YTHDF2	Q9Y5A9	0/0	2/3
AGO1	Q9UL18	0/0	2/1
TXTP	P53007	0/0	1/1
COF2	Q9Y281	0/0	1/1
HSP90AB1*	P08238	13/8	47/26

* Posible interactor rescatado por cumplir el criterio establecido en la sección correspondiente de Material y métodos.

De entre los posibles interactores identificados, destaca la proteína HSP90 tanto por el número de péptidos identificados como porque ya ha sido previamente descrita de interaccionar con las proteínas SMYD1-3 (Tan et al., 2006, Abu-Farha et al., 2011, Donlin et al., 2012). Sin embargo, aunque se había hipotetizado que posiblemente SMYD4 pudiera interaccionar también con HSP90 (Abu-Farha et al., 2011, Voelkel et al., 2013), nunca antes se había demostrado. Confirmamos y caracterizamos la interacción entre SMYD4 y HSP90 mediante coinmunoprecipitaciones dirigidas. Primeramente, inmunoprecipitando HSP90 endógena y detectando SMYD4 endógena en el coinmunoprecipitado (Figura 15B).

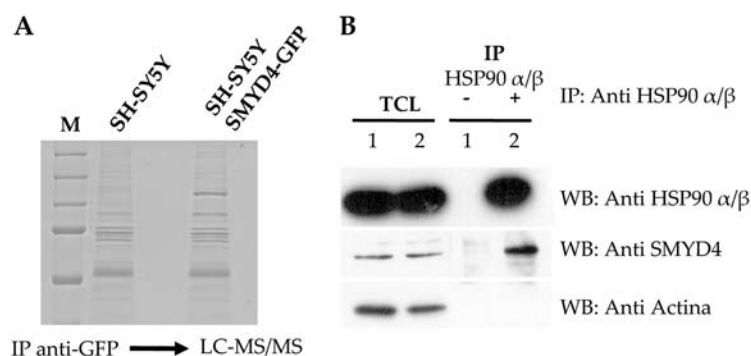


Figura 15. Identificación de posibles interactores de SMYD4 mediante IP-LC-MS/MS. En (A) se muestra un gel de acrilamida teñido con azul de coomassie para visualizar las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-GFP en células SH-SY5Y transfectadas con SMYD4-GFP. Como control se emplearon células no transfectadas. Los geles se cortaron y procesaron para un posterior análisis mediante LC-MS/MS para la identificación de las proteínas. En (B) se muestra la confirmación de la interacción de las proteínas endógenas SMYD4 y HSP90 mediante coimmunoprecipitación. Se inmunoprecipitó HSP90 y se detectó SMYD4 en el coimmunoprecipitado. Como control se empleó una condición en la que no se adicionó el anticuerpo anti-HSP90 (carril 1 de la IP). Como control de carga en el lisado total (TCL) se detectó la actina.

Además, los resultados de la inmunoprecipitación de diferentes fragmentos de la proteína HSP90, sugieren que SMYD4 se une más fuertemente con el dominio N-terminal de HSP90 (Figura 16).

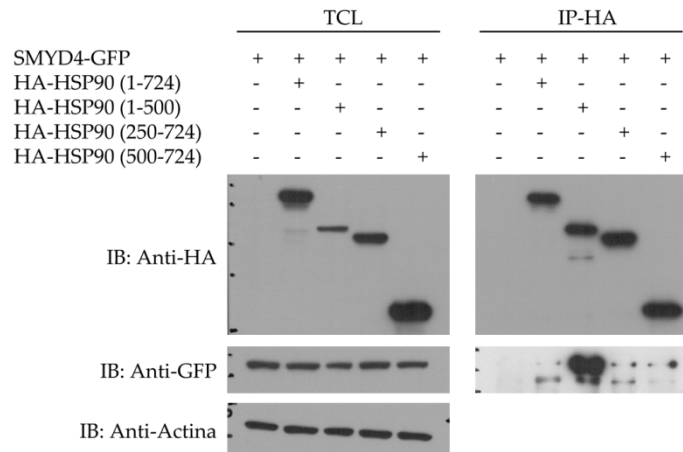


Figura 16. Caracterización de la interacción entre SMYD4 y HSP90. (A) A partir de células HEK293T transfectadas con SMYD4-GFP y con diferentes fragmentos de HA-HSP90, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de los diferentes fragmentos de la HSP90-HA con anti-HA y detección de SMYD4-GFP en el coimmunoprecipitado. Como control de carga en el lisado total (TCL) se detectó la actina.

La coimmunoprecipitación recíproca, mediante inmunoprecipitación de SMYD4-GFP para detectar en el coimmunoprecipitado los diferentes fragmentos de la HSP90, muestra resultados similares (Figura 17): SMYD4 parece interactuar más fuertemente con la región N-terminal de HSP90. Este resultado contrasta con los obtenidos con otras proteínas SMYD. En el caso de SMYD2 se ha demostrado que es la región C-terminal de HSP90 la importante para la interacción (Hamamoto et al., 2014), y que en SMYD2 interactúa con parte del dominio SET. Es posible que SMYD4 interactúe con HSP90 a través de otros dominios. Recientemente se ha demostrado que SMYD3 es capaz de unirse a través del dominio CTD tipo TPR con HSP90 (Brown et al., 2015), aunque previamente se había sugerido que la región amino terminal de SMYD3 era importante en la interacción con HSP90 (Silva et al., 2008).

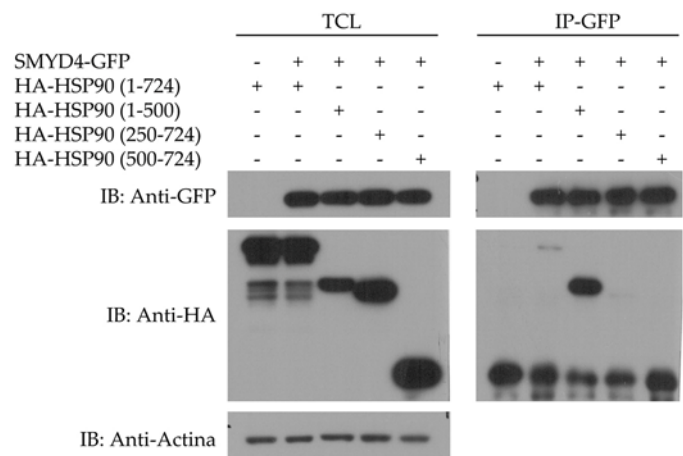


Figura 17. Caracterización de la interacción entre SMYD4 y HSP90 mediante coimmunoprecipitación. A partir de células HEK293T transfectadas con SMYD4-GFP y con diferentes fragmentos de HA-HSP90, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de SMYD4-GFP con anti-GFP y detección de diferentes fragmentos de la HSP90-HA con anti-HA. Como control de carga en el lisado total (TCL) se detectó la actina. Mayores tiempos de exposición muestra la banda correspondiente a la interacción con el fragmento de HA-HSP90 (250-724). El asterisco marca la inespecificidad debida a las bolas de sefarosa residuales presentes en el inmunoprecipitado, y que solapa en tamaño con HA-HSP90 (500-724), impidiendo su identificación en el coimmunoprecipitado.

Además de la interacción física demostrada mediante coimmunoprecipitaciones, quisimos determinar si SMYD4 y HSP90 son capaces de colocalizar a nivel subcelular. Como se puede ver en la Figura 18, SMYD4-GFP sobreexpresada en células SH-SY5Y es capaz de colocalizar con HSP90 endógena a nivel citoplasmático.

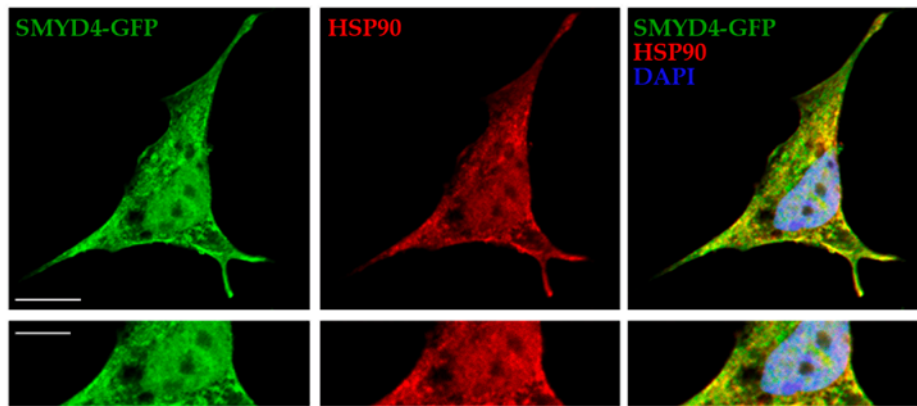


Figura 18. Colocalización entre SMYD4-GFP y HSP90. Mediante microscopía confocal se muestra la colocalización de SMYD4-GFP (canal verde) sobreexpresada en células SH-SY5Y con la proteína HSP90 endógena (canal rojo). Se empleó DAPI para la visualización del núcleo (canal azul). En la parte inferior se muestran magnificaciones de las imágenes. La barra corresponde a 10 μ m en las imágenes superiores y a 6 μ m en las magnificaciones de la parte inferior.

La proteína HSP90 interacciona y regula cientos de proteínas clientes (Pratt and Toft, 2003, Pratt et al., 2004). El tratamiento con geldanamicina (GA), un inhibidor específico de HSP90 (Garcia-Carbonero et al., 2013), altera la función y/o la estabilidad de sus proteínas interactoras, pudiendo provocar su degradación (Matts and Manjarrez, 2009). Es por ello que quisimos analizar el efecto de la GA sobre la proteína SMYD4. Como se puede ver en la Figura 19, empleando un anticuerpo específico para reconocer la proteína SMYD4 endógena (Figura 19A), el tratamiento con GA, a los diferentes tiempos y concentraciones analizadas, provoca la disminución de sus niveles proteicos (Figura 19B y C). Este resultado supone un apoyo adicional a la relación entre SMYD4 y la HSP90.

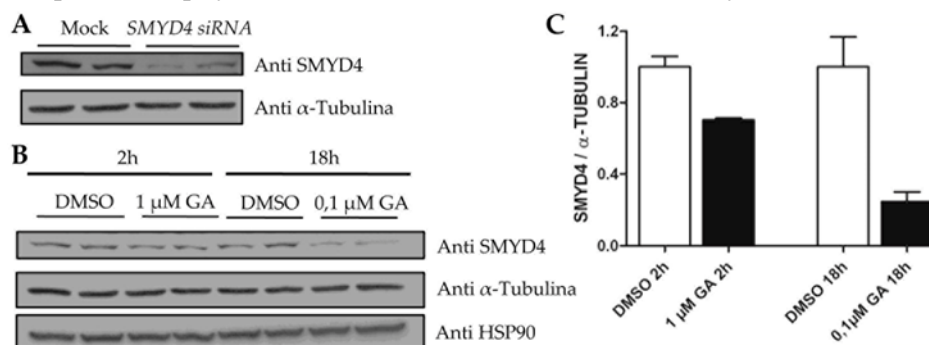


Figura 19. Análisis del efecto de la geldanamicina sobre SMYD4. En A se muestra la especificidad del anticuerpo anti SMYD4 (Abcam), que es capaz de detectar el silenciamiento transitorio debido a SMYD4 siRNA en células SH-SY5Y. (B) Se trataron células SH-SY5Y con geldanamicina 1 μ M (2h) y 0,1 μ M (18h). Como control se emplearon células tratadas con DMSO, y como control de carga en los lisados se detectó la proteína α -Tubulina. (C) Cuantificación de los niveles de SMYD4 normalizados frente al control de carga y

relativizados frente al control tratado con DMSO. Las cuantificaciones corresponden a cuatro experimentos independientes.

Habiendo demostrado la interacción entre SMYD4 y HSP90, quisimos comprobar mediante coimmunoprecipitación si la mutación SMYD4 p.K82E pudiera afectar en la unión normal. Como se puede ver en la Figura 20, la forma WT y la mutante p.K82E de SMYD4 interaccionan con la HSP90 de forma similar, por lo que la mutación no alteraría la interacción.

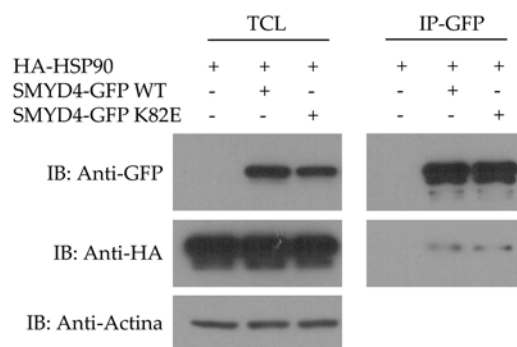


Figura 20. Estudio de interacción entre SMYD4 WT y p.K82E con HSP90. Extractos de células HEK293T transfectadas con HA-HSP90 y con SMYD4 WT o p.K82E se emplearon para la inmunoprecipitación de SMYD4-GFP WT o p.K82E con anti-GFP y la posterior detección de la interacción con la HSP90 mediante anti HA. Como control de carga en el lisado (TCL) se detectó la actina.

Una estrategia útil para comprender las funciones de las proteínas así como para determinar posibles mecanismos de acción es a través de la identificación de interactores. Se han llevado a cabo estudios de doble híbrido y/o de inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para identificar los interactores de las proteínas SMYD1, SMYD2, SMYD3 o SMYD5 (Abu-Farha et al., 2008, Park et al., 2010, Abu-Farha et al., 2011, Weimann et al., 2013). En su conjunto, las proteínas interactoras de las proteínas SMYD pueden dividirse en tres grupos funcionales: (1) proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas, (2) proteínas relacionadas con replicación y reparación del DNA, y (3) chaperonas y co-chaperonas moleculares (Abu-Farha et al., 2011). Hasta la fecha no se había realizado ningún estudio proteómico para identificar proteínas interactoras de SMYD4, y tan solo se conocían las proteínas dHDAC1, dHDAC3 y Ebi, un componente del complejo represor dHDAC3/SMRTER, como interactores del posible homólogo de SMYD4 en *D. melanogaster* (*CG14122*) (Thompson and Travers, 2008).

Nuestro estudio ha permitido la identificación de varias proteínas que interaccionan con SMYD4, de entre las que destaca la chaperona HSP90. Las proteínas SMYD1-3, pero no SMYD5, interaccionan con HSP90 y juegan un papel como reguladores de su función (Tan et al., 2006, Abu-Farha et al., 2011, Donlin et al., 2012), y de hecho, se ha sugerido la consideración de las proteínas SMYD como co-chaperonas capaces de modular su actividad (Du et al., 2014). Se ha visto que Smyd2 metila a HSP90, y que esta metilación es crítica para la función de HSP90 estabilizando la proteína titina y para el mantenimiento y función muscular (Donlin et al., 2012, Voelkel et al., 2013). Por otro lado, la interacción con HSP90 parece importante para la actividad KMT de las proteínas SMYD. Se ha demostrado que la adición de HSP90 potencia la capacidad de Smyd1-3 de metilar histonas *in vitro* (Hamamoto et al., 2004, Tan et al., 2006, Abu-Farha et al., 2008). Si bien el resultado obtenido tras el tratamiento con geldanamicina sugiere que la estabilidad de SMYD4 requeriría de una correcta actividad de la HSP90, no sabemos cuál sería el papel

de SMYD4 sobre la función de HSP90, aunque se sabe que no es capaz de metilarla (Donlin et al., 2012).

La mutación SMYD4 p.K82E está localizada en el dominio TPR amino terminal de la proteína. Se han descrito mutaciones en dominios TPR implicadas en enfermedades mendelianas (Grizot et al., 2001, D'Andrea and Regan, 2003). Los dominios TPR son importantes en interacciones entre proteínas, incluyendo la interacción de otras proteínas SMYD con la HSP90 (Brown et al., 2015). Pese a que no sabemos cuál es el dominio en SMYD4 implicado en su interacción con HSP90, hemos descartado que la mutación SMYD4 p.K82E afecte esta interacción, aunque no hemos determinado si pudiera afectar de alguna manera a la funcionalidad de HSP90. La mutación SMYD4 p.K82E podría afectar la interacción con otras proteínas. Aunque no hemos caracterizado la interacción con otros posibles interactores identificados en el estudio (Tabla 8), hay otros candidatos interesantes, como COF2, aunque teniendo en cuenta el bajo número de péptidos identificados para los otros posibles interactores, habría que validarlos con estudios adicionales. COF2 está implicada en el mantenimiento del sarcómero muscular regulando la dinámica de los filamentos de actina (Gurniak et al., 2014, Kremneva et al., 2014). Teniendo en cuenta el fenotipo puramente muscular observado en el ratón knock-out de *Cof2* (Gurniak et al., 2014) y que mutaciones en este gen conducen a un tipo de miopatía congénita conocida como miopatía nemalínica (Agrawal et al., 2007, Ockeloen et al., 2012), es de esperar que la posible interacción de SMYD4 con COF2 no tenga relevancia en cuanto a la posible implicación de SMYD4 en la neuropatía de la fCMT-266.

Otro posible escenario planteable es que la mutación SMYD4 p.K82E pudiera generar una ganancia de función permitiendo la unión con nuevos interactores o incrementando la afinidad por ciertas dianas, y para ello habría que encaminarse hacia estudios proteómicos comparativos entre la forma mutante respecto a la WT. Se desconoce si SMYD4 posee actividad KMT, aunque al poseer dominio SET, es muy posible que pueda actuar metilando dianas proteicas. Aunque la mutación no se localiza en el dominio implicado en dicha actividad, no hay que descartar que se viera afectada debido una interacción anormal con alguna de sus posibles dianas debido a la mutación SMYD4 p.K82E.

Establecer el efecto de una mutación dominante puede resultar complicado sobre todo cuando no se conoce las funciones exactas de la proteína en cuestión. Por otro lado, nos encontramos con la particularidad de que la manifestación clínica en la familia fCMT-266 se presenta de forma recurrente y episódica, por lo que es posible que el efecto deletéreo de la mutación se produzca ante ciertos estímulos o condiciones. Esta consideración hace pensar por ejemplo en la implicación de proteínas de tipo *heat shock proteins* o incluso canales que se regulen ante ciertos estímulos.

En resumen, los estudios celulares y moleculares obtenidos hasta el momento no arrojan luz sobre el posible efecto de la mutación SMYD4 p.K82E. Es por ello que se hace necesario comprobar si SMYD4 pudiera desempeñar algún papel en el PNS.

3.2.3 Estudio del papel de SMYD4 en el sistema nervioso periférico

Con el propósito de emplear el organismo modelo *D. melanogaster* donde estudiar la posible función de SMYD4 en el PNS, en primer lugar llevamos a cabo un extenso estudio filogenético de la familia de proteínas SMYD en metazoos, identificando cada uno de los homólogos de las proteínas SMYD en *D. melanogaster* y con especial interés en SMYD4. Así mismo, este estudio nos ha permitido comprender la evolución de esta familia génica.

3.2.3.1 Filogenia de la familia de las proteínas Smyd en metazoos

Las reconstrucciones filogenéticas de secuencias de proteínas Smyd procedentes de especies animales mediante los métodos de *Neighbour Joining* (NJ) y *Maximum Likelihood* (ML) dieron lugar a los mismos agrupamientos principales, que se muestran esquematizados en el árbol comprimido de la Figura 21. En la Figura 22 se muestra el árbol filogenético completo resultante del análisis mediante ML. En el Anexo 5 se muestran los correspondientes árboles filogenéticos sin comprimir.

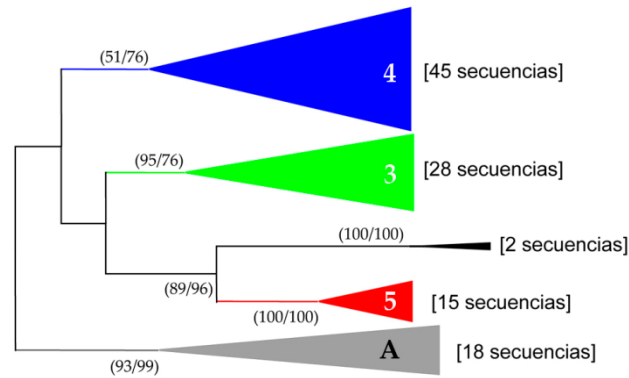


Figura 21. Análisis filogenético de la familia de proteínas de las Smyd en animales. Se muestra el árbol obtenido mediante el método maximum-likelihood (ML). Los números en las ramas indican el apoyo obtenido mediante *Bootstrap* en ambos métodos (ML/NJ). Sobre las ramas comprimidas se muestra la clase de la subfamilia agrupada (3, 4, 5 o A). Entre corchetes se indica el número de secuencias incluidas en cada rama comprimida.

El primer hecho evidente es que la familia de proteínas SMYD definida en vertebrados como Smyd1-5, no es la situación típica en todas las especies (Figura 22). Smyd1 sólo está presente en cordados, y Smyd2 en vertebrados, con duplicaciones adicionales de ambos en *D. rerio*. Estos genes son muy similares a Smyd3, para el cual existe un representante en todas las especies incluidas en el estudio. Además, en vertebrados sólo hay un único gen *Smyd4* mientras que otras especies tienen al menos un gen adicional muy similar a *Smyd4*, e incluso otras especies tienen varios. Finalmente hay un grupo artrópodo específico, que contiene miembros de insectos y crustáceos, al que hemos denominado SmydA. Hay una pequeña rama que agrupa una secuencia de anfibio y otra de molusco. Los valores de *Bootstrap*, correspondientes a los árboles obtenidos mediante ML y NJ, de los grupos Smyd3, Smyd5 y SmydA son muy robustos, mientras que los que apoyan el grupo de Smyd4 son más débiles (Figura 21). Existe una evidencia adicional que apoya los grupos obtenidos. Aunque el alineamiento se realizó únicamente con la región que incluye los dominios SET-MYND (detallado en la sección correspondiente de Material y métodos), los dominios no incluidos en el alineamiento reflejan una organización muy similar de dominios dentro de cada uno de los cuatro grupos principales obtenidos (Figura 22). Por tanto, teniendo en cuenta la información filogenética y la organización de dominios proponemos la subdivisión de la familia de las Smyd en cuatro clases: tres clases presentes en todas las especies (Smyd3, Smyd4 y Smyd5), y una clase artrópodo-específica (SmydA).

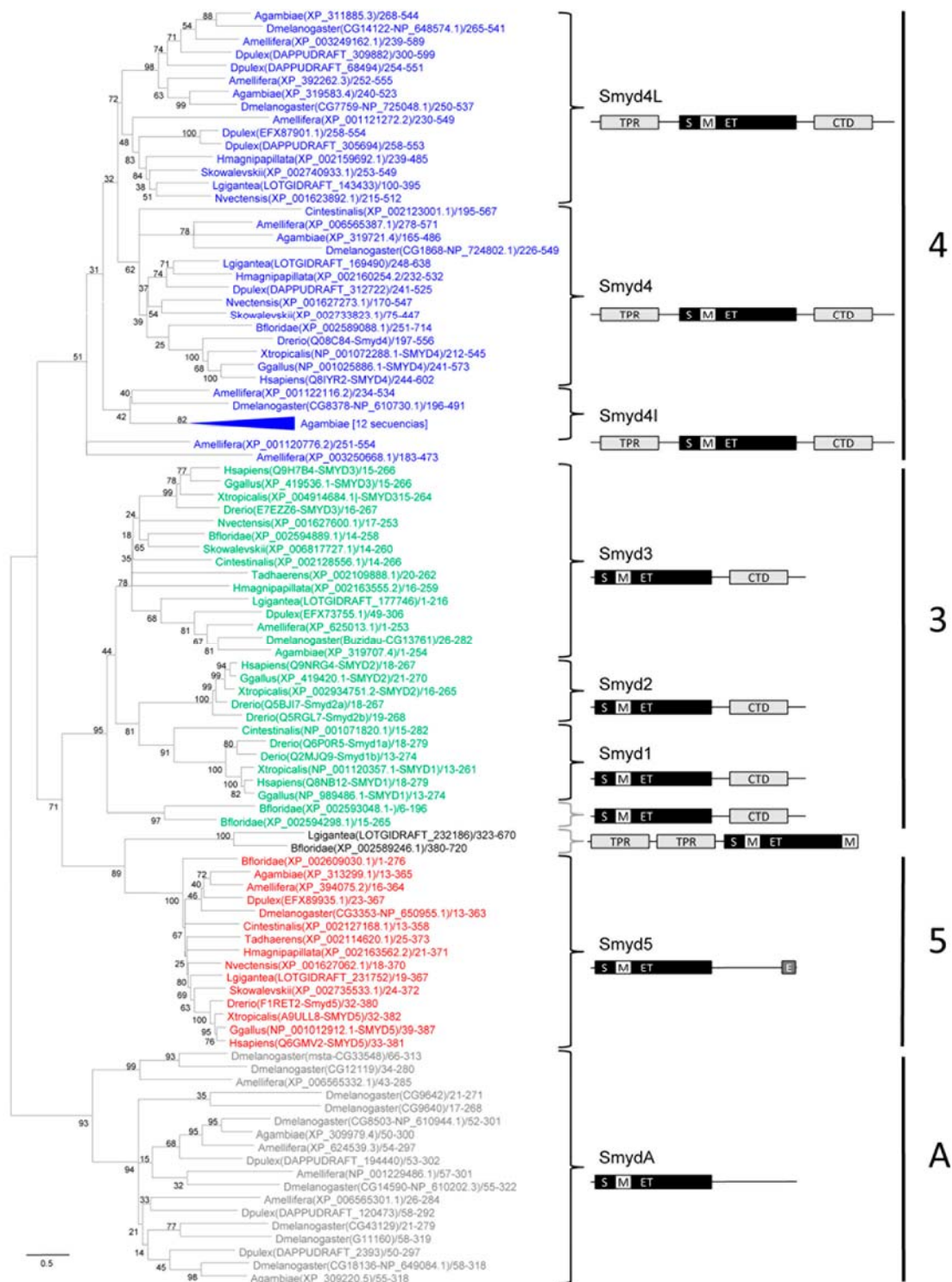


Figura 22. Filogenia de la familia Smyd en metazoos. Se muestra la reconstrucción filogenética obtenida mediante el método ML y los apoyos de *Bootstrap* de cada rama. Para cada secuencia se indica la especie, el identificador de la secuencia proteica y los residuos incluidos en el alineamiento. Se muestra comprimida la rama que contiene 12 secuencias de *A. gambiae*. Los corchetes agrupan las principales ramas con secuencias que presentan una estructura de dominios característico, que aparece ilustrado a su lado. Todas las secuencias se caracterizan por tener un dominio SET (caja negra indicada con S/ET) interrumpido por un dedo de Zn de tipo MYND (M). Los dominios C-terminal tipo TPR y los dominios TPR N-terminal aparecen en gris claro anotados como CTD y TPR respectivamente. Los dominios ricos en los aminoácidos Glu, Glu-Asp, o Glu-Asp-Ser se indican en gris oscuro anotado como E. A la derecha se indican las clases de Smyd definidas en base a la filogenia y a la organización de dominios.

Clase Smyd3

Nuestros resultados confirman lo que ya se vio para vertebrados, que las proteínas Smyd1 y Smyd2 son muy similares entre sí, y que ambas son muy parecidas a Smyd3. Smyd1 y Smyd2 son exclusivos de cordados y vertebrados respectivamente, y probablemente procedan de duplicaciones sucesivas de Smyd3. *Smyd3* sería el gen ancestral y está presente en todas las especies incluidas en el estudio. Además, *D. rerio* habría sufrido duplicaciones adicionales de Smyd1 y de Smyd2. La clase de Smyd3 también incluye dos secuencias adicionales específicas de *Branchiostoma* que probablemente surgieron a través de dos duplicaciones independientes de aquéllas que dieron lugar a Smyd1 y Smyd2. Esta clase está definida por la organización de dominios ya descrita para Smyd1-3 (Sirinupong et al., 2010, Spellmon et al., 2015), con los dominios SET y MYND en N-terminal y con un dominio tipo TPR en C-terminal.

Clase Smyd4

Ésta es la clase más compleja y extensa de la familia, y está formada por tres grupos principales. Los genes *Smyd4* de vertebrados están contenidos en una rama que incluye representantes de todas las especies excepto *T. adhaerens*, a la que hemos denominado grupo Smyd4. Además, todas las especies excepto *T. adhaerens* y los cordados, tienen al menos un segundo gen adicional similar a Smyd4 que hemos denominado grupo Smyd4L. Por lo tanto, es probable que todos los animales tengan una segunda copia de Smyd4 que se ha perdido en cordados, y que además se ha expandido a 2-4 copias en artrópodos. El grupo que hemos denominado Smyd4I incluye genes adicionales específicos de insectos, entre los que destacan las 12 secuencias del mosquito *A. gambiae* probablemente fruto de una expansión linaje-específica. En esta clase aparecen además dos secuencias adicionales de la abeja *A. mellifera*. Todas las secuencias incluidas en la clase de Smyd4 comparten una organización común de dominios y que es idéntica a la de Smyd4 de vertebrados, con un dominio TPR en N-terminal, seguido de los dominios SET y MYND, y con un dominio tipo TPR en C-terminal.

Clase Smyd5

Smyd5 es la clase más típica, con un único representante en todas las especies incluidas en el estudio. Todas las secuencias de este grupo tienen una organización de dominios común, caracterizada por la ausencia del dominio C-terminal tipo TPR que está presente en las clases Smyd3 y Smyd4, y por la presencia de un tracto característico en C-terminal. En vertebrados el tracto está conformado por repeticiones del aminoácido glutámico, mientras que en la mayoría de las especies está compuesto por los aminoácidos glutámico y aspártico, y en el caso de los más basales (Placozoa y Cnidaria), de serina, aspártico y glutámico.

Clase SmydA

Este grupo incluye secuencias artródo-específicas. Podría haberse generado por una serie de duplicaciones seguido de una rápida divergencia en el linaje de artrópodos. La región C-terminal es diferente al del resto de subfamilias de las Smyd.

Otras secuencias de Smyd

Dos secuencias (una de anfioxo y otra de molusco) son bastante divergentes, y por lo tanto, es difícil establecer su origen. Si se añaden secuencias de los moluscos *Crassostrea gigas* y *Aplysia californica*, no incluidos en el análisis anterior, aparecen secuencias que agrupan en esta rama particular. Además de la divergencia en los dominios SET y MYND,

presentan uno o dos dominios TPR en N-terminal, y adicionalmente presenta un dominio MYND extra en C-terminal.

3.2.3.2 Relaciones evolutivas con otras proteínas SET y MYND de especies no animales

Para intentar obtener más información acerca del origen de las diferentes clases de Smyd, extendimos la filogenia incluyendo secuencias Smyd de especies no animales. Buscamos proteínas Smyd en dos especies unicelulares basales a los animales, el coanoflagelado *Monosiga brevicollis* y el filasterea *Capsaspora owczarzaki*, donde hemos identificado 3 y 4 secuencias respectivamente.

En *Arabidopsis thaliana* se habían definido 5 posibles proteínas Smyd: ATXR1, ATXR2, ATXR4, ASHR1 y ASHR2 (Zhang and Ma, 2012). A través de búsquedas intensivas únicamente hemos identificado las cuatro últimas. Sin embargo, esto es consistente con que ATXR1, que no contiene ningún *Zn finger* (Zhang and Ma, 2012), no sea realmente una proteína Smyd. Por el contrario, identificamos adicionalmente la proteína TPR9 que sí cumple todos los criterios para ser una proteína SMYD, con sus dominios característicos SET y MYND. Se había propuesto que los SMYD de animales y plantas se originaron a partir de genes *SET* ancestrales, como los que dieron lugar a las proteínas SET5 y SET6 de levadura, y que únicamente tienen un dominio SET reconocible (Veerappan et al., 2008). Por tanto, decidimos incluir las proteínas SET5 y SET6 de *Saccharomyces cerevisiae* como posibles *outgroups*.

Sorprendentemente, los árboles obtenidos mediante NJ y ML, resumidos en la Figura 23 (árboles sin comprimir mostrados en el Anexo 6), revelan que las clases de Smyd3 y Smyd4 son anteriores a la aparición de los metazoos. Dentro de la clase Smyd3 encontramos un representante tanto en *A. thaliana* como en los dos parientes unicelulares de los metazoos (*M. brevicollis* y *C. owczarzaki*); mientras que en la clase Smyd4 encontramos representantes de *A. thaliana* y *M. brevicollis*. Además, estos agrupamientos están apoyados por la presencia y posición de los otros dominios no incluidos en el alineamiento, como son el dominio C-terminal tipo TPR presente en ellos, y el adicional dominio TPR N-terminal en el caso de las Smyd4.

No hay representante de Smyd5 en *A. thaliana*, aunque sí en *M. brevicollis* y *C. owczarzaki*, indicando que probablemente esta clase se originó después de la división de las plantas y los hongos, pero antes de la aparición de los metazoos. Estas dos nuevas secuencias en la clase de Smyd5 también presentan el tracto característico en C-terminal, rico en los aminonúcleos serina, aspártico y glutámico, como en las especies basales de animales. Una secuencia de *C. owczarzaki* agrupa en la rama atípica con secuencias de *L. gigantea* y *B. floridae*, y como éstas, también contiene el dominio TPR adicional en N-terminal, pero en cambio no presenta el dominio MYND adicional en C-terminal. El resto de secuencias de *A. thaliana*, las de *S. cerevisiae*, y una de *C. owczarzaki* no presentan dominios adicionales fuera de la región alineada. En el caso de las proteínas SET de *S. cerevisiae* es sorprendente que no aparezcan como *outgroups* en el árbol. Sin embargo, si se analizan en detalle las secuencias de estas proteínas se identifican posibles *Zn fingers* tipo MYND (Calpena et al., 2015), lo que indicaría que no son proteínas solo SET. De hecho, al menos la proteína SET5 de *S. pombe* se ha propuesto como una proteína SMYD (Wlodarski et al., 2011, Green et al., 2012).

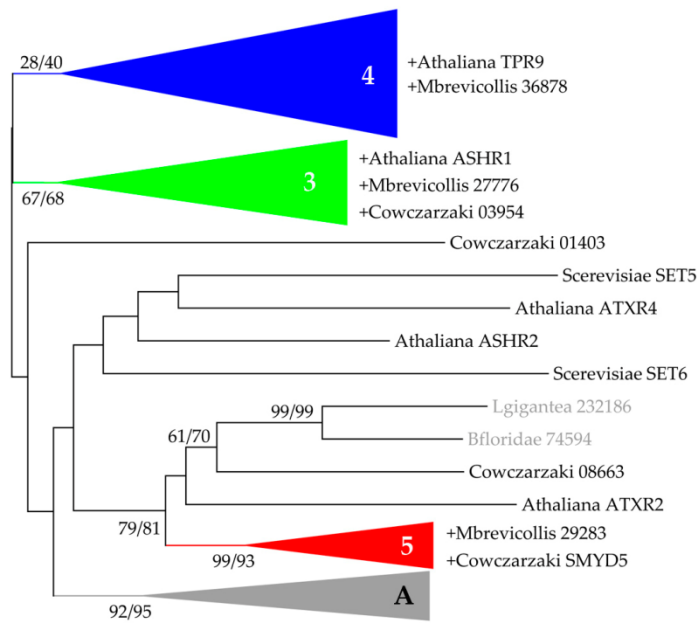


Figura 23. Análisis filogenético de la familia de proteínas Smyd incluyendo especies no animales. Los números en las ramas indican el apoyo obtenido mediante *Bootstrap* en ambos métodos (ML/NJ). Sobre las ramas comprimidas se muestra la clase de la subfamilia agrupada (3, 4, 5 o A). Se muestran en color negro las secuencias de especies no animales *C. owczarzaki*, *M. brevicollis*, la planta *A. thaliana* y la levadura *S. cerevisiae*, apareciendo la secuencia precedida de “+” cuando se incluye en una de las ramas comprimidas.

Nuestros resultados sugieren una historia evolutiva que ilustramos en la Figura 24. El agrupamiento de los árboles filogenéticos, así como las organizaciones de los dominio proteicos, apoyan la definición de tres clases de genes *Smyd* que ya estaban presentes en el ancestro de los metazoos: *Smyd3*, *Smyd4* y *Smyd5*, y por lo menos dos de ellos, *Smyd3* y *Smyd4* estaban ya presentes en etapas más temprana de la evolución en eucariotas, ya que también tienen representantes en las plantas. La existencia de proteínas *Smyd* en levaduras, tras el re-análisis de las secuencias SET5 y SET6 de *S. cerevisiae* (Wlodarski et al., 2011, Calpena et al., 2015), así como la presencia de la *SET and MYND domain-containing protein* SET6 en *S. pombe* (Veerappan et al., 2008), sugieren que los genes *Smyd* están presentes en todos los eucariotas.

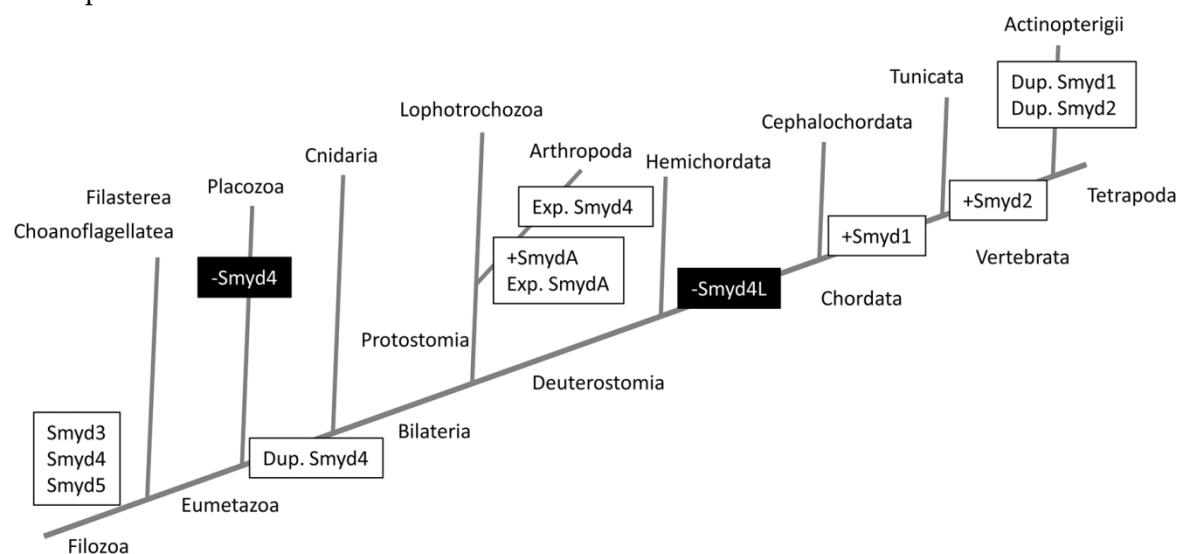


Figura 24. Historia evolutiva propuesta para los genes *Smyd* en metazoos. El árbol esquemático muestra la filogenia aceptada para los filos/subfilos representados en este trabajo. Partiendo de un ancestro original con un set de genes *Smyd*, que incluye *Smyd3*, *Smyd4* y *Smyd5*, indicamos con cuadros blancos los eventos más

probables de ganancia génica (+), duplicación (Dup.) o expansión (Exp.); mientras que en cajas negras, se indican los eventos más probables de pérdida de genes (-).

Dentro de los metazoos, las clases Smyd3 y Smyd5 tienen un linaje relativamente simple, ya que tienen un solo representante en cada especie, con la excepción de la expansión de Smyd3 en cordados para dar lugar a Smyd1 y Smyd2, y los dos genes adicionales de la clase Smyd3 en *B. floridae*. Aunque las relaciones evolutivas entre los cordados son controvertidas, recientes evidencias sugieren que los cefalocordados divergieron primero (Satoh et al., 2014, Telford et al., 2015). Nuestros resultados serían consistentes con este escenario (Figura 24), con el origen de Smyd1 en el ancestro común de los tunicados y los vertebrados, y de Smyd2 en los vertebrados. Ambos genes habrían sufrido una segunda duplicación en peces. La clase Smyd4 tiene una historia evolutiva más compleja. Esta clase se ha perdido en Placozoa, pero se ha duplicado en Eumetazoa, dando lugar a los grupos Smyd4 y Smyd4L. En los artrópodos ha habido una expansión del grupo Smyd4L, con una duplicación adicional, y la expansión en los insectos (Smyd4I). Por último, Smyd4L se perdió en el ancestro de los cordados, dejando el grupo Smyd4 como su único representante de esta clase. Además de la expansión de la clase Smyd4 en los insectos, los genomas de artrópodos contienen una clase adicional de genes *Smyd*, que hemos llamado SmydA. Estos genes no comparten dominios con otros genes *Smyd* fuera del núcleo SET-MYND, y también muestran una alta divergencia dentro de este núcleo. Se requieren más estudios para determinar cuál es el origen de esta clase así como para entender por qué los artrópodos han sufrido tal expansión.

Algunos de nuestros hallazgos están apoyados por un estudio independiente (Bonasio et al., 2010). En una comparación genómica de dos especies de hormigas, *Camponotus floridanus* y *Harpegnathos saltator*, los autores construyeron dos filogenias con una selección de especies de insectos y vertebrados que corresponden a lo que ellos denominaron como las familias SMYD1-3 y SMYD4. Aunque dicho estudio no es tan exhaustivo como el nuestro, ya que sus especies representan únicamente dos filos y no incluyeron secuencias de Smyd5, confirman algunas de nuestras conclusiones. Por ejemplo, el árbol muestra los mismos tres grupos en su familia de SMYD4 (nuestra clase Smyd4), con el gen *CG1868* de *D. melanogaster* como el homólogo más cercano del *SMYD4* humano (esto lo discutiremos más detalladamente en la siguiente sección). Su reconstrucción filogenética de la familia SMYD1-3, incluye dos grupos, uno que correspondería a nuestra clase Smyd3 y otro correspondiente al grupo SmydA, que contiene tres genes de cada especie de hormigas, y varias de las secuencias de insectos que nosotros hemos identificado.

Como resultado de nuestra filogenia y clasificación de los genes *Smyd*, se hace evidente que algunas de las asignaciones existentes de los nombres de genes no pueden ser compatibles. El trabajo de la comparación genómica de hormigas mencionado anteriormente es un primer ejemplo (Bonasio et al., 2010). Los autores describen diferencias en la expresión de un gen que llaman *SMYD3* (Hsal_14941, Cflo_06803), debido a su presencia en lo que incorrectamente identifican como una familia SMYD1-3. De hecho, esos genes pertenecen al grupo SmydA, y los verdaderos ortólogos de Smyd3 serían Hsal_08938 y Cflo_10149, los genes que agrupan con el *SMYD3* humano y *buzidau* de *D. melanogaster*. También hemos mencionado que un gen de *D. melanogaster* (*CG14122*) había sido identificado como el único homólogo del *SMYD4* humano (Thompson and Travers, 2008); sin embargo, nuestros resultados muestran que en *D. melanogaster* hay al menos cuatro representantes en la clase de Smyd4 que podrían considerarse homólogos de *SMYD4* (lo discutiremos en la siguiente sección). Estos dos ejemplos ponen de manifiesto los riesgos de intentar clasificar los genes en ausencia de una filogenia

rigurosa. Muy a menudo, y la familia de las proteínas SMYD ha sido un ejemplo de ello, las familias y subfamilias de genes se definen en función de los representantes que se encuentran en las especies de vertebrados, asumiendo en general que los vertebrados representan los genomas más complejos entre los metazoos.

3.2.3.3 Catálogo completo y clasificación de las proteínas Smyd en *D. melanogaster*

En *D. melanogaster* hemos identificado al menos 15 proteínas Smyd, que aparecen listadas y con su correspondiente grupo de Smyd asignado en la Tabla 9. Las proteínas Smyd de los grupos Smyd3 (1 miembro), Smyd4 (4 miembros) y Smyd5 (1 miembro), presentan una organización de dominios típica de los grupos a los que pertenecen. Más de la mitad de las Smyd en *D. melanogaster* corresponden al grupo de SmydA (9 miembros).

Tabla 9. Listado de genes *Smyd* identificados en *D. melanogaster*.

Gen	Nombre	Grupo
CG13761	<i>buzidau</i>	Smyd3
CG1868		Smyd4
CG14122	<i>dSmyd4</i>	
CG7759		
CG8378		
CG3353		Smyd5
CG8503		SmydA
CG9640		
CG9642		
CG11160		
CG12119		
CG14590		
CG18136		
CG33548	<i>msta</i>	
CG43129 / CG17086		

Las relaciones entre las proteínas Smyd de cordados y sus posibles ortólogos en *D. melanogaster* parecen claras en el caso de los grupos de Smyd3 y de Smyd5. Sin embargo, el caso del grupo de Smyd4, el grupo que más nos interesa, es algo más complejo debido a la existencia de cuatro miembros del grupo de Smyd4 en *D. melanogaster* y un único representante en cordados. Para tratar de clarificar las relaciones evolutivas de los miembros del grupo de Smyd4, se llevaron a cabo análisis filogenéticos específicos con secuencias únicamente de este grupo (Figura 25). Por otro lado, se llevó a cabo un estudio filogenético adicional en el que se usaron únicamente las regiones más conservadas seleccionadas mediante la herramienta GBlocks (Castresana, 2000), a partir del alineamiento que incluyen los dominios SET, MYND y Post-SET de estas secuencias (Anexo 7). Los resultados obtenidos (Figura 25) confirman lo que anteriormente habíamos observado (Figura 22 y Tabla 9). El representante de *D. melanogaster* que agrupa con el subgrupo denominado Smyd4, y que incluye las secuencias de cordados, es el correspondiente al gen CG1868. Esto también se ve plasmado en los resultados del análisis de las regiones más conservadas (Anexo 7). Los genes CG7759 y CG14122 quedarían incluidos en el subgrupo de Smyd4L, mientras que el CG8378 pertenecería al subgrupo Smyd4I específico de insectos (Figura 25).

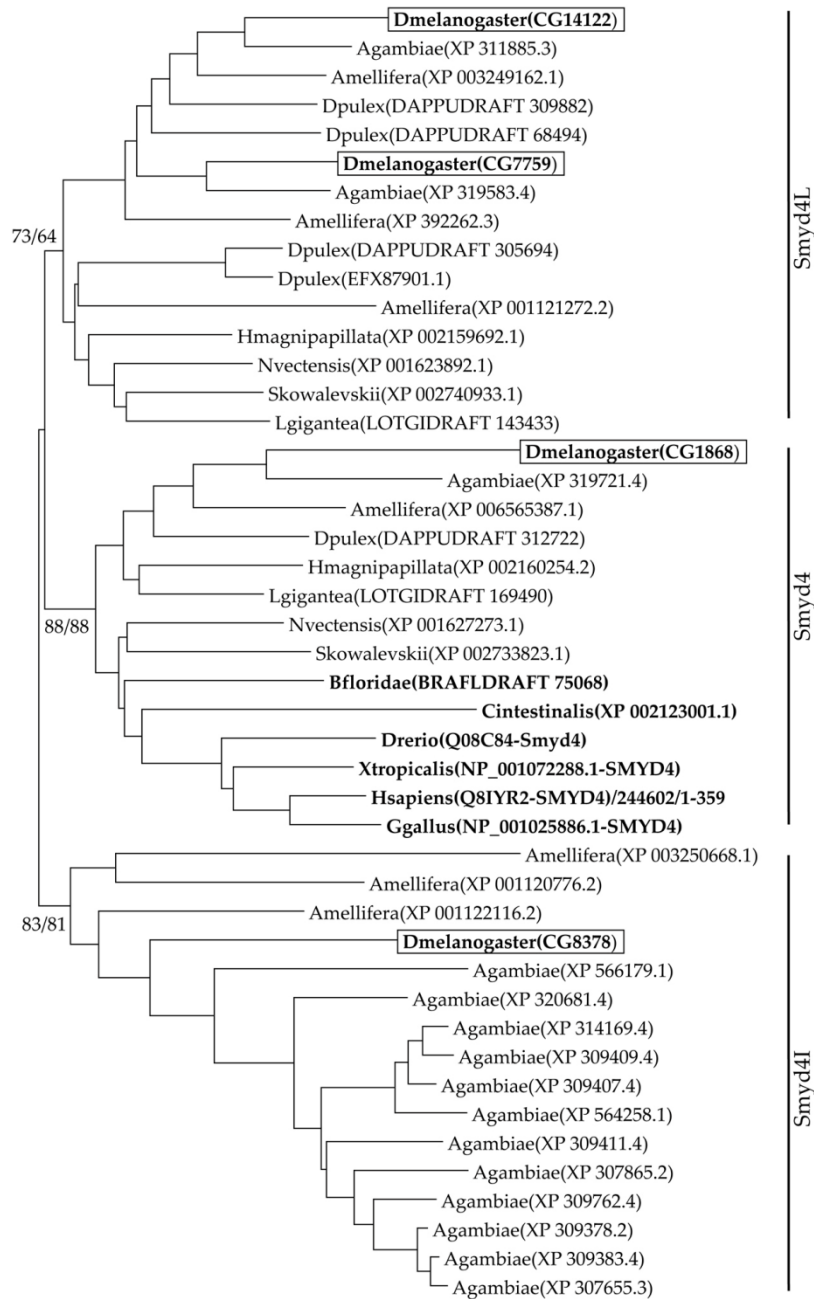


Figura 25. Análisis filogenético de los miembros del grupo de Smyd4. Por simplicidad, sólo en las ramas principales se muestran los apoyos obtenidos mediante *Bootstrap* (ML/NJ) a partir de los dos métodos de reconstrucción filogenética ML y NJ. Se señalan en recuadros los miembros de Smyd4 de *D. melanogaster* y resaltados en negrita los de cordados.

Teniendo en cuenta la presencia de diferentes subgrupos en Smyd4, posiblemente debido a duplicaciones, resulta complicado establecer relaciones de ortología de forma inequívoca. Es por ello que probablemente lo más riguroso sería considerar que en *D. melanogaster* hay al menos cuatro homólogos del gen *SMYD4* humano, y que según nuestros resultados, el más cercano podría ser *CG1868*. Pero en ningún caso debe considerarse que existe un único homólogo del gen *SMYD4* humano en *D. melanogaster*, como se había considerado hasta ahora con el gen *CG14122* (Thompson and Travers, 2008).

3.2.3.4 Caracterización funcional de los genes *Smyd4* de *Drosophila melanogaster*

La reconstrucción filogenética nos ha permitido conocer que los genes del grupo de *Smyd4* comparten un ancestro y una organización de dominios común, pero no nos informa de su relevancia funcional. Además, la presencia de cuatro copias de *Smyd4* en *D. melanogaster* podría deberse a diversos motivos, como a una necesidad de mantener niveles de expresión, a una subdivisión anatómica de su función o a una subfuncionalización. Con el fin de ahondar en esta cuestión nos propusimos por un lado estudiar sus patrones de expresión, para saber si se expresan o no en los mismos tejidos, y por otro lado, estudiar el efecto de silenciar específicamente estos genes, para saber si son redundantes.

Para comparar el perfil transcripcional de los genes *Smyd4* en *D. melanogaster* empleamos dos aproximaciones complementarias. En primer lugar, comparamos la información de dónde y cuándo se expresan estos genes a partir de datos de expresión génica *high-throughput* de *D. melanogaster* disponibles (FlyAtlas y modENCODE). En segundo lugar, llevamos a cabo hibridaciones *in situ* en embriones en desarrollo usando sondas específicas para cada uno de los cuatro genes *Smyd4* de *D. melanogaster*. Al comparar los perfiles de expresión de los datos de *high-throughput* (Figura 26 A-D, A'-D'), vemos que el perfil del gen *CG1868* es muy parecido al del *CG8378*; y el del *CG14122* al del *CG7759*. Por tanto, por similitud podemos distinguir dos grupos con una modulación espacio-temporal característica: *CG1868* con *CG8378*, y *CG14122* con *CG7759*.

Los resultados de los patrones de expresión obtenidos mediante hibridación *in situ* revelan los mismos grupos. En embriones en estadio de banda germinal extendida, los genes *CG1868* y *CG8378* se expresan más intensamente en los primordios del sistema nervioso central cefálico y del intestino posterior (Figura 26 3A'', B''), y en embriones en estadio 16, la expresión es evidente en el CNS, en el intestino y en músculo somático derivado del mesodermo (Figura 26A''', B'''). En cambio, los genes *CG14122* y *CG7759* se expresan en mesodermo tanto en embriones en estadio de banda germinal extendida (Figura 26C'', D'') como en embriones de estadio 16 (Figura 26C''', D'''). El patrón de expresión observado para el gen *CG14122* confirma los resultados previamente descritos (Thompson and Travers, 2008).

Anteriormente vimos que la clase *Smyd4* ha sufrido una extensa expansión en las especies de artrópodos. Nuestros resultados parecen reflejar que se ha producido una expansión y a un ritmo más rápido de divergencia de los genes de artrópodos dentro del grupo *Smyd4L*, de manera que forman un subgrupo independiente con más de un representante; y un evento más dramático del mismo tipo en el origen del grupo de *Smyd4I*. Si tenemos en cuenta los perfiles de expresión de estos genes en *D. melanogaster*, es más probable que *Smyd4I* se haya originado a partir de *Smyd4*, ya que comparten los perfiles de expresión anatómicos, temporales y del desarrollo.

Si prestamos atención a las magnificaciones de la hibridación *in situ* de *Smyd4* en embrión de ratón, como especie representativa de vertebrados, se detecta expresión relativamente baja en mesodermo y en sistema digestivo (Figura 26E, F) y con mayor intensidad en el sistema nervioso: médula espinal, DRG y cerebro (Figura 26F, G), como ya habíamos comentado en anterioridad. Por lo tanto, el patrón general de expresión de *Smyd4* de ratón, parece más reminiscente del observado para los genes *CG1868* y *CG8378* de entre los genes *Smyd4* de *D. melanogaster*. Por lo que, en su conjunto, en base a los

resultados de los estudios filogenéticos y de patrón de expresión, el gen *CG1868* parece ser el candidato a homólogo más cercano del gen *SMYD4* humano.

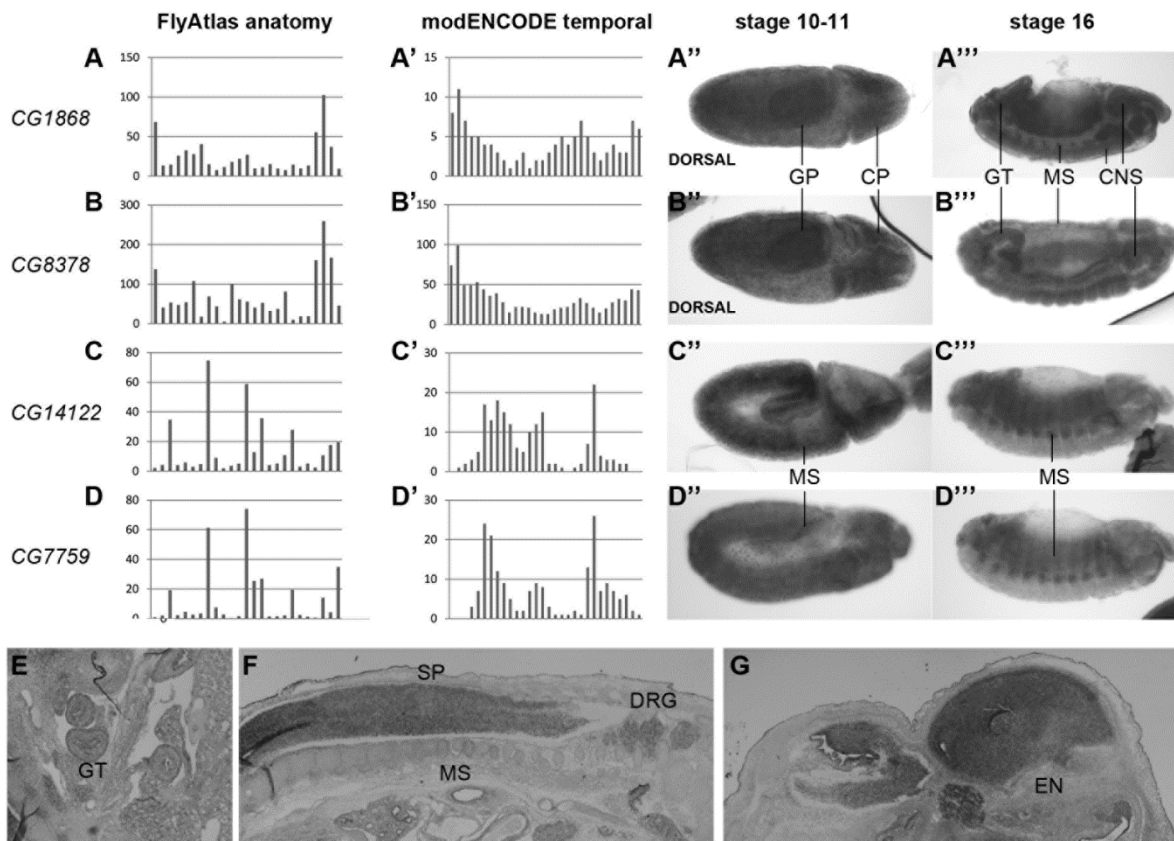


Figura 26. Perfil de expresión de los genes de la clase *Smyd4* en *D. melanogaster* y en ratón. Se muestra el estudio de expresión de los genes *Smyd4* de *D. melanogaster* *CG1868* (A-A'''), *CG8378* (B-B'''), *CG14122* (C-C''') y *CG7759* (D-D'''), y de *M. musculus* (E-G). En el caso de los genes de *D. melanogaster* se representan los datos *high-throughput* del perfil de expresión anatómico de FlyAtlas (A-D), que contiene los niveles de expresión de cada gen en una colección de 25 tejidos de larva y adulto; y del perfil de expresión temporal de modENCODE (A'-D'), correspondiente a los niveles de expresión en 30 tiempos diferentes a lo largo del desarrollo, desde la fertilización hasta el individuo adulto. Los tejidos y los tiempos están indicados en la sección de Material y métodos correspondiente. Para estos genes adicionalmente determinamos el patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en embriones en estadio de banda germinal extendida (A''-D''), y en embriones en estadio 16 (A'''-D'''). Para comparar, se muestran magnificaciones de la hibridación *in situ* en cortes de embrión de ratón de la expresión de *Smyd4* mostrada en la Figura 9. Las magnificaciones corresponden con la zona abdominal (E), el tronco dorsal (F) y la cabeza (G). Abreviaturas usadas para los tejidos donde se detecta expresión empleando acrónimos del inglés: GP, *gut primordium*; CP, *cephalic primordium of the central nervous system*; GT, *gut*; MS, *mesoderm*; CNS, *central nervous system*; SP, *spinal cord*; DRG, *dorsal root ganglia*; EN, *encephalon*.

Se sabe muy poco sobre la proteína *Smyd4* en vertebrados. En *D. melanogaster*, las cuatro proteínas de la clase de *Smyd4* presentan un patrón principalmente citoplasmático cuando se sobreexpresan en células S2 (Thompson and Travers, 2008). Teniendo en cuenta que los genes *Smyd4* de *D. melanogaster* en su conjunto se expresan en mesodermo y en sistema nervioso, quisimos comparar el patrón subcelular de la proteína *SMYD4* humana (*hSMYD4*-GFP) cuando se sobreexpresa específicamente en estos tejidos mediante el sistema Gal4/UAS.

Cuando se expresa *hSMYD4*-GFP en neuronas, mediante el *driver* *Elav*-Gal4, se observa un patrón predominantemente citoplasmático (Figura 27A), similar al observado para las proteínas *Smyd4* de *D. melanogaster* en las células S2 (Thompson and Travers, 2008), y al que habíamos obtenido nosotros al sobreexpresar *hSMYD*-GFP en diferentes líneas

celulares de mamíferos (Figura 12). Sin embargo, cuando se expresa hSMYD4-GFP en músculo, mediante el *driver* Mhc-Gal4, aparece en el núcleo de las células musculares, pero adicionalmente en el citoplasma con un patrón bandeado tanto en tejido muscular de larva (Figura 27B) como de mosca adulta (Figura 27C). El marcaje con Faloidina fluorescente, que se une a la actina-F, permite determinar que hSMYD4 se localiza en el sarcómero muscular, donde se concentra en la línea M (banda H), pero también está presente en la línea Z (banda I) (Figura 27C).

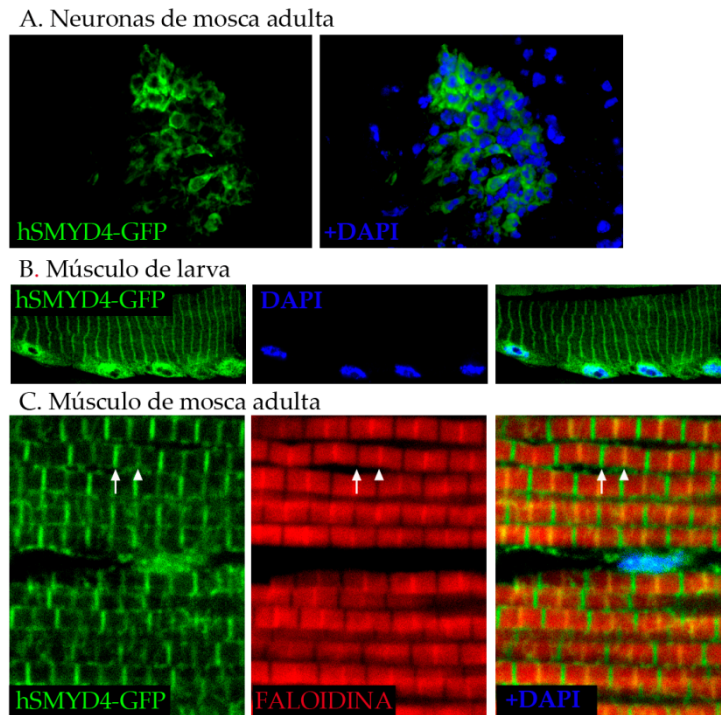


Figura 27. Localización de la proteína humana hSMYD4-GFP sobreexpresada en tejidos de mosca. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la localización de hSMYD4-GFP (canal verde) sobreexpresada específicamente en neuronas mediante el *driver* Elav-Gal4 (A) o en músculo mediante el *driver* Mhc-Gal4 (B y C). Los tejidos fueron marcados con DAPI (canal azul) para la visualización de los núcleos y en C también con Faloidina conjugada con rodamina (canal rojo), que se une a la actina-F. (A) En secciones de criostato de la cabeza de mosca, hSMYD4-Gal4 se localiza en el citoplasma de las neuronas. Se observa un patrón nuclear y citoplasmático bandeado de hSMYD4-GFP en tejido muscular de larva (B) y en criosecciones del músculo indirecto de vuelo de mosca adulta (C), que corresponde con la línea M (flecha) y, en menor intensidad, con la línea Z (punta de flecha)

La localización de proteínas SMYD en el sarcómero ha sido identificada con anterioridad en vertebrados (Du et al., 2014), aunque nunca antes había sido descrita para SMYD4 en ningún organismo. En músculo cardíaco y esquelético, Smyd1 es esencial para la organización del sarcómero (Just et al., 2011), localizándose en el núcleo y en la línea M sarcomérica (Just et al., 2011, Li et al., 2011), donde interacciona con la proteína Miosina y regula su estabilidad junto las chaperonas Hsp90 y Unc45b (Li et al., 2013a). Adicionalmente, Smyd2 y la Hsp90 metilada por Smyd2, forman un complejo con el dominio N2A de la proteína sarcomérica titina en la banda I, favoreciendo su estabilización tanto en músculo cardíaco como esquelético (Donlin et al., 2012, Voelkel et al., 2013).

Aunque la localización observada para la proteína hSMYD4 en músculo se debe a una expresión ectópica, el resultado tiene dos importantes implicaciones. Por un lado, que la proteína SMYD4 humana es capaz de interactuar con proteínas sarcoméricas en *D. melanogaster*, por lo que estos interactores deben ser proteínas suficientemente conservadas y que probablemente alguna de ellas sean las equivalentes con las que

interaccionan otras Smyd en el sarcómero en vertebrados. Y por otro lado, dado que anteriormente hemos mostrado que Smyd4 en mamíferos se expresa en músculo, tanto a nivel de transcrito como de proteína, es muy posible que también se localice en el sarcómero, si bien, desconocemos si tendría un papel tan relevante en su organización como el demostrado para Smyd1 y Smyd2 en vertebrados (Du et al., 2014).

En las proteínas SMYD la localización diferencial entre núcleo y citoplasma parece regulada por el tiempo en el desarrollo así como por el tipo de tejido (Sims et al., 2002, Thompson and Travers, 2008, Berkholz et al., 2014), poniendo en evidencia que no son únicamente proteínas con función de reguladores transcripcionales en el núcleo, y que la diversidad de funciones que se han venido atribuyendo a esta familia de proteínas en núcleo y/o citoplasma (Leinhart and Brown, 2011, Du et al., 2014), deben estar reguladas de una forma espacio-temporal.

Con el fin de determinar la relevancia funcional de cada uno de los genes *Smyd4* en *D. melanogaster*, y para comprobar si son redundantes o no, llevamos a cabo el silenciamiento de la expresión de cada uno de los cuatro genes de la clase Smyd4. El fundamento se basa en que si estos genes son redundantes, la interferencia de cada gen individual no debería dar lugar a un fenotipo anormal. La expresión del RNAi para silenciar de forma ubicua y temprana mediante el *driver* Act5c-Gal4, produce una fuerte reducción de la viabilidad en el caso de los genes *CG1868* y *CG14122*; mientras que para los otros dos genes sólo hay una leve disminución de la viabilidad, siendo más evidente para *CG7759* (Figura 28). Por tanto, al menos los genes *CG1868* y *CG14122*, no son redundantes, son esenciales para el desarrollo normal de *D. melanogaster*, y corresponden a un representante de cada uno de los dos grupos transcripcionales que anteriormente habíamos observado (Figura 26). La letalidad debida al silenciamiento del gen *CG14122* fue previamente descrita (Thompson and Travers, 2008), aunque empleando otras líneas de moscas de RNAi, por lo que nuestros resultados confirman sus observaciones.

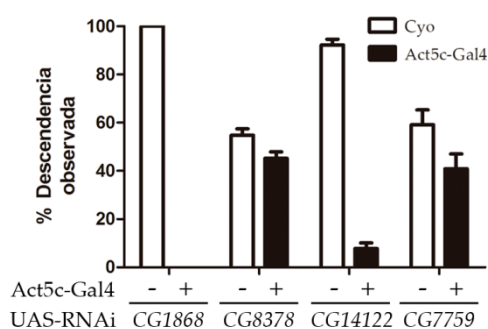


Figura 28. Estudio de viabilidad del silenciamiento de los genes *Smyd4* en *D. melanogaster*. Mediante el sistema Gal4/UAS se silenció la expresión de cada uno de los genes *Smyd4* en toda la mosca, usando el *driver* Act5c-Gal4; se cruzaron moscas Act5c-Gal4/Cyo;UAS-Dcr2 con diferentes líneas de mosca conteniendo en homocigosis el RNAi específico para cada gen *Smyd4*. En el gráfico se muestra la media de la descendencia observada (en %) a partir de dos cruces independientes, en los que se analizaron un total de 418, 464, 264 y 622 individuos en la descendencia de los cruces del RNAi de los genes *CG1868*, *CG8378*, *CG14122* y *CG7759* respectivamente. Las barras blancas corresponden a individuos que no portan el *driver* Act5c-Gal4 y que por tanto no expresan el RNAi, mientras que las barras negras indican aquellos individuos que llevan el *driver* y por tanto, en los que se produce el silenciamiento de los genes indicados. Si no se afectara a la viabilidad, se esperaría en la descendencia que la mitad de las moscas nacidas fueran Cyo y la otra mitad no Cyo (que expresasen el RNAi).

La multiplicidad de genes *Smyd4* en *D. melanogaster* plantea la pregunta de por qué tantos de ellos. Hemos comprobado que los patrones de expresión de los cuatro genes están altamente regulados y que no se superponen completamente, lo que en principio descartaría que su expansión se deba únicamente para asegurar altos niveles de

expresión. Los experimentos de *knock-down* indican que no hay redundancia funcional entre todos ellos, ya que el silenciamiento de los genes individuales siempre resulta en alguna clase de fenotipo (ya sea afectando la viabilidad o provocando otros fenotipos, como se verá en la siguiente sección). En un análisis de RNAi sistemático de todo el genoma en *Caenorhabditis elegans*, se vio que el enmascaramiento de fenotipo por genes duplicados era menos común de lo esperado (Woods et al., 2013). Puede que la expansión de la clase *Smyd4* tenga un valor adaptativo en el linaje de los artrópodos, y que las diferentes copias de *Smyd4* hayan sufrido una especialización anatómica o molecular. Al igual que se ha evidenciado para otros miembros de la familia *Smyd* en vertebrados (Leinhart and Brown, 2011), es posible que la clase *Smyd4* tenga un papel importante en el control epigenético de la expresión génica. De hecho, en hormigas se han encontrado diferencias en la expresión de genes *Smyd* en función de la casta y la etapa del desarrollo; así, por ejemplo, identificaron la sobreexpresión de un homólogo de *Smyd4* (Hsal_08142) en hormigas obreras no reproductoras (Bonasio et al., 2010). Por otro lado, el gen *CG14122*, uno de los homólogos de *SMYD4* en *D. melanogaster*, puede actuar como represor transcripcional interactuando con proteínas HDACs (Thompson and Travers, 2008). En su conjunto, los genes *Smyd* parecen tener un papel crucial en el control transcripcional también en invertebrados, como bien se ha demostrado para el homólogo de *SMYD5* en *D. melanogaster* (*CG3353*) (Stender et al., 2012).

3.2.3.5 Los genes *Smyd4* de *D. melanogaster* son importantes para el desarrollo normal del PNS

En *D. melanogaster*, la retina es parte del sistema nervioso periférico y es ampliamente empleada como modelo para estudiar neurodegeneración (Hirth, 2010). Con el fin de determinar si los genes *Smyd4* en *D. melanogaster* tienen algún papel en el PNS, llevamos a cabo el silenciamiento específico de la expresión de cada uno de los diferentes genes *Smyd4* en el ojo de *D. melanogaster*, mediante el *driver* GMR-Gal4, para analizar la morfología externa del ojo en moscas jóvenes, de menos de una semana de edad (Figura 29) y en moscas de cinco semanas de edad (Figura 30). En el control (fila superior de las Figuras 29 y 30), se puede observar la morfología externa normal del ojo compuesto, con las lentes en forma de cúpula en una disposición de mosaico hexagonal y con las quetas interommatidiales. El silenciamiento específico de cada uno de los genes *Smyd4* afecta a la apariencia externa del ojo, aunque el grado de afectación varía en función del gen silenciado. El fenotipo más fuerte se obtiene con el RNAi del gen *CG1868*, donde se observa una gran desorganización en comparación con el control, e incluso aparecen eventos de fusión de ommatidios, así como la falta de quetas (tanto por desocupación como por inexistencia). El fenotipo más sutil se observa en el RNAi del gen *CG8378*, con una leve desorganización y con la presencia de ommatidios no hexagonales. El fenotipo observado tanto para el RNAi del *CG14122* como del *CG7759* es intermedio a los anteriores, con desorganización, ommatidios irregulares, con pérdida de quetas e incluso alguna presencia de quetas supernumerarias. Los fenotipos se ven ligeramente potenciados en moscas de mayor edad (Figura 30) debido posiblemente a los efectos adicionales del envejecimiento.

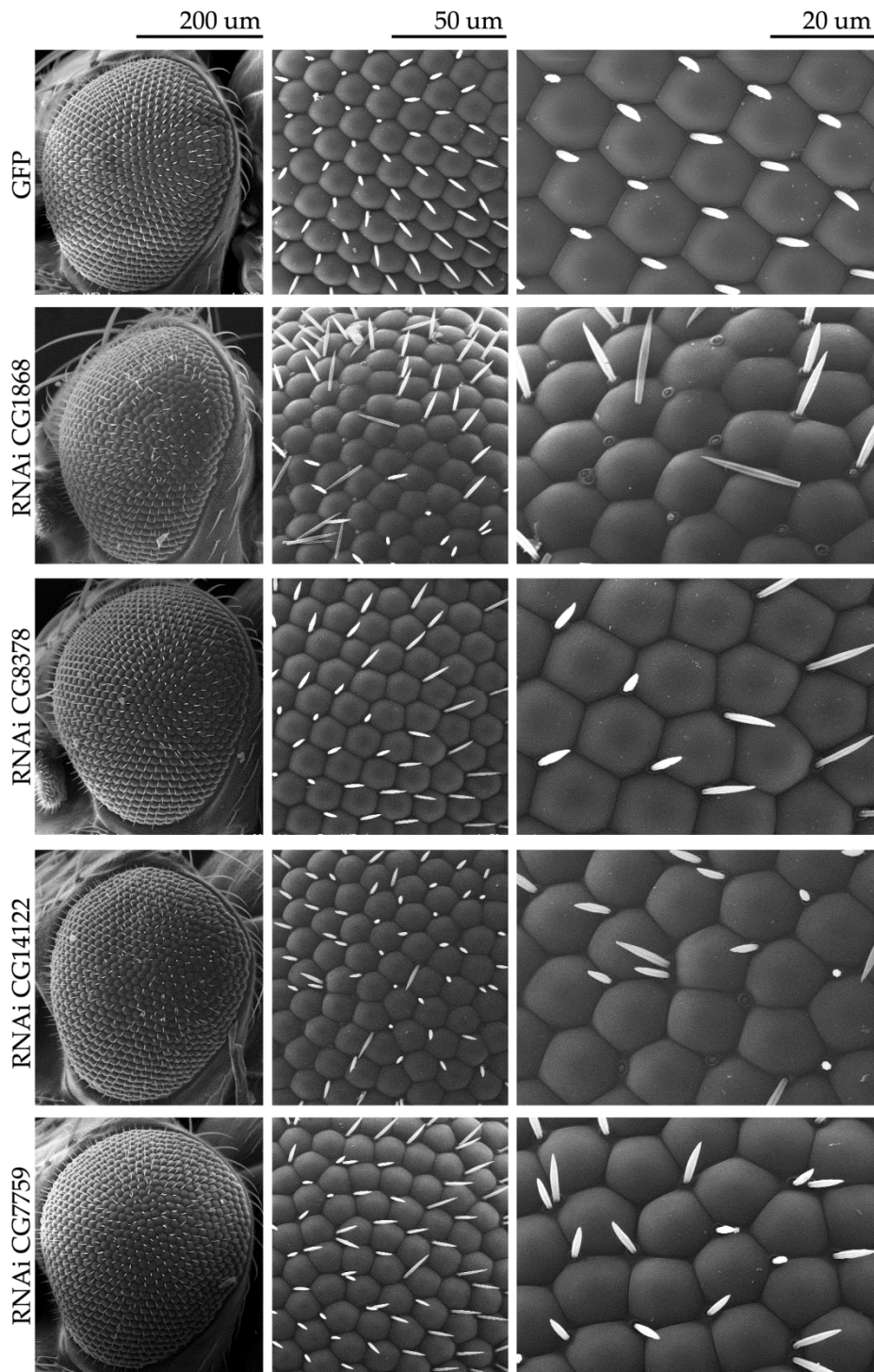


Figura 29. Alteración de la morfología externa del ojo en moscas de menos de una semana debido al silenciamiento de los genes *Smyd4*. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del ojo de moscas que sobreexpresan en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4, los RNAi de cada uno de los genes indicados. Como control se ha empleado la sobreexpresión de GFP. Se muestran tres magnificaciones diferentes para cada uno de los genotipos.

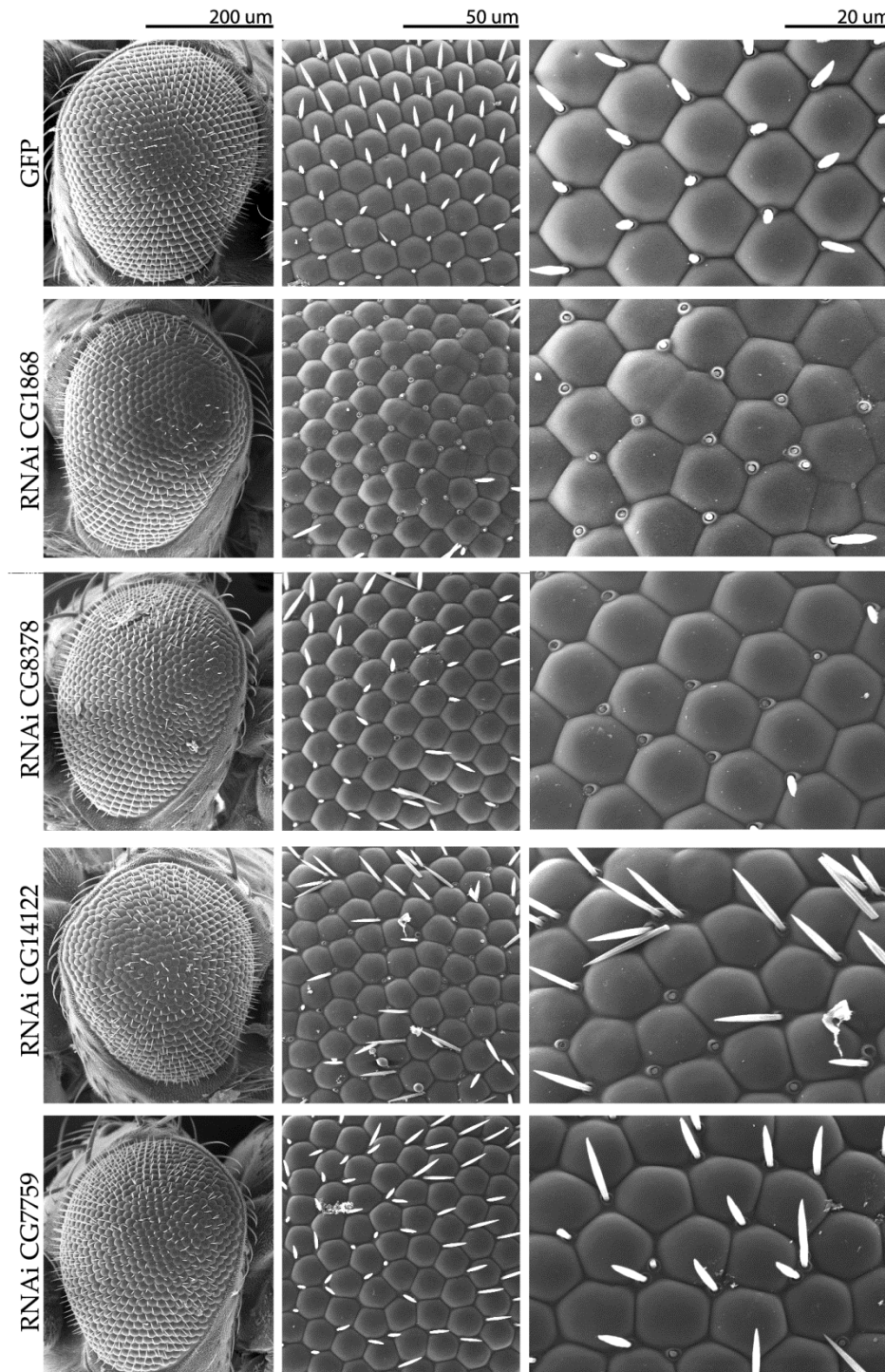


Figura 30. Alteración de la morfología externa del ojo en moscas de cinco semanas debido al silenciamiento de los genes *Smyd4*. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del ojo de moscas que sobreexpresan en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4, los RNAi de cada uno de los genes indicados. Como control se ha empleado la sobreexpresión de GFP. Se muestran tres magnificaciones diferentes para cada uno de los genotipos.

Habiendo analizado el efecto sobre la superficie externa del ojo, quisimos comprobar cuáles son las consecuencias en la parte interna del ojo analizando cortes semifinos. Cada ommatidio está conformado por neuronas fotorreceptoras y células accesorias. Los fotorreceptores se caracterizan por sus rabdómeros y que son fácilmente reconocibles mediante microscopía a partir de cortes semifinos. En un ojo normal en *D. melanogaster*, en cada plano de corte se identifican siete neuronas fotorreceptoras por ommatidio (Figura 31).

Sin embargo, tomando como referencia el gen *CG1868* como representante de *Smyd4*, su silenciamiento provoca pérdida de fotorreceptores y degeneración de los omatidios (Figura 31).

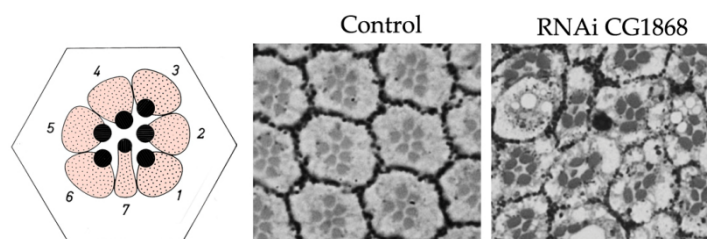


Figura 31. Análisis de los omatidios. En la parte de la izquierda se muestra una representación de un omatidio (modificado de Katz y colaboradores (Katz and Minke, 2009)), en los que se identifican los rabdómeros de los siete fotorreceptores presentes en cada plano de corte. A la derecha se observa una imagen correspondiente a cortes semifinos de ojos de moscas de cinco semanas en los que se ha interferido en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4, la expresión del gen *CG1868*. Como control se han empleado moscas wt (OrR).

Los resultados obtenidos sugieren que los genes *Smyd4* son importantes para el desarrollo normal del ojo de *D. melanogaster*, usado como modelo del PNS. Además, en este tejido ninguno de los cuatro genes *Smyd4* de *D. melanogaster* parecen dispensables, ya que el silenciamiento de cada uno de ellos provoca alteraciones en la morfología externa del ojo. Teniendo en cuenta que la pérdida o alteración de los rabdómeros refleja la neurodegeneración de las neuronas fotorreceptoras (Sang and Jackson, 2005), el fenotipo observado evidencia el papel de *Smyd4* en el PNS, al menos en *D. melanogaster*. Hasta la fecha no se ha definido ningún papel de las proteínas *Smyd* en sistema nervioso, sin embargo, existen evidencias que sugieren un posible papel en dicho tejido. En el trabajo de Liu y colaboradores, en la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a al inducir su diferenciación por gangliósidos mediante la sobreexpresión de GD3 sintasa, de entre los diez genes que identificaron en los que aumentaba su expresión, aparece el transcrito denominado *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 4 (GDAP4)*, codificado por el locus de *Smyd4* (Liu et al., 1999). En este mismo estudio se identificó *GDAP1*, gen cuyas mutaciones son responsables de varias formas de la neuropatía de CMT (Cuesta et al., 2002, Claramunt et al., 2005). Además, el hecho de que la supresión de *SMYD4* en humanos esté relacionada con el desarrollo de un tipo de tumor cerebral denominado meduloblastoma (Northcott et al., 2009), hace pensar que pueda desempeñar alguna función en dicho tejido. Ciertos hallazgos en *SMYD5* también suponen una prueba de ello. *SMYD5* fue inicialmente identificado como un gen de respuesta al ácido retinoico (Shago and Giguere, 1996), una molécula implicada, entre otras funciones, en el desarrollo, regeneración y mantenimiento del sistema nervioso (Maden, 2007). Alteraciones del homólogo de *SMYD5* en *D. melanogaster* (*CG3353*), produce defectos en el número de neuronas de los denominados *mushroom bodies*, unas subestructuras del cerebro de *D. melanogaster* esenciales para la memoria (Nicolai et al., 2003). Con todo, es posible que en vertebrados, los genes *SMYD* también puedan tener un papel relevante en el sistema nervioso.

3.2.3.6 La sobreexpresión de la proteína humana *SMYD4* WT o la forma mutante p.K82E, provoca la pérdida de fotorreceptores

Analizamos el efecto de la sobreexpresión de hSMYD4 WT o la forma mutante p.K82E en el ojo de *D. melanogaster* utilizando la línea GMR-Gal4. Si tiene algún efecto adverso sobre los fotorreceptores, se producirá la degeneración de este tipo neuronal, lo que

permitirá observar un número menor de fotorreceptores por omatidio en los ojos adultos. Como se puede ver en la Figura 32, la sobreexpresión tanto de hSMYD4 como de la proteína mutante p.K82E provoca la pérdida de fotorreceptores en comparación con el control. Este resultado sugiere que un exceso de función de SMYD4, como el producido mediante su sobreexpresión, resulta perjudicial en el ojo de *D. melanogaster*, produciendo cierta neurodegeneración. Sin embargo, no se observan diferencias cualitativas entre los efectos producidos por la sobreexpresión de la forma mutante SMYD4 p.K82E respecto de la forma WT.

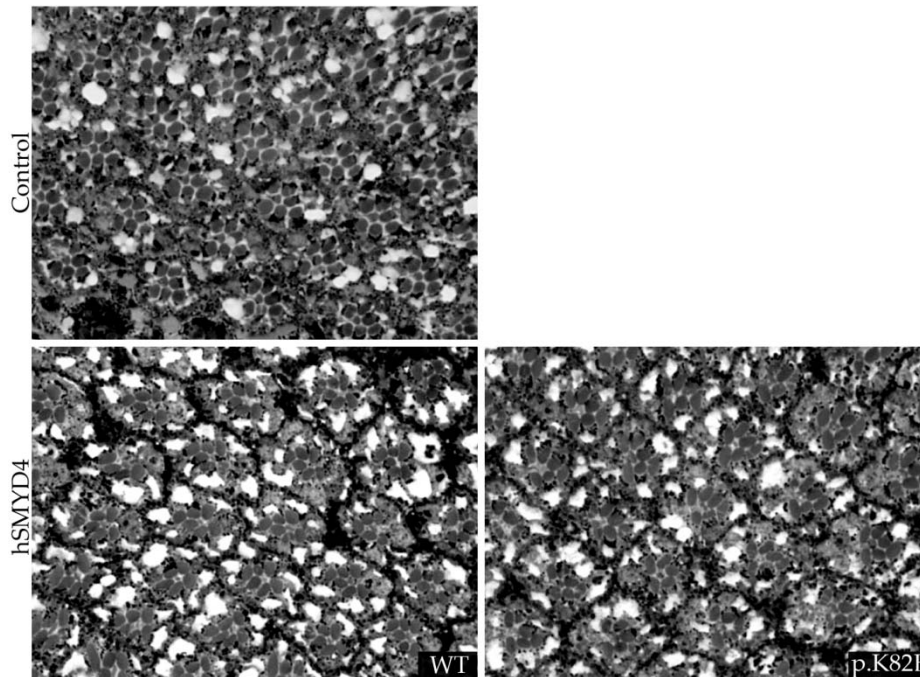


Figura 32. Análisis de fotorreceptores. Cortes semifinos de ojo de moscas adultas de 5 semanas que sobreexpresa en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4, hSMYD4 WT o p.K82E. Como control se ha empleado la sobreexpresión de GFP.

Las proteínas SMYD son reguladores fundamentales del desarrollo y función del músculo esquelético y cardíaco (Du et al., 2014). Actualmente tienen una gran relevancia en patología por su implicación en cáncer., ya que su expresión se ha visto desregulada en múltiples tipos de cáncer (Hu et al., 2009, Komatsu et al., 2009, Cho et al., 2012, Luo et al., 2014, Mazur et al., 2014, Sakamoto et al., 2014). La expresión de SMYD2 está incrementada en carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC, acrónimo en inglés) y en cáncer relacionados con p53, y su silenciamiento inhibe la proliferación celular tumoral (Komatsu et al., 2009, Cho et al., 2012, Sakamoto et al., 2014, Komatsu et al., 2015). SMYD3 está sobreexpresado en más de 14 tipos de cáncer, como cáncer de mama, colon, próstata, pulmón y de páncreas (Hamamoto et al., 2004, Hamamoto et al., 2006, Wang et al., 2008b, Luo et al., 2009, Luo et al., 2010, O'Byrne et al., 2011, He et al., 2012, Liu et al., 2013, Dong et al., 2014, Luo et al., 2014, Sponziello et al., 2014, Vieira et al., 2014). Su sobreexpresión se correlaciona con un mal pronóstico, y se ha demostrado que su represión inhibe el crecimiento tumoral (Hamamoto et al., 2004, Chen et al., 2007, Luo et al., 2009, Luo et al., 2010, He et al., 2012, Josse et al., 2012, Dong et al., 2014, Sponziello et al., 2014). Es por ello que se han convertido en nuevas dianas terapéuticas (Wagner and Jung, 2012, Colon-Bolea and Crespo, 2014, Peserico et al., 2015).

Además del cáncer, se han relacionado proteínas SMYD en otros procesos patológicos. Se ha identificado la sobreexpresión de SMYD1 en el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (HLHS, acrónimo en inglés), un defecto cardíaco poco frecuente que se

caracteriza por un menor desarrollo de las estructuras que conforman el lado izquierdo del corazón (Gambetta et al., 2008). Recientemente se ha vinculado a SMYD3 en atrofia del músculo esquelético (Proserpio et al., 2013). En modelos inducidos, tanto celular como animal, de atrofia del músculo esquelético se detecta la sobreexpresión específica de *Smyd3*, lo que produce la activación de la expresión del gen de la miostatina que desempeña un papel inhibitorio en el crecimiento del músculo esquelético; mientras que además, la represión de *Smyd3* previene la inducción de la atrofia muscular (Proserpio et al., 2013).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha relacionado ninguna proteína SMYD en neuropatías. En la familia fCMT-266, combinando estrategias genéticas complementarias como son el cartografiado genómico y el ligamiento genético junto con la secuenciación masiva, identificamos la mutación SMYD4 p.K82E como principal candidata de ser responsable de la neuropatía hereditaria. Hemos demostrado que SMYD4 se expresa, tanto a nivel de mensajero como proteico, en sistema nervioso, incluyendo una fuerte expresión en DRG de embriones de ratón. Además, hemos puesto en evidencia que SMYD4 tiene un papel relevante en el PNS de *D. melanogaster*, ya que su silenciamiento conduce a la degeneración de neuronas fotorreceptoras así como a la desorganización de los omatidios. El hecho de que la supresión de SMYD4 en humanos esté relacionada con el desarrollo de un tipo de tumor cerebral denominado meduloblastoma (Northcott et al., 2009), hace pensar que pudiera desempeñar alguna función en sistema nervioso. Además, ratones *knock-out* homocigóticos para el gen *Smyd4* (*Smyd4^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}*), generados y fenotipados por el consorcio internacional *Mouse Genomes Project* (datos incluidos actualmente en el *International Mouse Phenotyping Consortium*), presentan un comportamiento anormal en pruebas de campo abierto, exhibiendo una mayor distancia recorrida en la periferia, un menor tiempo en reposo en el centro y con una mayor velocidad media en el centro, lo que podría sugerir la presencia de alteraciones neurológicas (<http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2442796>).

Desconocemos cuales son las consecuencias moleculares y celulares de la mutación SMYD4 p.K82E. Hemos descartado que la mutación afecte de forma relevante a la capacidad represora transcripcional de SMYD4 y a la interacción con la HSP90; sin embargo, no sabemos cómo puede influir en otras posibles funciones de SMYD4. Cada vez más se están identificando nuevas funciones en las proteínas SMYD, algunas de ellas inesperadas (Deuker and McMahon, 2014). Una de sus funciones más destacadas que se han descubierto recientemente en las proteínas SMYD es su papel en señalización. No sólo pueden regular los niveles de expresión de importantes dianas implicadas en señalización (Hamamoto et al., 2004, Hu et al., 2009), sino que además, recientemente se ha evidenciado que pueden tener un papel central y directo en señalización (Hamamoto et al., 2015), como es el caso de SMYD3, que es capaz de incrementar la señalización de las MAP kinasas (Deuker and McMahon, 2014, Mazur et al., 2014). La metilación específica de la MAP3K2 en la lisina 260 por SMYD3, impide su unión con el complejo de la fosfatasa PP2A, un regulador negativo clave de la ruta de las MAP kinasas, lo que provoca la potenciación del módulo de señalización Ras/Raf/MEK/ERK (Mazur et al., 2014). También se ha demostrado la implicación de proteínas SMYD en la modulación directa de receptores tirosina-kinasa (RTK), como la metilación del vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) por parte de SMYD3, que supone otro claro ejemplo del papel central de las SMYD en señalización. SMYD3 potencia la actividad kinasa del VEGFR1 a través de la metilación en la posición K831 localizada en su dominio tirosina-

kinasa, incrementando así la transducción de señales mediada por VEGFR1 (Kunizaki et al., 2007).

Para el caso específico de SMYD4, se ha demostrado que es capaz de regular los niveles de expresión del RTK *platelet-derived growth factor receptor alpha* (*PDGFRA*), aunque se desconoce si puede actuar directamente a nivel proteico sobre dianas implicadas en señalización. En este sentido, se ha visto que el gen *CG1868*, el homólogo más cercano de SMYD4 que hemos propuesto en *D. melanogaster*, es capaz de regular la señalización de ERK (Friedman et al., 2011). En un estudio genómico funcional en *D. melanogaster* para identificar genes implicados en la regulación de la señalización RTK-Ras-ERK, se observó que el silenciamiento de este gen homólogo de SMYD4 provoca la disminución de la fosforilación de ERK, y por tanto, una menor activación de la ruta. Aunque este resultado es fruto de un estudio a gran escala y requeriría una validación adicional, teniendo en cuenta la implicación de otras SMYD en señalización, como la de SMYD3 en la de Ras/Raf/MEK/ERK (Mazur et al., 2014) así como la capacidad de SMYD2 de inhibir la transducción de la señal de las rutas de ERK y NF- κ B (Xu et al., 2015), es muy posible que sea un efecto específico relacionado con la función de este homólogo de SMYD4 en *D. melanogaster* y que podría estar conservada hasta en SMYD4 de vertebrados.

Resulta tentador especular si la mutación SMYD4 p.K82E podría influir de alguna manera en alguna de las rutas de señalización que ya se han visto reguladas por proteínas SMYD. Se sabe que la ruta de señalización de ERK tiene un papel clave en el sistema nervioso periférico, controlando la plasticidad de las células de Schwann así como la regeneración del nervio periférico *in vivo* (Napoli et al., 2012). De hecho, se ha demostrado que la ruta Raf/MEK/ERK dirige la desmielinización de los nervios periféricos y la respuesta inflamatoria asociada, por lo que se ha propuesto la implicación de la ruta de ERK en neuropatías periféricas, particularmente en aquéllas en las que se observa tanto desmielinización como inflamación (Napoli et al., 2012). Por otro lado, es bien conocida la importancia de ciertos RTK y sus rutas de señalización en la biología del nervio periférico así como su implicación en neuropatías periféricas, como es el caso de la ruta de ErbB en la neuropatía de CMT (Chen et al., 2006, Lemke, 2006, Gouttenoire et al., 2013).

Otras de las funciones recientes de las SMYD son aquéllas relacionadas con su papel en la regulación de la inflamación (Stender et al., 2012, De Arras et al., 2013, de Almeida Nagata et al., 2015, Xu et al., 2015). Se ha identificado a SMYD5 como un regulador negativo del programa genético de la respuesta inflamatoria tanto en *D. melanogaster* como en vertebrados. Mediante su asociación con el complejo co-represor NCoR, regula la expresión de genes proinflamatorios a través de la trimetilación H4K20, incluyendo la represión del *toll-like receptor 4* (*TLR4*) en macrófagos (Stender et al., 2012). También se ha relacionado a Smyd2 como un regulador de la activación de los macrófagos, a través de la modulación en la producción de IL-6 y TNF- α (Xu et al., 2015). Parece que los miembros de las SMYD podrían actuar en la respuesta inflamatoria a través de diferentes mecanismos moleculares: en macrófagos, la depleción de SMYD5 resulta en una respuesta transcripcional exagerada de genes de respuesta a TLR4, mientras que por el contrario, el silenciamiento de cada uno de los otros miembros de los SMYD (*SMYD1-4*) causa una supresión en la respuesta transcripcional a la activación de TLR4 (Stender et al., 2012). Además, recientemente se ha visto que SMYD3, a través del control epigenético de la expresión de Foxp3, regula la generación de células T reguladoras inducidas (iTreg) y la producción de IL-17 (de Almeida Nagata et al., 2015). De hecho, en ratones *knock-out* condicionales para *Smyd3* en células CD4⁺, se produce una respuesta proinflamatoria exacerbada y una mayor patogénesis pulmonar tras la infección con el virus respiratorio

sincicial (RSV, acrónimo en inglés) debido a una desregulación en la producción de citokinas desencadenada por la falta de *Smyd3* (de Almeida Nagata et al., 2015).

Existen neuropatías inflamatorias esporádicas, causadas por una respuesta inmune anómala que afecta al sistema nervioso periférico, como por ejemplo la polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP, acrónimo en inglés), la forma más común de síndrome de Guillain-Barré (van den Berg et al., 2014, Ubogu, 2015). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos patológicos, la AIDP está asociada a la infiltración de macrófagos activados en las vainas de mielina, lo que produce daños en la mielina y desmielinización, aunque es probable que también estén implicados otros mecanismos inmunológicos (van den Berg et al., 2014). En la mayoría de casos, infecciones bacterianas o víricas preceden la aparición de los primeros síntomas (van den Berg et al., 2014).

También existen neuropatías esporádicas inducidas por infecciones víricas, como las producidas por el virus de la varicela-Zoster, incluyendo procesos inflamatorios en el DRG (Fox et al., 2001, Amlie-Lefond and Jubelt, 2009), pero también se han descrito neuropatías debidas a infecciones por el virus Epstein-Barr, el virus de la hepatitis C o incluso inducidas por el virus del herpes en pacientes infectados con el HIV (Gavin et al., 1997, Suarez-Calvet et al., 2010, Biasiotta et al., 2014).

Hay proteínas SMYD capaces de interactuar con proteínas víricas. Por ejemplo, SMYD3 interactúa e influye en la localización subcelular de la proteína tax del virus HTLV-1, una proteína capaz de modificar las rutas de señalización así como el ciclo celular de las células infectadas (Yamamoto et al., 2011). Además, SMYD3 interactúa con la proteína no estructural NS5A del virus de la hepatitis C, y de hecho, es capaz de afectar a la producción de partículas del virus (Eberle et al., 2014). Por otro lado, la infección de ciertos virus puede afectar a la expresión de genes *SMYD*. Por ejemplo, el virus de la hepatitis X produce la sobreexpresión de *SMYD3* (Yang et al., 2009), mientras que el epítipo gp120/V3 del HIV-1 produce la sobreexpresión de *SMYD4* (Morou et al., 2011). Curiosamente, en este último trabajo también se observó un fuerte incremento de la expresión del gen *SEPT9*, gen implicado en la neuropatía hereditaria HNA (Morou et al., 2011).

En algunas formas de neuropatía recurrente hereditaria, fundamentalmente en las neuropatías de tipo HNA, las crisis se pueden desencadenar por ciertos tipos de estrés, entre los que se incluyen las infecciones o las inmunizaciones (Chance, 2006). Dada la clara relación demostrada entre las proteínas SMYD con la respuesta inflamatoria, así como su posible relación en procesos infecciosos, sería interesante investigar si la mutación *SMYD4* p.K82E pudiera ser causante de una respuesta inflamatoria anormal en el PNS que pudiera ser responsable de la neuropatía recurrente presente en la familia fCMT-266.

4. Discusión general del Capítulo I

En los últimos años se han venido realizando grandes avances relacionados con las causas genéticas de neuropatías hereditarias en general, identificándose nuevos genes implicados (Timmerman et al., 2014). Sin embargo, en el caso concreto de las neuropatías recurrentes hereditarias se sigue conociendo muy poco acerca de sus bases genéticas. Hoy en día, en un número notable de pacientes no se logra el diagnóstico genético, siendo especialmente evidente en los casos particulares de HNA y de eritromelalgia primaria. En HNA, únicamente se han descrito mutaciones patológicas en el gen *SEPT9*. En la cohorte de HNA estudiada por Collie y colaboradores (Collie et al., 2010), tan sólo identificaron mutaciones en *SEPT9* en el 55% (30/55) de los casos de HNA, y en al menos tres familias no obtuvieron ligamiento con el *locus* 17q25 de *SEPT9*. De hecho, en las diversas series clínicas, hasta la fecha se ha demostrado que al menos cinco familias HNA no están ligadas al *locus* de *SEPT9*, por lo que se postula la existencia de otros genes implicados (van Alfen et al., 2000, Kühlenbaumer et al., 2001, Watts et al., 2001, Hannibal et al., 2009). Por otro lado, mutaciones en el gen *SCN9A* son responsables de una baja proporción de los casos de eritromelalgia primaria: Drenth y colaboradores de entre los 15 casos de eritromelalgia primaria, incluyendo seis casos esporádicos y nueve con antecedentes familiares, identificaron mutaciones en *SCN9A* únicamente en un paciente (Drenth et al., 2008); se han observado resultados similares en otras series clínicas, por lo que se piensa que deben haber otros genes implicados en eritromelalgia primaria (Drenth et al., 2008, Klein et al., 2013b).

En las dos familias presentadas en el presente trabajo, fCMT-129 y fCMT-266, habíamos descartado las causas genéticas conocidas hasta la fecha de ser responsable de este tipo de neuropatías.

Para el caso de la familia fCMT-129, hemos identificado el *locus* 21q21, que cosegrega con la neuropatía en la familia, implicado en la enfermedad y que debe albergar la mutación causal. De identificarse otras familias en las que la neuropatía cosegregue con marcadores de la región del cromosoma 21, se podría acotar más la región y recurrir a estrategias de secuenciación masiva que permitan secuenciar toda la región para identificar la mutación.

En la familia fCMT-266, a través de cartografiado genómico y análisis de ligamiento y combinando con WES, hemos identificado la mutación p.K82E en *SMYD4* como principal candidata de ser responsable de la neuropatía en esta familia. Para tener mayor apoyo de la causalidad de esta mutación, se requiere identificar mutaciones en dicho gen en otras familias con un cuadro clínico similar al de la fCMT-266. Hasta la fecha, hemos podido analizar otras familias sin diagnóstico genético afectadas por neuropatías recurrentes hereditarias. Por un lado dos familias facilitadas por el grupo de investigación del Dr. Vincent Timmerman (Molecular Genetics Department, VIB, University of Antwerp, Amberes, Bélgica), diagnosticadas de padecer HNA, negativas para mutaciones en *SEPT9* y en las que incluso previamente se había descartado ligamiento para el *locus* *SEPT9*. Además, se han estudiado dos casos procedentes del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, remitidos por el Dr. Juan Vílchez, con cuadros clínicos compatibles con neuropatía de fibra fina y que han sido negativos para mutaciones en *SCN9A*. En todos estos casos hemos realizado un rastreo mutacional en los exones y en las regiones intrónicas flanqueantes de *SMYD4*, sin resultados positivos. Seguimos en contacto con grupos de investigación relacionados a la espera de disponer de otras familias con

cuadros clínicos compatibles al observado en la familia fCMT-266. También estamos en contacto con grupos con series clínicas grandes de neuropatías hereditarias que disponen de sus propias bases de datos de secuenciación de exoma por si se identifican mutaciones candidatas en el gen *SMYD4*.

La implementación y las mejoras de tecnologías de secuenciación masiva, especialmente las de WES ha permitido un gran avance en la identificación de nuevos genes implicados en enfermedades mendelianas. Hasta febrero de 2015, se han descubierto un total de 2.937 genes implicados en 4.163 enfermedades mendelianas (Chong et al., 2015). A pesar de este avance sigue siendo una ardua tarea la identificación de una mutación causal. Todavía se desconocen los genes implicados en aproximadamente el 50% de todas las enfermedades mendelianas descritas, y muchas más condiciones genéticas permanecen todavía sin reconocer (Chong et al., 2015). En muchas ocasiones las mutaciones pueden no estar localizadas en regiones exónicas que serían imposibles de detectar mediante WES. Es por ello que poco a poco se tiende a aplicar estrategias de WGS a medida que la tecnología y los costes lo están permitiendo.

Existe una tendencia creciente de establecer consorcios colaborativos internacionales en los que se agrupan en bases de datos conjuntas los resultados de secuenciación mediante WES y WGS procedentes de multitud de pacientes con enfermedades hereditarias relacionadas, donde fácilmente se puedan comprobar variantes patológicas comunes en familias con fenotipos clínicos similares, facilitando así el descubrimiento de nuevos genes implicados en enfermedades humanas que de otra forma sería casi imposible identificar (Gonzalez et al., 2013, Gonzalez et al., 2015, Philippakis et al., 2015).

5. Conclusiones del Capítulo I

1. En las familias fCMT-129 y fCMT-266, en las que previamente habíamos descartado las posibles causas genéticas conocidas, y que por tanto constituyen nuevas formas de neuropatías recurrentes hereditarias, hemos identificado nuevos *loci* no relacionados con neuropatías hasta la fecha, en el cromosoma 21q21 en la fCMT-129 y en el cromosoma 17p13.3 en la fCMT-266.
2. En la familia fCMT-129 hemos descartado mutaciones en los exones y en las regiones intrónicas flanqueantes de todos los genes que codifican a proteínas y miRNAs contenidos en la región candidata, así como la presencia de grandes deleciones y/o duplicaciones en dicha región. Por tanto, las bases moleculares precisas de esta nueva forma de neuropatía recurrente hereditaria siguen sin conocerse.
3. En la familia fCMT-266 hemos identificado en la región candidata la mutación novel SMYD4 p.K82E, y por tanto, proponemos dicha mutación como la principal candidata de ser responsable la neuropatía. Hasta la fecha no se había relacionado este gen con enfermedades hereditarias en general ni con neuropatías en particular.
4. Los estudios evolutivos de la familia de las proteínas Smyd en metazoos nos han permitido subdividir la familia en tres clases principales: Smyd3, Smyd4, Smyd5, y con la presencia adicional de la clase artrópodo-específica SmydA. Este estudio supone el primer análisis filogenético exhaustivo de esta familia proteica y nos ha servido para identificar en *D. melanogaster* la presencia de cuatro genes homólogos del gen SMYD4 humano. Los estudios de expresión así como los estudios funcionales sugieren que, a pesar de la multiplicidad de la clase Smyd4 en esta especie, no son redundantes y de hecho, dos de estos genes homólogos (*CG1868* y *CG14122*) son esenciales para su viabilidad.
5. La expresión de SMYD4 está presente en el sistema nervioso periférico en mamíferos y los estudios específicos empleando el organismo modelo *D. melanogaster* apoyan el hecho de que juegue un papel en este tejido. Mediante estudios funcionales hemos demostrado que SMYD4 puede actuar como represor transcripcional, así como interactuar con la proteína HSP90 en el citoplasma. Desconocemos el efecto de la mutación SMYD4 p.K82E. Se requieren evidencias adicionales para confirmar la causalidad de esta mutación.

CAPÍTULO II

BÚSQUEDA DE MODIFICADORES GENÉTICOS EN LA NEUROPATÍA DE CHARCOT MARIE TOOTH CMT2K DEBIDA A MUTACIONES DOMINANTES EN EL GEN *GDAP1*.

1. Introducción del Capítulo II

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: clínica y clasificación

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el trastorno neuromuscular hereditario más frecuente. Fue inicialmente descrita en 1886 por Jean-Martin Charcot y Pierre Marie en Francia, y Howard Henry Tooth, en Inglaterra, quienes simultáneamente identificaron y describieron una nueva forma de atrofia muscular progresiva con carácter familiar que denominaron "atrofia muscular peroneal", lo que hoy conocemos por enfermedad de CMT. Aunque la gravedad de los síntomas al igual que la progresión de éstos es muy heterogénea, la enfermedad suele debutar durante la primera o segunda década de la vida, y los pacientes suelen cursar con atrofia muscular distal progresiva en las piernas, disminución del reflejo osteotendinoso, deformidades en los pies, y marcha de tipo equina. A medida que progresa la enfermedad, las manos y los antebrazos también se pueden ver afectados. En general, CMT no es una enfermedad fatal, los pacientes tienen una esperanza de vida normal, y aunque suelen requerir aparatos ortopédicos, el uso de silla de ruedas es raro (Reilly et al., 2011). Sin embargo, las formas de inicio temprano suelen predecir una enfermedad más grave.

Se utiliza la escala CMTNS (acrónimo en inglés de *CMT neuropathy score*) para cuantificar la discapacidad de los pacientes de CMT, y se divide en leve (CMTNS ≤ 10), moderada (CMTNS 11 a 20) y severa (CMTNS ≥ 21). Los parámetros empleados para determinar el valor en la escala incluyen síntomas sensitivos y motores en piernas y brazos, sensibilidad algésica, vibración, fuerza en piernas y brazos, potenciales de acción muscular compuesto (CMAPs, acrónimo en inglés) y potenciales de acción sensitivos del nervio (SNAPs, acrónimo en inglés) (Shy et al., 2005). La sensibilidad de la escala CMTNS ha sido mejorada con una segunda versión denominada CMTNS2 (Murphy et al., 2011).

Atendiendo a los estudios electrofisiológicos e histopatológicos, la enfermedad de CMT se puede clasificar en tres grupos principales: (i) desmielinizante o tipo 1 (CMT1), caracterizado por una velocidad de conducción nerviosa (VCN) menor de 38 m/s y defectos primarios en la célula de Schwann con proliferación anómala de formaciones mielinizantes con aspecto de "bulbo de cebolla"; (ii) axonal o tipo 2 (CMT2), en la que la VCN se ve conservada o débilmente reducida (>38 m/s) y los defectos patológicos evidencian una degeneración crónica axonal; y (iii) una tercera forma intermedia (I-CMT), caracterizada histológicamente por tener un fenotipo mixto entre CMT1 y CMT2, y con una VCN entre 30-40 m/s (Pareyson et al., 2006, Barisic et al., 2008).

CMT se caracteriza por poseer una gran heterogeneidad genética, tanto por el número de genes/*loci* implicados, como por el patrón de herencia que presenta, pudiendo ser autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X (dominante o recesivo), e incluso se ha descrito la implicación de mutaciones en el gen mitocondrial *MT-ATP6A* (Pitceathly et al., 2012). CMT también puede deberse a mutaciones *de novo*. Hasta la fecha se han identificado más de 60 genes/*loci* implicados en CMT (Tabla I2), todos ellos relacionados con la biología y mantenimiento de los nervios periféricos, desempeñando funciones muy diversas, que pueden ir desde la compactación y mantenimiento de la mielina hasta transporte axonal, mantenimiento del citoesqueleto o las funciones mitocondriales entre otras (Patzko and Shy, 2011, Rossor et al., 2013, Harel and Lupski, 2014). A pesar de la heterogeneidad genética de CMT y las diferentes funciones que realizan las proteínas implicadas, el fenotipo clínico común en la enfermedad es la consecuencia de una degeneración y lesión axonal de los nervios periféricos, afectándose principalmente los nervios más largos. Con todo, la clasificación

actual comprende diferentes subtipos de CMT teniendo en cuenta tanto los criterios neurofisiológicos clásicos así como los genes implicados y el patrón de herencia (Tabla I2; <http://neuromuscular.wustl.edu/index.html>).

Tabla I2. Formas clínicas, patrón de herencia y gen asociado en la enfermedad de CMT

CMT & HMSN: Demyelinating	CMT & HMSN: Axonal	Recessive
<p>Dominant</p> <p><u>CMT 1A</u>: PMP-22; 17p12 <u>CMT 1B</u>: P₀ protein; 1q23 <u>CMT 1C</u>: LITAF; 16p13 <u>CMT 1D</u>: EGR2; 10q21 CMT 1E (Deafness) PMP-22; 17p12 P₀ protein; 1q23 <u>CMT 1E</u>: NEFL; 8p21 <u>CMT 1</u>: FBLN5; 14q32 HNPP PMP-22 (Deletion or Point); 17p12 KARS; 16q23 <u>HMSN 3</u> (Dejerine-Sottas) PMP-22; P₀; 8q23; EGR2 Thermosensitive <u>PNS & CNS hypomyelin</u>: SOX10; 22q13 <u>Sensory PN + Hearing loss</u>: GJB3; 1p34 <u>Hypomyelination</u>: ARHGEF10; 8p23 <u>CMT-DIE</u>: GNB4; 3q26 <u>HMSN</u>: HARS; 5q31 <u>HMSN</u>: PMP2; 8q21</p> <p>Recessive: Also AR-CMT1 <u>CMT 4A</u>: GDAP1; 8q21 <u>CMT 4B1</u>: MTMR2; 11q22 <u>CMT 4B2</u>: SBF2; 11p15 <u>CMT 4B3</u>: SBF1; 22q13 <u>CMT 4C</u>: SH3TC2 (KIAA1985); 5q32 <u>CMT 4D (Lom)</u>: NDRG1; 8q24 <u>CMT 4E</u>: EGR2; 10q21 <u>CMT 4F</u>: Periaxin; 19q13 <u>HMSN-Russe (4G)</u>: HK1; 10q22 <u>CMT 4H</u>: FGD4; 12q12 <u>CMT 4J</u>: FIG4; 6q21 <u>CMT4</u>: SURF1; 9q34 <u>HMSN 3</u> (Dejerine-Sottas) P₀; PMP-22; EGR2; Periaxin <u>HMSN + Juvenile glaucoma</u> <u>Cataracts (CCFDN)</u>: CTDP1; 18qter <u>Cockayne's</u>: 5 <u>Congenital hypomyelinating</u> P₀, PMP-22 & EGR-2 <u>Farber lipogranulomatosis</u>: ASAH; 8p22 <u>CDG1a</u>: PMM2; 16p13 <u>Krabbe</u>: GALC; 14q31 <u>MLD</u>: ARSA; 22q13 <u>PMP-22 point mutations</u> Refsum's disease <u>Childhood</u>: PHYH; 10pter-p11.2 <u>Adolescent-Adult</u>: PEX7; 6q22 <u>Infant</u>: PEX1; 7q21 <u>PHARC</u>: ABHD12; 20p11 HMSN + <u>CNS</u>: Heterogeneous <u>Neurodegeneration</u>: DNAJC3; 13q32</p> <p>X-linked <u>1</u> (Males): GJB1 (CX32); Xq13 <u>Pyramidal signs</u></p>	<p>Dominant</p> <p><u>CMT 2A2</u>: MFN2; 1p36 ? <u>CMT 2A1</u>: KIF1B; 1p36 <u>CMT 2B</u>: RAB7; 3q21 <u>CMT 2C</u>: TRPV4; 12q24 <u>CMT 2D</u>: GARS; 7p14 <u>CMT 2E</u>: NEFL; 8p21 <u>CMT 2F/ Distal HMN</u>: HSPB1; 7q11 <u>CMT 2G</u>: 12q12 <u>CMT 2I</u>: P₀; 1q22 <u>CMT 2J</u>: P₀; 1q22 <u>CMT 2K</u>: GDAP1; 8q21 <u>CMT 2L</u>: HSPB8; 12q24 <u>CMT 2M</u>: DNMT2; 19p13 <u>CMT 2N</u>: AARS; 16q22 <u>CMT 2O</u>: DYNC1H1; 14q32 <u>CMT 2P</u>: LRSAM1; 9q33 <u>CMT 2Q</u>: DHTKD1; 10p14 <u>CMT 2T</u>: DNAJB2; 2q35 <u>CMT 2U</u>: MARS; 12q13 <u>CMT 2V</u>: NAGLU; 17q21 <u>CMT 2</u>: VCP; 9p13 <u>CMT 2</u>: TGF; 3q12 <u>Giant axonal 2</u>: DCAF8; 1q22 <u>HMSN-Proximal</u>: TFG; 3q12 <u>HMSN</u>: HARS; 5q31 CMT2 + Pyramidal <u>HMSN5</u>: 4q34 <u>MFN2</u>: 1p36 <u>KIF5A</u>: 12q13 <u>HMSN + Optic atrophy</u> <u>HMSN + Deafness</u> P₀ <u>Connexin-31 (GJB3)</u> <u>Eye ± Ear dysfunction</u> <u>HMSN6A (+ Optic)</u>: MFN2; 1p36 <u>HSMN + Ulcero-mutilation</u> <u>HSAN I</u> SPTLC1; 9q22 SPTLC2; 14q24 <u>HMSN</u>: SPTLC3; 20p12 <u>HSMN + Ataxia</u>: IFRD1; 7q31 <u>HMN 5B</u>: BSCL2; 11q13 <u>CFEOM3</u>: TUBB3; 16q24</p> <p>CMT + Intermediate NCV</p> <p>Dominant</p> <p><u>CMT DIA</u>: 10q24 <u>CMT DIB</u>: DNMT2; 19p13 <u>CMT DIC</u>: YARS; 1p35 <u>CMT DID</u>: P₀; 1q22 <u>CMT-DIE</u>: INF2; 14q32 <u>CMT-DIF</u>: GNB4; 3q26 <u>CMT-X (Semi-dominant)</u> <u>CMT 2E</u>: NEFL; 8p21 <u>Hypomyelination</u>: ARHGEF10; 8p23</p> <p>Recessive</p> <p><u>CMT RIA</u>: GDAP1; 8q21.1 <u>CMT RIB</u>: KARS; 16q23 <u>CMT RIC</u>: PLEKHG5; 1p36 <u>CMT RID</u>: COX6A1; 12q24 <u>CMT XI</u>: DRP2; Xq22</p>	<p>AR-CMT2 <u>A</u>: Lamin A/C; 1q22 <u>B</u>: MED25; 19q13.3 <u>F/Distal HMN</u>: HSPB1; 7q11-q21 <u>H/Pyramidal signs</u>: 8q21.3 <u>K/Hoarseness</u>: GDAP1; 8q21 <u>P</u>: LRSAM1; 9q33 <u>R</u>: TRIM2; 4q31 <u>S</u>: IGHMBP2; 11q13 <u>HSJ1</u>; 2q35 <u>Acrodystrophy</u>: ATSV; 2q37 <u>Andermann</u>: KCC3; 15q13 <u>Ataxia + Neuropathy</u>: TDP1; 14q31 Early onset <u>Lethal Neonatal</u> <u>Neuroaxonal dystrophy</u>: PLA2G6; 22q13 <u>Ouvrier</u> <u>Optic</u>: MFN2; 1p36 <u>CMT2R</u>: TRIM2; 4q31 <u>Respiratory failure</u> <u>Severe</u>: NEFL; 8p21 <u>Giant axonal</u>: Gigaxonin; 16q23 <u>Neuromyotonia</u>: HINT1; 5q31 Optic neuropathy <u>HMSN ± Deaf</u> <u>HMSN6B</u>: SLC25A46; 5q22 Syndromes: HMSN+ <u>Childhood onset</u> <u>CNS</u> <u>Deafness</u></p> <p>X-linked Semi-Dominant <u>1</u>: GJB1 (CX32); Xq13 <u>6</u>: PDK3; Xp22 Recessive <u>2</u>: Xp22.2 <u>3</u>: ? Xq26 <u>4</u> (Cowchock): AIFM1; Xq26 <u>5</u>: PRPS1; Xq22 <u>Sensory PN + Deaf</u>: Xq23 Mitochondrial: <u>MT-ATP6</u></p>

Además del hecho de que un mismo tipo de CMT puede deberse a mutaciones en diferentes genes (por ejemplo, mutaciones en *MFN2* o en *RAB7* causan CMT2), también hay que considerar que mutaciones en el mismo gen pueden conducir a diferentes formas de CMT. Este es el caso del gen *GDAP1* (*ganglioside-induced differentiation-associated protein*

1). Las mutaciones en *GDAP1*, que constituyen unas de las causas más frecuentes de CMT en población española (Sivera et al., 2013), causan diferentes formas de CMT (Tabla I2): autosómico recesivo desmielinizante (CMT4A, MIM 214400) (Baxter et al., 2002), autosómico recesivo axonal (AR-CMT2K, MIM 607831) (Cuesta et al., 2002), autosómico recesivo intermedio (RI-CMTA, MIM 608340) (Nelis et al., 2002, Senderek et al., 2003), o autosómico dominante axonal (CMT2K, MIM 607831) (Claramunt et al., 2005), mostrando la complejidad alélica de las mutaciones en *GDAP1*. Al igual que pasa en otras enfermedades mendelianas, las formas de CMT debidas a mutaciones recesivas en *GDAP1* se caracterizan por ser más graves que las dominantes. CMT2K, que se presenta con un fenotipo clínico de leve a moderado, puede cursar con una gran variabilidad intrafamiliar debido a la existencia de penetrancia incompleta y expresividad variable (Sivera et al., 2010, Zimon et al., 2011, Manganelli et al., 2012). Así, se conocen desde portadores asintomáticos hasta enfermos con un cuadro clínico más grave en una misma familia, siendo todos ellos portadores de una misma mutación dominante en *GDAP1*. Es en este contexto donde se pone de manifiesto la existencia de modificadores genéticos que pueden contribuir a las consecuencias fenotípicas de las mutaciones causales y justificar, en mayor o menor grado, la variabilidad clínica observada.

Modificadores genéticos en CMT

A pesar de que la mayoría de los pacientes de CMT1A presentan la misma duplicación de la región cromosómica 17p11.2, existe una amplia gama de grados de gravedad de la enfermedad tanto dentro como entre las familias en términos de la edad de inicio, debilidad y atrofia, VCN y síntomas sensitivos. Mientras que algunos pacientes pueden tener importantes deformidades esqueléticas, con debilidad proximal severa y pueden requerir el uso de silla de ruedas, otros pueden permanecer asintomáticos (Pareyson and Marchesi, 2009). De hecho, en un estudio con 119 pacientes CMT1A se vio que aproximadamente el 25% de los casos eran asintomáticos (Birouk et al., 1997). Se piensa que la mayor parte de la variabilidad de la enfermedad en CMT1A se debe a factores genéticos, con la influencia de modificadores genéticos, aunque la existencia de casos de gemelos idénticos con fenotipos dispares indica que otros factores, como epigenéticos, estocásticos y ambientales puedan también influir (Pareyson and Marchesi, 2009), e incluso la combinación con otras patologías, como la diabetes, puede empeorar el fenotipo en CMT1A (Sheth et al., 2008).

Es precisamente en CMT1A donde se están dedicando más esfuerzos en la identificación de modificadores genéticos. Recientemente se ha propuesto el *locus SH3TC2* como candidato a ser modificador de la severidad en CMT1A, ya que se han identificado polimorfismos en *SH3TC2*, gen cuyas mutaciones recesivas son responsables de la forma desmielinizante CMT4C, que se asocian significativamente con variabilidad fenotípica en CMT1A (Brewer et al., 2014). En la última reunión de la *Peripheral Nerve Society* celebrada en Quebec (Canadá) en junio de 2015, se presentaron entre otros, los últimos avances en cuanto a modificadores genéticos en CMT1A: a partir del genotipado de 919 pacientes de CMT1A procedentes de diez centros del Consorcio Internacional de Neuropatías (INC, acrónimo en inglés) y de otros dos centros colaboradores se han comenzado estudios de asociación del genoma completo (GWAS, acrónimo en inglés), y se están planificando estudios basados en secuenciación masiva para la identificación de modificadores genéticos en esta forma de CMT (Tao et al., 2015a, Tao et al., 2015b). En otras formas de CMT1 las diferencias clínicas entre familias suelen deberse a distintas mutaciones que varían en su patogenicidad, como es el caso de CMT1B debido a mutaciones en *MPZ*

(Sanmaneechai et al., 2015), y aunque pueden haber algunos casos de variabilidad intrafamiliar, no se ha profundizado en la posible existencia de modificadores.

También se ha postulado la existencia de modificadores genéticos en ciertas formas de CMT2, donde aparecen claros ejemplos de la existencia de variabilidad intrafamiliar por presentar penetrancia incompleta y/o expresividad variable, como en las formas debidas a mutaciones dominantes en los genes *BSCL2*, *GDAP1*, *MFN2* o *TRPV4*, o incluso recesivas como en *LMNA* (Irobi et al., 2004, Tazir et al., 2004, Del Bo et al., 2008, Sivera et al., 2010, Klein et al., 2011). Quizás uno de los casos más llamativos viene dado por *TRPV4* debido a la variabilidad tan extrema que puede haber en una misma familia. En una de las familias donde se identificaron mutaciones en *TRPV4* como responsable de la forma CMT2C, se puede ver la marcada diferencia de la gravedad de la enfermedad con un paciente afectado por una debilidad leve y de aparición tardía, y la presencia de un fenotipo mucho más grave en su hija, con cuadriparesis severa e incluso insuficiencia respiratoria (Figura I3) (Landoure et al., 2010).

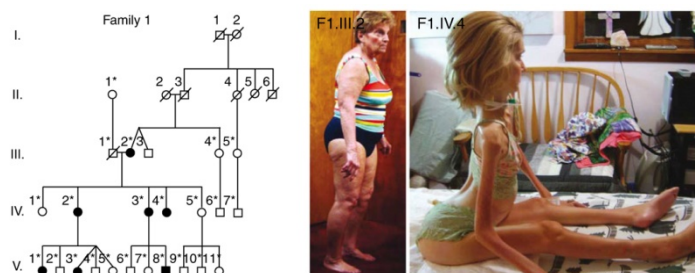


Figura I3. Variabilidad intrafamiliar en familia CMT2C. Figura extraída del trabajo de Landouré y colaboradores, donde se pone de manifiesto la extrema variabilidad intrafamiliar en las formas de CMT debidas a mutaciones dominantes en *TRPV4*, con la paciente F1.III.2 con una leve debilidad y con una aparición tardía de la enfermedad, mientras su hija F1.IV.4 muestra un fenotipo mucho más grave, con la presencia de cuadriparesis severa e insuficiencia respiratoria (Landoure et al., 2010).

Como se ha comentado anteriormente, la variabilidad intrafamiliar es un rasgo característico de las formas CMT2K debidas a mutaciones dominantes de *GDAP1* (Sivera et al., 2010, Zimon et al., 2011, Manganeli et al., 2012). Se ha demostrado la causa de mayor severidad en CMT2K en algunos casos aislados con efectos acumulativos debidos a la combinación en un mismo paciente de una mutación dominante en *GDAP1* junto con otro alelo mutado en el propio *GDAP1* (Ammar et al., 2003, Crimella et al., 2010), o junto a la presencia adicional de mutación en otro gen CMT como *MFN2* (Vital et al., 2012, Kostera-Pruszczyk et al., 2014), que es un gen funcionalmente relacionado con *GDAP1* y cuyas mutaciones son responsables de la forma CMT2A2. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen modificadores genéticos en CMT2K, pero tampoco en otras formas de CMT2.

Se pueden seguir diferentes estrategias a la hora de identificar posibles modificadores genéticos, como puede ser la búsqueda de candidatos funcionales y/o posicionales, o incluso mediante estudios de asociación, de ligamiento, globales mediante búsquedas sistemáticas o más dirigidos analizando genes o rutas candidatas (Genin et al., 2008, van Ham et al., 2009), aunque algunas de ellas presentan limitaciones que impide su aplicación en CMT2K. En el caso de GWAS, no es posible su aplicación dada la baja causística de esta forma de CMT. De hecho, en CMT1A, la forma más frecuente de CMT, aun estudiando 919 pacientes se ha visto que se requiere incrementar el tamaño de muestra para mejorar el poder estadístico del estudio (Tao et al., 2015a). Los estudios de ligamiento para identificar regiones candidatas en una única familia con variabilidad intrafamiliar están condicionados a la disponibilidad de familias suficientemente grandes. Por otro lado, hasta la fecha no existen modelos animales de CMT2K donde poder llevar a

cabo *screenings* sistemáticos. Así, la búsqueda de modificadores genéticos funcionalmente relacionados, implicados en rutas en las que GDAP1 participe, es la estrategia más razonable y dirigida de identificar modificadores genéticos en CMT2K, por lo que para ello se requiere conocer a fondo las funciones específicas de GDAP1.

Funciones de GDAP1

GDAP1 se identificó como uno de los diez genes que aumentaban su expresión en la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a al inducir su diferenciación por gangliósidos mediante la sobreexpresión de GD3 sintasa, de ahí su nombre *ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (Liu et al., 1999). Se expresa fundamentalmente en neuronas, y en menor medida también en células de Schwann (Cuesta et al., 2002, Niemann et al., 2005, Pedrola et al., 2005, Noack et al., 2012). GDAP1 es una proteína de 358 aminoácidos con una alta similitud de secuencia con proteínas glutatión S-transferasas (GST) (Cuesta et al., 2002, Marco et al., 2004). De hecho, mediante estudios evolutivos y estructurales se vio que GDAP1 pertenece a una nueva clase de GST, con representante hasta en *D. melanogaster*, que se caracteriza por la presencia del denominado $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop* separando sus dos dominios GST, y un dominio transmembrana en la región carboxilo terminal (Marco et al., 2004). GDAP1 se localiza en la mitocondria (Niemann et al., 2005, Pedrola et al., 2005), quedando anclada en la membrana mitocondrial externa a través del dominio carboxilo terminal, y con el resto de dominios en el citosol (Niemann et al., 2005, Wagner et al., 2009), aunque recientemente se ha visto que también puede localizarse en los peroxisomas (Huber et al., 2013).

Clásicamente GDAP1 se ha definido como una proteína reguladora de la red mitocondrial. Su sobreexpresión provoca la fragmentación mitocondrial (Niemann et al., 2005, Pedrola et al., 2005, Noack et al., 2012). La falta de GDAP1 puede dar lugar a mitocondrias más elongadas (Niemann et al., 2005, Barneo-Munoz et al., 2015, Lopez Del Amo et al., 2015), aunque hay cierta discrepancia al respecto (Pla-Martin et al., 2013, Bolinches-Amoros, 2014). Su papel como factor de fisión es dependiente de las proteínas de fisión mitocondrial DRP1 y FIS1. De hecho, GDAP1 interacciona físicamente con FIS1 (Estela et al., 2011), pero también lo hace genéticamente, ya que GDAP1 es capaz de complementar defectos que presenta el mutante *fis1 Δ* , deficiente para el gen ortólogo de FIS1 en la levadura *S. cerevisiae* (Estela et al., 2011). Las mutaciones en GDAP1 responsables de CMT afectan su funcionalidad en dinámica mitocondrial. Mientras que las mutaciones recesivas en GDAP1 están asociadas con una disminución en la capacidad de fisión (Niemann et al., 2009, Noack et al., 2012), las mutaciones dominantes causan un bloqueo de la fusión mitocondrial (Niemann et al., 2009, Zimon et al., 2011), provocando un daño mitocondrial por aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, acrónimo en inglés), alteración del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y mayor susceptibilidad a apoptosis (Niemann et al., 2009).

También se ha visto que GDAP1 afecta a la dinámica y morfología de los peroxisomas. Mientras que su depleción da lugar a peroxisomas elongados, la sobreexpresión de GDAP1 causa la fisión de peroxisomas en un proceso dependiente de DRP1 y MFF, por lo que GDAP1 regula la fisión mitocondrial y peroxisomal a través de un mecanismo similar (Huber et al., 2013). Sin embargo, ninguna de las mutaciones *missense* afecta a su funcionalidad en este orgánulo, y sólo las formas truncadas de GDAP1 sin los dominios de la región carboxilo terminal tienen alterada su capacidad como factor de fisión peroxisomal (Huber et al., 2013).

A pesar de contar con dos dominios GST, GDAP1 no contiene actividad como enzima GST y no es capaz de unir glutatión (Pedrola et al., 2005, Shield et al., 2006). Sin embargo, se ha relacionado el papel de GDAP1 en procesos redox (Noack et al., 2012, Niemann et al., 2014, Lopez Del Amo et al., 2015), donde GDAP1 jugaría un papel protector frente al estrés oxidativo (Noack et al., 2012, Niemann et al., 2014). La expresión de *GDAP1* está regulada por los niveles de glutatión, un antioxidante intracelular. Además, la sobreexpresión de GDAP1 protege frente al estrés oxidativo inducido al deplecionar el glutatión, y esto se debe a su capacidad de incrementar los niveles de glutatión pero también por su capacidad de incrementar el $\Delta\psi_m$ (Noack et al., 2012). Sin embargo, las mutaciones recesivas en GDAP1 tienen abolida esta capacidad protectora, y además, el silenciamiento de *GDAP1* incrementa la susceptibilidad frente a la depleción de glutatión (Noack et al., 2012). El papel protector de GDAP1 parece que se ha conservado en su familia génica, ya que también se ha visto que la expresión de su parálogo *GDAP1L1* puede participar en la protección frente a la depleción de glutatión (Noack et al., 2012). Además, GDAP1L1, que sólo se expresa en neuronas del CNS y con un patrón fundamentalmente citosólico, cambia su localización subcelular en respuesta a niveles elevados de glutatión oxidado, translocándose desde el citosol a la mitocondria (Niemann et al., 2014). *In vivo*, en el CNS de ratones *knock-out* de *Gdap1*, *Gdap1l1* se transloca a la fracción mitocondrial para compensar la ausencia de *Gdap1*, por lo que únicamente aparecen signos de estrés oxidativo en el PNS (Niemann et al., 2014). Esto explicaría la ausencia de patología en el CNS debido a mutaciones o a la falta de GDAP1 tanto en paciente como en modelos murinos debido a un posible mecanismo de compensación por parte de GDAP1L1 a nivel de este tejido (Niemann et al., 2014).

A través del $\alpha 4$ - $\alpha 5$ *loop*, GDAP1 interacciona con proteínas del citoesqueleto como la proteína β -tubulina, pero también con proteínas implicadas en el tráfico vesicular, como RAB6B y caytaxina, implicadas en transporte retrógrado y anterógrado respectivamente, por lo que GDAP1 podría actuar regulando el tráfico mitocondrial (Estela et al., 2011, Pla-Martin et al., 2013). De hecho, la sobreexpresión de GDAP1 incrementa la motilidad mitocondrial, un fenómeno que es aún más pronunciado con las mutaciones dominantes, quienes además muestran una mayor interacción con RAB6B y caytaxina (Pla-Martin et al., 2013). Por otra parte, el déficit de GDAP1 afecta a la interconectividad mitocondrial provocando también una distribución mitocondrial anómala (Pla-Martin et al., 2013, Barneo-Munoz et al., 2015). En neuronas procedentes de ratones *knock-out* de *Gdap1* se han visto defectos en las modificaciones post-traduccionales de los microtúbulos, mostrando una disminución en la acetilación de la α -tubulina, que explicarían posibles defectos en el transporte axonal (Barneo-Munoz et al., 2015).

GDAP1 también influye en la relación entre la mitocondria con otros orgánulos celulares. GDAP1 se localiza en las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) (Pla-Martin et al., 2013), unos subdominios especializados donde ocurre físicamente la comunicación entre la mitocondria y el retículo endoplasmático. Estas estructuras son cruciales para el correcto funcionamiento de la célula, desempeñando papeles en la regulación de la homeostasis del calcio, en el metabolismo de lípidos, en la formación de peroxisomas, e incluso en dinámica y función mitocondrial (Raturi and Simmen, 2013, Vance, 2014). El silenciamiento de *GDAP1* afecta a la yuxtaposición de la mitocondria con el retículo endoplasmático, provocando la reducción de regiones de contacto entre ambos orgánulos; mientras que la sobreexpresión de GDAP1 induce una mayor asociación del retículo y la mitocondria (Pla-Martin et al., 2013). Curiosamente, las mutaciones recesivas, pero no las dominantes, también mantienen esta capacidad (Pla-Martin et al., 2013). Así,

GDAP1 actuaría también como una proteína adaptadora de la red mitocondrial, regulando su correcta distribución e interacción con otros componentes celulares, principalmente el retículo endoplasmático, y que a su vez, esto puede influir en otros procesos.

El déficit de GDAP1 afecta a la homeostasis de calcio (Pla-Martin et al., 2013, Barneo-Munoz et al., 2015). Concretamente, la falta de GDAP1 produce una reducción en la entrada de calcio en la célula a través de un mecanismo conocido como SOCE (acrónimo en inglés de *store-operated calcium entry*), una vía generalizada y conservada de entrada de calcio que se activa tras el vaciado de calcio del retículo endoplasmático y que implica también a la mitocondria (Putney, 2009). La reducción en la actividad SOCE no se debe a un defecto intrínseco en la captación de calcio por parte de la mitocondria, sino a una distribución mitocondrial anómala tras la activación del SOCE (Pla-Martin et al., 2013). Además, se ha visto que las mutaciones en GDAP1 afectan a su papel en el SOCE (Pla-Martin et al., 2014). Por lo tanto, defectos en GDAP1 conducen a anomalías en la homeostasis del calcio, que participan en la fisiopatología de la neuropatía (Pla-Martin et al., 2013, Barneo-Munoz et al., 2015).

Las proteínas capaces de modular las funciones celulares en las que GDAP1 está implicada (dinámica mitocondrial, procesos redox, relación retículo-mitocondria, homeostasis de calcio,...) podrían ser potenciales modificadores funcionales y/o genéticos de CMT2K. Sin embargo, de entre las funciones celulares de GDAP1, destaca su implicación en la homeostasis del calcio, por el papel tan central que tienen sus rutas de señalización en la regulación celular. El calcio actúa como un mensajero crítico para la señalización intracelular y extracelular, y de hecho, defectos en la homeostasis del calcio pueden llegar a alterar cualquiera de los procesos funcionales en los que participa directa o indirectamente GDAP1 (Hidalgo and Donoso, 2008, Jeyaraju et al., 2009, Kaufman and Malhotra, 2014, Krebs et al., 2015). Además, alteraciones en la homeostasis del calcio son un denominador común en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Marambaud et al., 2009, Bolinches-Amoros, 2014).

Así, proteínas implicadas directamente en la homeostasis del calcio y capaces de modular esta vía, serían las principales candidatas a ser modificadores de formas de CMT causadas por mutaciones en *GDAP1*, y particularmente en las formas dominantes, ya que éstas son las formas que se presentan con variabilidad intrafamiliar debido a penetrancia incompleta y expresividad variable. Es interesante que algunas de las formas de CMT2 que se caracterizan por la presencia de variabilidad intrafamiliar, son causadas por mutaciones dominantes en genes que se han relacionado con la homeostasis del calcio (*BSCL2*, *GDAP1*, *MFN2*, *TRPV4*) (de Brito and Scorrano, 2008, Klein et al., 2011, Singaravelu et al., 2011, Pla-Martin et al., 2013, Bi et al., 2014). Es posible que proteínas reguladoras implicadas en la homeostasis del calcio puedan participar como modificadores en todas estas formas de CMT2, que quizás posean susceptibilidad a la influencia de modificadores relacionados con la señalización de la ruta de calcio.

2. Hipótesis y objetivo del Capítulo II

Hipótesis

El factor predictivo más realista de una enfermedad monogénica es la naturaleza de la mutación responsable. A menudo, la correlación genotipo-fenotipo es difícil de establecer debido entre otras causas, a factores genéticos que modulan el fenotipo. Las formas clínicas de la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth causadas por mutaciones dominantes en el gen *GDAP1* (CMT2K) presentan una gran variabilidad intrafamiliar debido a la presencia de penetrancia incompleta y expresividad variable, sugiriendo la influencia de otros factores genéticos. Por tanto, es posible que en familias CMT2K, exista algún modificador genético que influya en el fenotipo clínico.

Objetivo

Identificar y caracterizar posibles modificadores genéticos de *GDAP1* que puedan explicar la variabilidad intrafamiliar observada en CMT2K.

3. Resultados y línea argumental Capítulo II

3.1 JPH1 es un candidato a ser modificador de GDAP1

En el genoma humano, el gen *GDAP1* se localiza en el cromosoma 8q21.1 (chr8: 75.233.365–75.401.107; hebra +). A su lado, y con orientación transcripcional opuesta, encontramos el gen *Junctophilin 1 (JPH1)* (chr8: 75.146.935–75.233.563; hebra -), y al igual que *GDAP1*, el silenciamiento de la expresión de *JPH1* también causa defectos en el SOCE (Hirata et al., 2006). Mediante un estudio genómico comparativo del *locus* de *GDAP1* en diferentes especies de vertebrados se puede comprobar que la relación genómica entre *GDAP1* y *JPH1* se ha conservado en vertebrados: en todas las especies analizadas, *GDAP1* siempre aparece acompañado en el genoma junto al gen *JPH1*, cercanos y dispuestos en orientaciones opuestas (Figura 36A). Pero además, nos encontramos el mismo escenario cuando comparamos el *locus* de su parálogo *GDAP1L1*; en humanos encontramos a su lado el gen *JPH2*, e igualmente el *cluster GDAP1L1-JPH2* se ha mantenido preservado en vertebrados (Figura 36B).

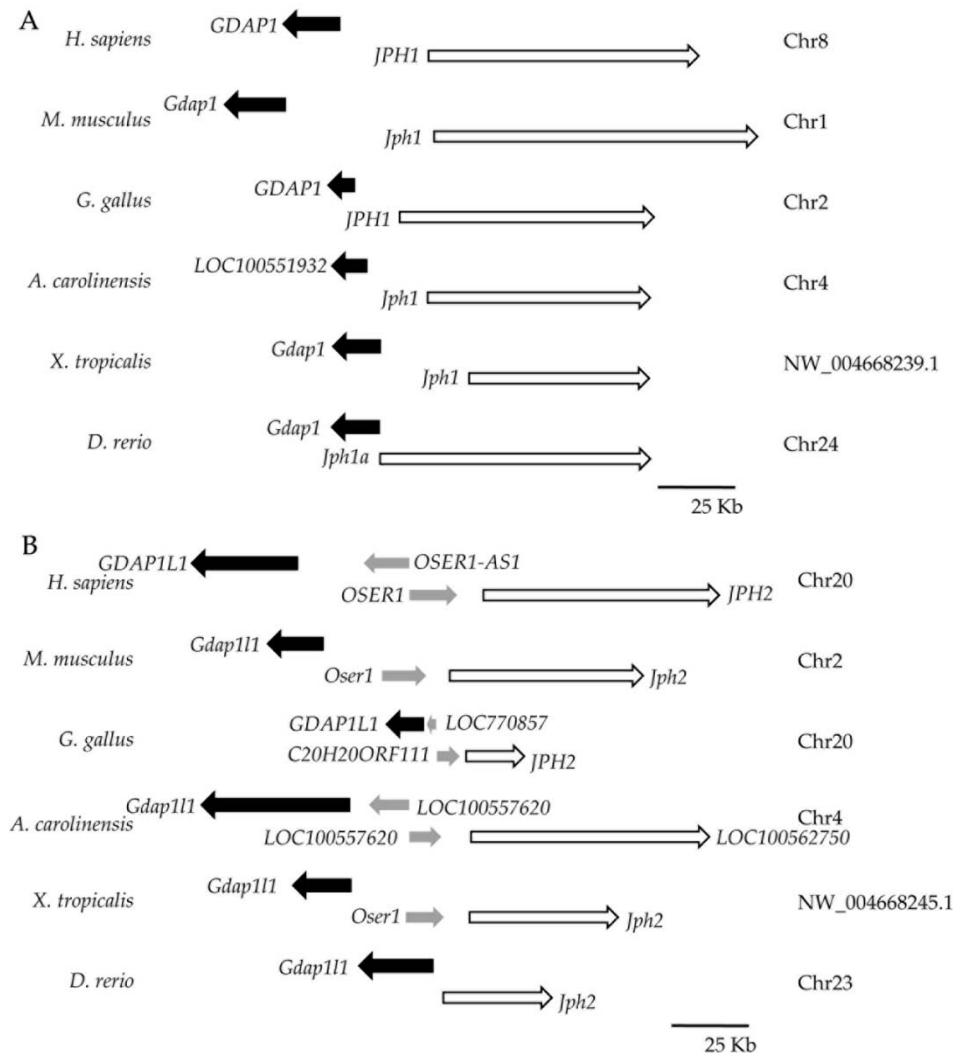


Figura 36. Loci genómicos de *GDAP1* (A) y *GDAP1L1* (B) en especies de vertebrados. Los ortólogos de *GDAP1* (A) o *GDAP1L1* (B) están representados por flechas negras, mientras que los ortólogos de *JPH1* (A) o *JPH2* (B) están representados por flechas blancas. Las flechas grises representan otros genes predichos. Se muestran los nombres de las especies así como los cromosomas de los loci representados. La barra de escala representa 25 Kb.

Estos datos suponen una evidencia de que la duplicación *GDAP1-GDAP1L1* está ligada a la duplicación *JPH1-JPH2*. El par *GDAP1*-ancestral-*JPH1*-ancestral se originó primero, y después dio lugar a los dos pares duplicados en vertebrados, conformando un “paralogón” altamente conservado. Los genes bacterianos relacionados funcionalmente están organizados en operones. En genomas eucarióticos también hay ejemplos de bloques de genes implicados en un mismo proceso (Lee and Sonnhammer, 2003, Hurst et al., 2004, Davila Lopez et al., 2010, Serrano-Candelas et al., 2014). *GDAP1*, *JPH1* y *JPH2* participan en la homeostasis del calcio, y de hecho, el silenciamiento de la expresión de éstos, da lugar a defectos en el SOCE (Hirata et al., 2006, Li et al., 2010, Pla-Martin et al., 2013). Aunque no se conocen a fondo las funciones de *GDAP1L1*, se ha visto que puede compensar la pérdida de *GDAP1* en el CNS (Niemann et al., 2014). Sin embargo, su posible implicación en la homeostasis del calcio no ha sido estudiada ni descrita hasta la fecha. En vertebrados existen cuatro genes *Junctophilin* (*JPH1-4*) y codifican una familia de proteínas del *junctional membrane complex* (JMC) (Takeshima et al., 2000). Las proteínas *JPH* contribuyen a la formación y al mantenimiento de las JMC en células excitables, sirviendo de puente físico entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático, siendo estas estructuras fundamentales para el control de la homeostasis del calcio intracelular (Hirata et al., 2006, Takeshima et al., 2015), y como se ha comentado, la deficiencia de las *JPH*, conduce hacia defectos en el proceso del SOCE (Hirata et al., 2006, Li et al., 2010). En su conjunto, los genes *GDAP1* y *JPH1* conforman un *cluster* conservado de genes funcionalmente relacionados, por lo que *JPH1* constituye un buen candidato funcional y posicional como posible modificador de *GDAP1*.

GDAP1 se expresa fundamentalmente en neuronas (Niemann et al., 2005, Pedrola et al., 2005, Pedrola et al., 2008), mientras que *JPH1* está presente principalmente en músculo esquelético (Takeshima et al., 2000), aunque hasta la fecha no se ha caracterizado su expresión en el PNS. Analizamos la expresión de *Jph1* a nivel de mRNA y de proteína en el PNS y en otros tejidos procedentes de ratón adulto, y adicionalmente analizamos su expresión en cultivo primario de motoneuronas y de células de Schwann de ratón. *Jph1* se expresa en todos los tejidos y células analizados (Figura 37A), incluyendo el nervio ciático, así como en los cultivos de motoneuronas y células de Schwann. Mediante WB confirmamos la expresión de la proteína *Jph1* en tejidos musculares como se había descrito con anterioridad (Takeshima et al., 2000), pero además determinamos que también está presente en tejido neuronal (Figura 37B).

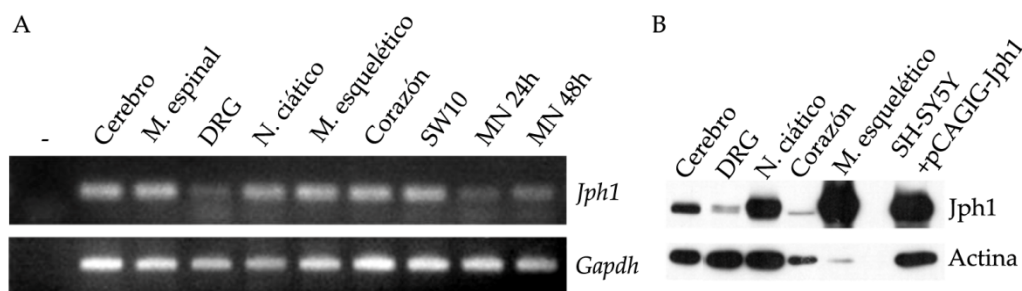


Figura 37. Análisis de la distribución tisular de *Jph1*. (A) Análisis de la expresión del mRNA de *Jph1* mediante RT-PCR a partir de cDNA de tejidos de ratón adulto, de células de Schwann (SW10) y de cultivo primario de motoneurona (MN) de 24 o 48h post-siembr. Como control se analizó la expresión de *Gapdh*. (B) Análisis mediante WB de *Jph1* en tejidos de ratón adulto. Como control de la detección se usaron extractos de células SH-SY5Y transfectadas con pCAGIG-*Jph1* murino. Como control de carga se analizó la actina.

En mamíferos, hay una expresión tejido específica de los cuatro genes *JPH* (Takeshima et al., 2000, Nishi et al., 2003, Takeshima et al., 2015), pero existe cierto solapamiento en su

expresión. Se ha descrito una expresión mayoritaria en músculo esquelético de JPH1, y en menor medida también en corazón. JPH2 se expresa fundamentalmente en corazón, pero también se expresa de forma relevante en músculo esquelético, mientras que JPH3 y JPH4 comparten expresión en sistema nervioso. Mediante estudios de *Northern blot* a partir de tejidos de ratón adulto ya se había detectado expresión de *Jph1* en cerebro de ratón (Takeshima et al., 2000), aunque hasta la fecha no se había determinado el posible papel de JPH1 en sistema nervioso en general, y en PNS en particular. Nuestros datos confirman que a nivel proteico la presencia de JPH1 es mayoritaria en músculo esquelético, pero demostramos que también se expresa en tejido neuronal. Por tanto, *Jph1* está presente en sistema nervioso, donde coincidiría con *Gdap1* y donde ambas proteínas podrían regular, entre otros procesos, la homeostasis de calcio.

A nivel subcelular, GDAP1 se localiza en la membrana mitocondrial externa y adicionalmente se encuentra en las zonas de contacto entre retículo endoplásmico y la mitocondria denominadas MAMs (Pla-Martin et al., 2013). JPH1 es una proteína que se localiza en el retículo endoplasmático (RE) y que además se asocia a la membrana plasmática (Takeshima et al., 2000, Takeshima et al., 2015). Recientemente hemos visto que JPH1 también está presente en las MAMs (Pla-Martin et al., 2015). Con todo, ambas proteínas están presentes en el PNS, y a nivel subcelular, a pesar de estar localizados en diferentes orgánulos, coinciden en las MAMs lo que sugiere que ambas proteínas podrían participar en la función RE-mitocondria, donde podrían contribuir a la homeostasis del calcio.

3.2 JPH1 rescata los defectos en el SOCE de células deficientes en GDAP1

Tras el vaciado de calcio de los depósitos intracelulares, fundamentalmente del retículo endoplasmático, se activa el mecanismo del SOCE para permitir la entrada de calcio en la célula. En este proceso, la proteína sensora de calcio en el retículo STIM1, tras detectar el vaciado de calcio en el retículo, oligomeriza en estructuras tipo puncta que migran hacia las zonas de contacto entre la membrana plasmática y el retículo, donde activa a la proteína ORAI1 formadora del poro del canal SOC, para permitir así la entrada de calcio (Luik et al., 2006, Lewis, 2007). La deficiencia tanto de GDAP1 como de JPH1 produce defectos en el SOCE (Hirata et al., 2006, Pla-Martin et al., 2013). Teniendo en cuenta la implicación de ambas proteínas en el SOCE (Hirata et al., 2006, Ko et al., 2011, Pla-Martin et al., 2013), con el fin estudiar la posible relación entre GDAP1 y JPH1, se plantearon experimentos de rescate usando como modelo células SH-SY5Y deficientes en GDAP1 (GDAP1 KD), realizados en colaboración con el Dr. David Pla. Estas células tienen un defecto en el SOCE (Figura 38A, C), observándose una menor entrada de calcio en la célula a través de este mecanismo, pero también hay defectos en la salida de calcio del retículo inducida por TG (Figura 38A, B), acorde con lo que anteriormente se había descrito (Pla-Martin et al., 2013). Sorprendentemente, la sobreexpresión de JPH1 en estas células deficientes en GDAP1 es capaz de rescatar estos defectos, de la misma forma que lo hace la re-expresión de GDAP1 (Figura 38). Estos resultados respaldan que JPH1 puede comportarse como un modificador funcional de GDAP1.

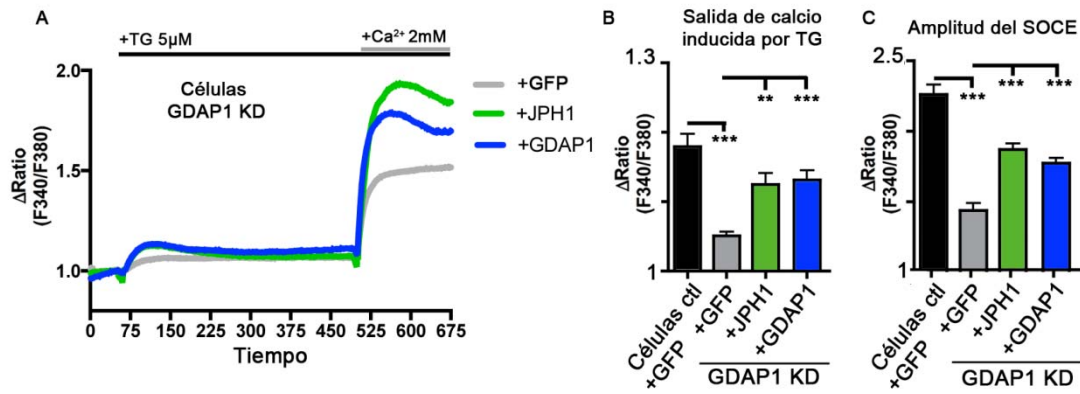


Figura 38. JPH1 rescata los defectos del SOCE presente en células con silenciamiento para GDAP1. (A) Cambios en el cociente de fluorescencia de la sonda Fura-2 normalizado frente a los valores basales. Las medidas reflejan las variaciones en la concentración de calcio citosólico. El vaciado de calcio del retículo se indujo mediante la adición de TG 5 μM en medio libre de calcio, mientras que el SOCE se activó tras la adición de calcio 2 mM. Se analizaron células SH-SY5Y con silenciamiento del gen *GDAP1* (GDAP1 KD) transfectadas con el vector bicistrónico pCAGIG vacío (+GFP) o expresando la JPH1. Como control positivo del rescate se reintrodujo la expresión de GDAP1 mediante transfección. En la parte inferior se muestra las cuantificaciones del pico debido a la salida de calcio del retículo debido a la adición de TG (B) y del pico del SOCE (C). En las cuantificaciones (B y C) se han incluido los valores de las células control SH-SY5Y pLKO-NT, que expresan un RNAi no dirigido, y por tanto no producen silenciamiento de GDAP1, transfectadas con el vector pCAGIG vacío (Células ctl +GFP). One-way ANOVA, test de Tukey, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Las barras de error representan la SEM.

Los defectos en el SOCE en células deficientes en GDAP1 se deben a una distribución anómala de la red mitocondrial que impide el adecuado tamponamiento del calcio por parte de la mitocondria durante el SOCE (Pla-Martin et al., 2013, Barneo-Munoz et al., 2015). Por lo tanto, es posible que el rescate obtenido por la sobreexpresión de JPH1 se debiera a algún efecto de JPH1 sobre la distribución o la función mitocondrial. De hecho, el silenciamiento de *Jph2* en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias provoca la alteración del estado mitocondrial debido a la afectación de la yuxtaposición de la mitocondria con el retículo endoplasmático y a la homeostasis anormal del calcio intracelular (Liang et al., 2012). Sin embargo, recientemente hemos visto que el rescate de JPH1 es independiente de la mitocondria, puesto que éste se sigue produciendo aun en presencia de los bloqueantes de la función mitocondrial antimicina A y oligomicina (Pla-Martin et al., 2015). Una hipótesis alternativa que explicase el rescate por JPH1 de los defectos del SOCE en las células GDAP1 KD, podría ser que la sobreexpresión de JPH1 favoreciera de alguna manera el propio mecanismo del SOCE. Existen estudios que apoyan el hecho de que las JPH podrían facilitar el mecanismo del SOCE probablemente estabilizando las uniones entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático en células excitables (Hirata et al., 2006, Li et al., 2010, Takeshima et al., 2015). La propia sobreexpresión de STIM1, la proteína activadora del SOCE, es capaz de rescatar defectos en el SOCE de forma independiente a la mitocondria (Singaravelu et al., 2011), por lo que es posible que el rescate de JPH1 en el SOCE en las células GDAP1 KD estuviera relacionado de alguna manera también con la función de STIM1. De hecho, recientemente hemos visto que a nivel de localización subcelular, tras inducirse el mecanismo del SOCE mediante el vaciado de calcio del retículo endoplasmático con TG, JPH1 forma estructuras tipo puncta y colocaliza con STIM1 durante la activación del mecanismo del SOCE (Pla-Martin et al., 2015).

3.3 Rastreo mutacional del gen *JPH1* en familias CMT2K con la mutación dominante *GDAP1* p.R120W

Habiendo demostrado la relación genómica y funcional de *GDAP1* y *JPH1*, así como la presencia de ambas proteínas en el PNS, y lo que es más importante, sabiendo que *JPH1* puede actuar como modificador funcional de *GDAP1*, planteamos la hipótesis de que variantes en el gen *JPH1* pudieran ser responsables de la variabilidad clínica intrafamiliar observada en familias CMT2K. Se estudiaron familias CMT2K portadoras de la misma mutación dominante *GDAP1* p.R120W, evitando la variabilidad clínica debida a diferentes mutaciones de *GDAP1*.

El rastreo mutacional de los exones codificantes de *JPH1* en 29 portadores de la mutación *GDAP1* p.R120W pertenecientes a diez familias CMT2K no relacionadas, permitió identificar dos variantes diferentes en *JPH1*: c.638G>C (p.R213P) en un paciente de la familia fCMT-408 (Figura 40), y c.1870G>C (p.D624H) en un paciente de la familia fCMT-213 y en tres hermanos de la familia fCMT-214. Ambas variantes están anotadas como SNPs en la dbSNP (NCBI). La variante c.638G>C (rs201314759; MAF [G] <0,01), es probablemente dañina según los predictores bioinformáticos SIFT y PolyPhen-2. En las bases de datos consultadas no se han detectado individuos homocigotos para el alelo menos común. La variante c.1870G>C (rs16938828; MAF [G] = 0,01) es probablemente tolerada según los predictores. Se ha anotado un único individuo homocigoto para la variante de menos frecuencia y procede de población Europea-Americana. Las proteínas JPH se caracterizan por la presencia de ocho dominios MORN cerca de la región N-terminal por los que contactan con la membrana plasmática, seguido de una larga hélice alfa y un dominio transmembrana en el extremo C-terminal, por el que se ancla al retículo (Figura 39) (Nishi et al., 2000, Garbino et al., 2009). La variante *JPH1* p.R213P se localiza en la región de unión entre los primeros seis dominios MORN y los dos últimos (Figura 39). La región de unión en las JPH está muy conservada en vertebrados, y se piensa que puede servir de sitio de unión a proteínas accesorias (Garbino et al., 2009). De hecho, en células musculares *JPH1* interacciona a través de la región de unión con DHPR, un canal de calcio dependiente de voltaje (Golini et al., 2011). Además, las mutaciones en *JPH2* que causan cardiopatía hipertrófica, están situadas tanto en la región de unión como en los dominios MORN más cercanos a ésta (Garbino et al., 2009, Landstrom et al., 2014), lo que demuestra la importancia de esta región en las proteínas JPH. La variante p.D624H se encuentra situada entre la región divergente y el dominio transmembrana (Figura 39).

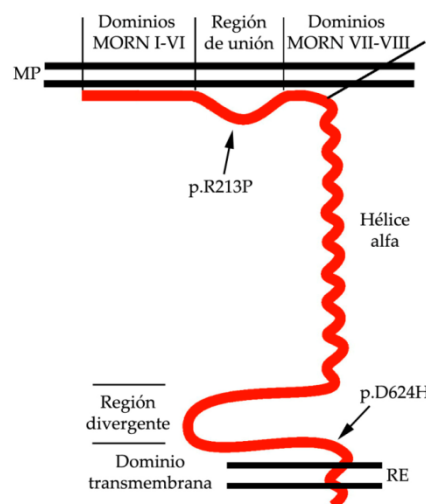


Figura 39. Esquema de la proteína *JPH1*. Se representa la localización de la proteína *JPH1*, anclada en la membrana del retículo (RE), a través del dominio transmembrana situada en la región C-terminal, y

contactando con la membrana plasmática (MP) con los dominios MORN situados en la región N-terminal. Se indican los dominios presentes en la proteína, así como la localización de las dos variantes (JPH1 p.R213P y p.D624H) identificadas en el rastreo mutacional de *JPH1* en familias CMT2K portadoras de la mutación GDAP1 p.R120W.

3.4 El portador de la mutación GDAP1 p.R120W junto con la variante JPH1 p.R213P presenta un cuadro clínico más grave

La probando de la familia fCMT-408 (Figura 40A, ID III:1), es portadora de la mutación GDAP1 p.R120W que ha heredado de su padre enfermo (ID II:4), y del cambio JPH1 p.R213P que ha heredado de su madre sana (ID II:5). A pesar de ser la paciente más joven de la familia, presenta un cuadro clínico más grave en comparación con el resto de familiares enfermos portadores de la mutación GDAP1 p.R120W. La probando padece una neuropatía sensitivo-motora moderada (9 en la escala CMTNS2, a los 29 años de edad), mientras que sus familiares portadores de la mutación GDAP1 p.R120W (Figura 40A), presentan un fenotipo muy leve (valores entre 1-3 en la escala CMTNS2), siendo asintomático el individuo ID II:1.

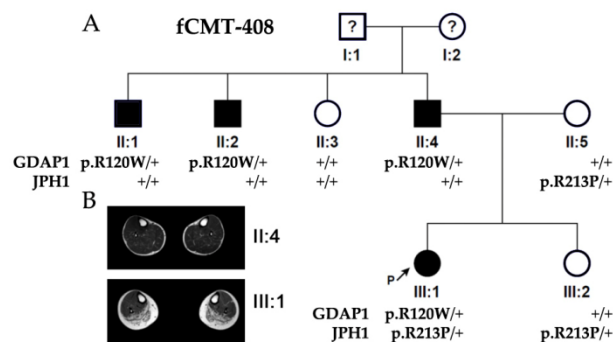


Figura 40. Familia fCMT-408. (A) Árbol genealógico de la familia fCMT-408. Todos los individuos afectados portan la mutación GDAP1 p.R120W, mientras que la probando (III:1), adicionalmente porta la variante JPH1 p.R213P. (B) MRI de los músculos de la pantorrilla de los pacientes II:4 y III:1, con presencia de sustitución grasa únicamente en la probando.

Los estudios de resonancia magnética (MRI, acrónimo en inglés) de las extremidades inferiores, llevados a cabo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla bajo la supervisión del Dr. Celedonio Márquez, mostraron sustitución grasa en los músculos de la pantorrilla (*soleus* y *gastrocnemius*) de la probando (Figura 40B), pero no en el resto de enfermos de la familia. El análisis histopatológico del nervio sural de la probando mostró una marcada reducción de fibras mielinizadas, con una densidad de fibras de 3559/mm² (valores normales de referencia 8000-13000/mm²) (Figura 41), y con gran presencia de “bulbos de cebolla”, tanto clásicos como atípicos grandes con y sin axón (Figura 41). En resumen, la probando presenta un cuadro clínico moderado que es muy diferente cuando se compara con el resto de familiares portadores de la mutación GDAP1 p.R120W, que son prácticamente asintomáticos (Pla-Martin et al., 2015). Además, las portadoras en la fCMT-408 de únicamente la variante JPH1 p.R213P (Figura 40, IDs II-5 y III-2) no presentan ningún síntoma neurológico (Pla-Martin et al., 2015), y por lo tanto esta variante por sí sola no es capaz de provocar ninguna afectación.

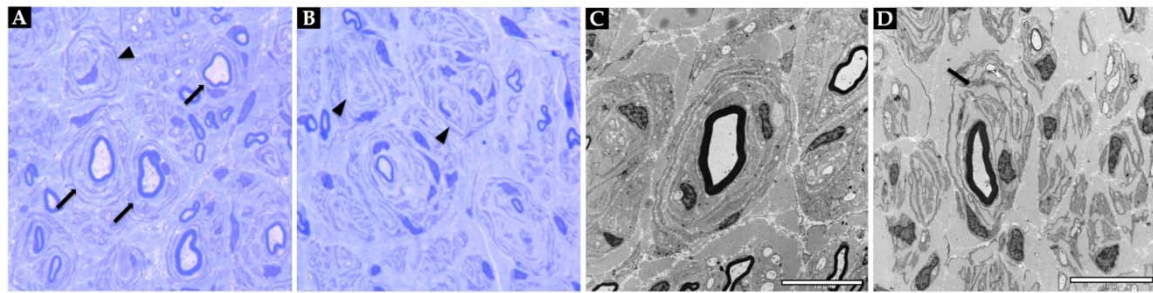


Figura 41. Biopsia de nervio sural de la probando de la familia fCMT-408. (A, B) Secciones transversales semifinas de la biopsia de nervio sural teñidas con azul de toluidina, en las que se observa una importante reducción en la cantidad de fibras mielinizadas, así como la presencia de numerosos bulbos de cebolla tanto clásicos (flechas), como grandes y atípicos (cabezas de flecha) sin axón (100x). (C, D) Imágenes de microscopía electrónica, mostrando un bulbo de cebolla clásico con múltiples capas concéntricas de procesos citoplasmáticos de células de Schwann alrededor de un axón mielinizado (C). Bulbo de cebolla atípico (D) con procesos irregulares de interdigitación y ramificación de célula de Schwann (flecha). La barra de escala representa 10 μ m.

Se han descrito casos aislados en los que la neuropatía se presenta con mayor gravedad debido a la combinación de mutaciones en *GDAP1* y *MFN2* (Cassereau et al., 2011, Vital et al., 2012, Kostera-Pruszczyk et al., 2014). En la probando (Figura 40A, ID III:1) descartamos la posible presencia adicional de mutaciones en el gen *MFN2* (Pla-Martin et al., 2015). En su conjunto, la variante JPH1 p.R213P podría actuar como modificador y participar en el fenotipo observado en la probando de la familia fCMT-408.

3.5 JPH1 p.R213P no rescata los defectos en el SOCE de las células deficientes en *GDAP1*

Teniendo en cuenta los hallazgos del rastreo mutacional de *JPH1*, quisimos evaluar el comportamiento de las variantes identificadas sobre el SOCE tanto en células SH-SY5Y control como en células *GDAP1* KD. La sobreexpresión tanto de *JPH1* WT como de la variante p.D624H en células control SH-SY5Y no tienen ningún efecto sobre los niveles de calcio basal, mientras que la expresión de *JPH1* p.R213P produce su disminución (Figura 42A). Por ello, todos los valores fueron normalizados al ratio basal para comparar las respuestas de las diferentes variantes. Ninguna de las variantes de *JPH1* produce alteraciones ni en la salida de calcio inducida por TG ni en el SOCE (Figura 42B), lo que sugiere que estas variantes de *JPH1* no son capaces de producir alteraciones por sí solas. Anteriormente vimos que *JPH1* es capaz de rescatar los defectos de las células *GDAP1* KD (Figura 38). Usando esta aproximación experimental, quisimos evaluar la capacidad de rescate de las variantes de *JPH1*. La variante *JPH1* p.D624H es capaz de rescatar los defectos en el SOCE y en la salida de calcio por TG, al igual que lo hace *JPH1* WT y la re-expresión de *GDAP1*, mientras que la variante *JPH1* p.R213P es incapaz de producir este rescate (Figura 42C).

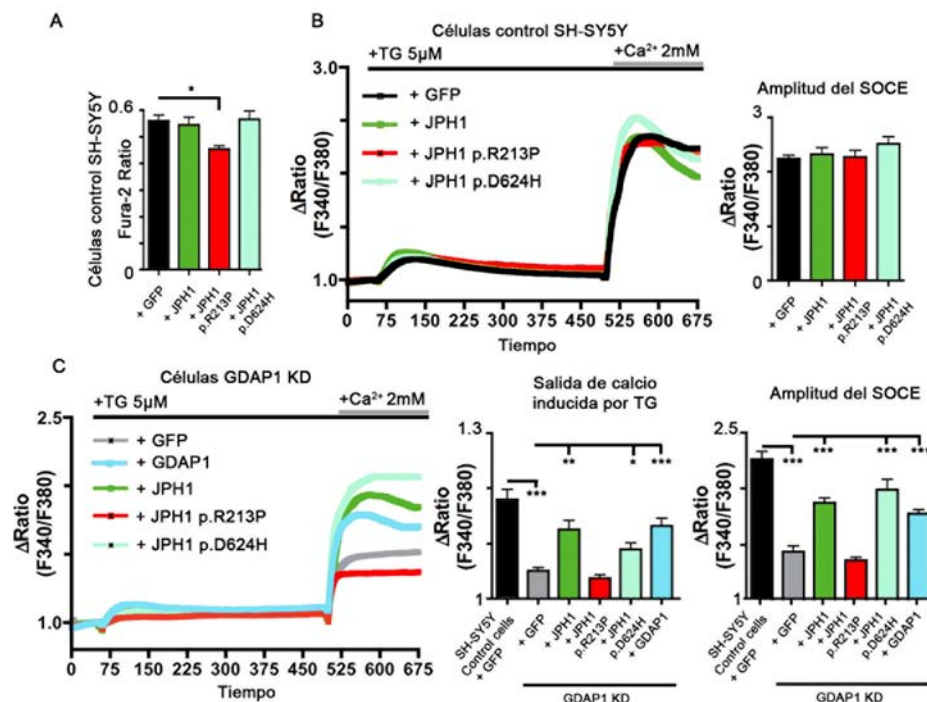


Figura 42. JPH1 p.R213P no rescata los defectos del SOCE presente en células con silenciamiento para GDAP1. (A) Análisis de los niveles del calcio citosólico basal en células control SH-SY5Y sobreexpresando el vector bicistrónico pCAGIG vacío (+GFP) o con JPH1 WT, p.R213P o p.D624H. Cambios en el cociente de fluorescencia de la sonda Fura-2 normalizado frente a los valores basales en células control SH-SY5Y (B) o en células GDAP1 KD (C). Las medidas reflejan las variaciones en la concentración de calcio citosólico. El vaciado de calcio del retículo se indujo mediante la adición de TG 5 μ M en medio libre de calcio, mientras que el SOCE se activó tras la adición de calcio 2 mM. Se analizó el efecto de la sobreexpresión de las distintas formas de JPH1. Como control positivo del rescate se expresó GDAP1. Como control se analizaron células transfectadas con el vector bicistrónico pCAGIG vacío. Se muestran las cuantificaciones del pico debido a la salida de calcio del retículo debido a la adición de TG (C) y del pico del SOCE (B y C). One-way ANOVA, test de Tukey, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Las barras de error representan la SEM.

Los resultados obtenidos podrían ser indicativos de una posible pérdida funcional de JPH1 p.R213P. Sin embargo, los estudios de localización subcelular realizados recientemente sugieren otro mecanismo que explicaría la falta de rescate de los defectos en el SOCE en células GDAP1 KD por parte de JPH1 p.R213P (Pla-Martin et al., 2015). Tras la inducción del mecanismo del SOCE con TG en células control SH-SY5Y, tanto JPH1 WT como las formas p.R213P y p.D624H, forman estructuras tipo puncta y colocalizan con STIM1 oligomerizado (Pla-Martin et al., 2015). Y este comportamiento es idéntico para JPH1 WT y p.D624H en células GDAP1 KD (Pla-Martin et al., 2015). En cambio, en células GDAP1 KD, JPH1 p.R213P afecta a la oligomerización de STIM1, la proteína activadora del SOCE, y previene la migración de JPH1 con STIM1 tras la inducción del SOCE (Pla-Martin et al., 2015). Los defectos en la migración de JPH1 p.R213P así como el efecto negativo sobre STIM1 se corrigen al re-expresar GDAP1 en las células GDAP1 KD, y tampoco se observan en células control SH-SY5Y (Pla-Martin et al., 2015). Por tanto, parece que ante la reducción o ausencia de GDAP1, JPH1 p.R213P no es capaz de migrar correctamente y afecta a la función de STIM1, lo que podría explicar por qué JPH1 p.R213P no es capaz de rescatar los defectos en el SOCE presente en las células GDAP1 KD. Por otro lado, la variante JPH1 p.D624H, que había sido predicha como un polimorfismo benigno, no altera la función de JPH1 en ninguna de las condiciones estudiadas.

3.6 Defectos en el manejo del calcio debido a la combinación de la mutación GDAP1 p.R120W y la variante JPH1 p.R213P

Considerando que en la probando de la fCMT-408 se identificaron en heterocigosis y en *trans* las mutaciones GDAP1 p.R120W y JPH1 p.R213P, quisimos comprobar cuál es el efecto en la homeostasis del calcio cuando se combinan en células SH-SY5Y. La presencia de ambas mutaciones provoca defectos en el manejo del calcio, con un incremento en los niveles basales de calcio y una disminución drástica en el SOCE (Figura 43), lo que sugiere que la combinación de GDAP1 p.R120W y JPH1 p.R213P conduce a una elevación de los niveles citosólicos de calcio y una afectación del SOCE.

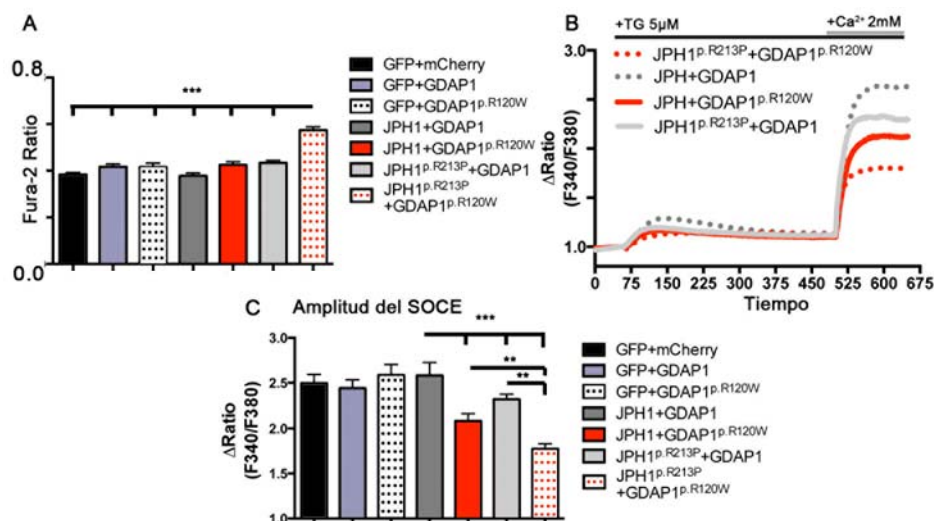


Figura 43. Defectos en el manejo del calcio debido a la combinación de la mutación GDAP1 p.R120W y la variante JPH1 p.R213P. (A) Análisis de los niveles del calcio citosólico basal en células SH-SY5Y sobreexpresando el plásmido bicistrónico pCAGIG con JPH1 WT o p.R213P y GDAP1 WT o p.R120W como proteína de fusión con mCherry. Como control se transfectaron los vectores vacíos. (B) Cambios en el cociente de fluorescencia de la sonda Fura-2 normalizado frente a los valores basales en células SH-SY5Y sobreexpresando el plásmido bicistrónico pCAGIG con JPH1 WT o p.R213P y mCherry-GDAP1 WT o p.R120W. Como control se transfectaron los vectores vacíos. El vaciado de calcio del retículo se indujo mediante la adición de TG 5 μ M en medio libre de calcio, mientras que el SOCE se activó tras la adición de calcio 2 mM. (C) Cuantificaciones del pico del SOCE. One-way ANOVA, test de Tukey, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Las barras de error representan la SEM.

La variante JPH1 p.R213P por sí sola no produce ninguna alteración en el SOCE, como habíamos descartado al sobreexpresar en células SH-SY5Y (Figura 42B). De hecho esta variante se encuentra en los familiares sanos II:5 y III:2 de la fCMT-408 (Figura 40B). Sin embargo, JPH1 p.R213P es incapaz de rescatar los defectos del SOCE en las células GDAP1 KD (Figura 40C), y ya habíamos comentado que en ausencia de GDAP1, JPH1 p.R213P muestra defectos en la migración y afecta a la oligomerización de STIM1 (Pla-Martin et al., 2015). Cuando se combinan JPH1 p.R213P y GDAP1 p.R120W, asemejando la condición genética de la probando de la fCMT-408, se produce una alteración en la homeostasis del calcio. Este resultado va en línea con que el efecto de JPH1 p.R213P no se debe a una pérdida de función, al igual que habíamos comentado con anterioridad. Recientemente hemos visto que a nivel subcelular GDAP1 p.R120W induce una mayor asociación de JPH1 p.R213P con la mitocondria (Pla-Martin et al., 2015), lo que podría participar en los defectos en el manejo del calcio que se observan. El mecanismo molecular exacto por el cual la coexistencia de ambas mutaciones, GDAP1 p.R120W y

JPH1 p.R213P, produce elevación de los niveles citosólicos de calcio y defectos en el SOCE permanece por conocer. JPH1 p.R213P por sí misma no produce ningún síntoma, pero parece que podría actuar como un modificador negativo de la mutación GDAP1 p.R120W, dando lugar a un cuadro clínico más severo. La ganancia de toxicidad debida a niveles incrementados de calcio citosólico ha sido ampliamente descrito en neurodegeneración, siendo una ruta común en la patogénesis de muchas enfermedades (Duchen, 2012), incluyendo formas de CMT axonal, como la debida a mutaciones dominantes en el gen *TRPV4* (Klein et al., 2011).

Por otro lado, la variabilidad clínica observada en las familias fCMT-213 y fCMT-214 (rangos en la escala CMTNS, 5-21) (Sivera et al., 2010), no puede ser explicada por la influencia de la variante JPH1 p.D624H, predicha como un polimorfismo benigno y que además, de acuerdo a los estudios funcionales no altera la función de JPH1. Estos datos sugieren que otras variantes en *JPH1* (por ejemplo variantes no exónicas) o incluso cambios en otros genes puedan participar como modificadores en otras familias CMT2K.

Hasta ahora únicamente nos habíamos centrado en variantes localizadas en regiones codificantes del gen *JPH1* que provocasen cambio de aminoácido en la proteína. Sin embargo, ya se había especulado con anterioridad que la expresión alterada de las JPH podría estar relacionada con algunos de los cambios fenotípicos asociados con ciertas enfermedades musculares así como del envejecimiento (Hirata et al., 2006). Cada vez hay más evidencias que sugieren que la desregulación de JPH pueden inducir alteraciones patológicas, al menos en tejido muscular (Takeshima et al., 2015). Además, se ha visto que los niveles proteicos de JPH2 están regulados a lo largo del tiempo (Chen et al., 2013), y la alteración en sus niveles está implicada en diferentes tipos de cardiomiopatías tanto en modelos animales como en pacientes (Minamisawa et al., 2004, Landstrom et al., 2011, Beavers et al., 2014). Por todo ello, quisimos evaluar si en el sistema nervioso existe una regulación en la expresión de JPH1, y si la regulación de sus niveles podría tener relevancia en el caso de neuropatías, y particularmente en CMT2K.

3.7 Regulación de la expresión de JPH1 en el sistema nervioso periférico

Los niveles proteicos de Jph1 en el nervio ciático, y no tanto en la médula espinal, se muestran regulados en el tiempo (Figura 44). La inducción de la expresión de Jph1 en el tiempo se ha observado con anterioridad en músculo esquelético, donde se detectaban mayores niveles de proteína a partir de la edad post-natal P14 (Ito et al., 2001). También se ha visto la regulación de la expresión en el tiempo para otras JPH, como los niveles proteicos de Jph2 en corazón (Chen et al., 2013), lo que sugiere la importancia de una regulación adecuada en los niveles de esta familia de proteínas en vertebrados. Además, en invertebrados, como se puede comprobar en los niveles de expresión del homólogo de las JPH en *D. melanogaster* (*Jp*, *CG4405*), su expresión también está regulada en el tiempo (Anexo 8).

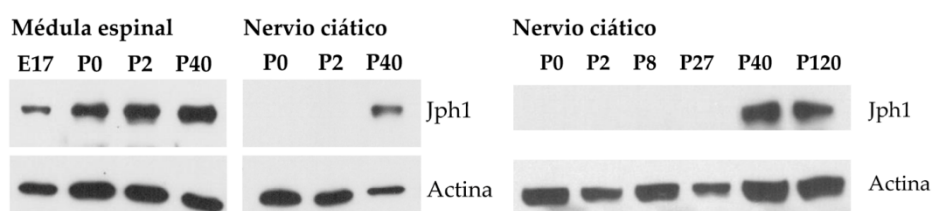


Figura 44. Perfil de expresión temporal de la proteína Jph1 en sistema nervioso. Análisis mediante WB de los niveles proteicos de Jph1 en médula espinal y nervio ciático de ratones de diferentes edades embrionaria (E17) y/o post-natales (P) indicados. Como control de carga se analizó la actina.

JPH1 no sólo está regulada en el tiempo, sino que en neuronas su expresión parece que también se modula respondiendo ante ciertos tipos de estrés celular: en células de neuroblastoma SH-SY5Y se ha descrito el incremento en la expresión de *JPH1* al tratar con atrazina, un inductor de estrés mitocondrial (Koo et al., 2012). Recientemente habíamos visto que a nivel subcelular, al producir el vaciado de calcio del retículo endoplasmático con thapsigargina (TG), JPH1 respondía migrando y colocalizando en los puntos con STIM1 (Pla-Martin et al., 2015), la proteína sensora de los niveles de calcio en el retículo y que junto al canal ORAI1 actúan en la respuesta del SOCE. El tratamiento prolongado con TG produce estrés de retículo. Quisimos evaluar si, al igual que se ha descrito en el estrés mitocondrial inducido por atrazina, la expresión de *JPH1* también se viera regulada por el estrés de retículo. Efectivamente, como se puede ver en la Figura 45, los niveles de expresión de *JPH1* en células SH-SY5Y se ven disminuidos tras la inducción de estrés de retículo por TG. Por tanto, la expresión de *JPH1* se regula en el tiempo en el PNS, pero también se regula en respuesta al estrés mitocondrial y de retículo.

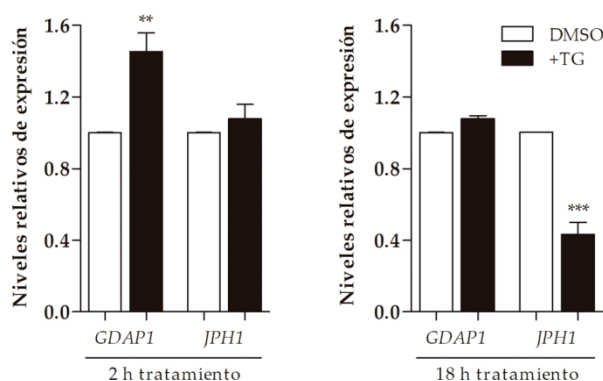


Figura 45. Niveles de expresión tras la inducción de estrés de retículo. Cuantificación mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de *GDAP1* y *JPH1* en las células SH-SY5Y tratadas con TG 0,1 μ M (barras negras) durante 2 h (izquierda) o 18 h (derecha) para inducir estrés de retículo. Como condición control se trataron células SH-SY5Y con el vehículo DMSO (barras blancas) durante los mismos periodos de tiempo. Los niveles de expresión se normalizaron frente a *GAPDH* y se relativizaron frente a los niveles de expresión obtenidos en la condición control con DMSO.

Previamente se había sugerido un papel de *GDAP1* en la respuesta frente al estrés oxidativo (Noack et al., 2012, Niemann et al., 2014); su expresión puede estar regulada por los niveles intracelulares de GSH, y además *GDAP1* protege frente a la toxicidad oxidativa inducida por glutamato (Noack et al., 2012). Por lo que resulta interesante el incremento de expresión de *GDAP1* observado tras inducir el estrés de retículo, al menos a las 4 h (Figura 45). Curiosamente, se había descrito que *MFN2*, pero no otros genes implicados también en dinámica mitocondrial (*MFN1*, *OPA1*, *DRP1* y *FIS1*), también responde incrementando su expresión tras inducir estrés de retículo con TG, por lo menos en fibroblastos (Ngho et al., 2012). En ambos genes, a partir de datos de ChIP-Seq de ENCODE contenidos en UCSC (Transcription Factor ChIP-seq from ENCODE (V2)), se ha detectado en la región adyacente a sus 5'-UTRs la unión de la proteína ATF3, un factor de transcripción que se induce por estrés de retículo y que actúa como activador transcriptional de genes de estrés (Jiang et al., 2004). Es posible que el incremento de los

niveles de expresión de *GDAP1* y *MFN2* esté mediado por la inducción de ATF3, lo que implicaría a estos genes directamente en la respuesta al estrés de retículo. De hecho, se ha demostrado que la falta de *MFN2* induce estrés de retículo (Ngoh et al., 2012), y que la falta de *GDAP1* promueve una mayor susceptibilidad a dicho estrés (Pla-Martin, 2012, Bolinches-Amoros, 2014, Pla-Martin et al., 2014).

3.8 Los genes *JPH* tienen regiones 3'-UTR largas y que en el caso de *JPH1* está conservada en vertebrados

A lo largo del trabajo hemos demostrado la importancia de *JPH1* como modificador en CMT2K, pero también hemos evidenciado la existencia de una regulación fina en la expresión de *JPH1* tanto en el tiempo, como ante estrés de retículo o mitocondrial. Además, como hemos comentado anteriormente, la alteración de los niveles de *JPH* puede conllevar consecuencias patológicas (Takeshima et al., 2015), como los niveles alterados de *JPH2* participando en el desarrollo de cardiomiopatías (Beavers et al., 2014). Por todo ello, planteamos la hipótesis de que pudieran existir mutaciones o polimorfismos en regiones reguladoras del gen *JPH1* que afectasen a la regulación de sus niveles de expresión, pudiendo participar de la modificación clínica en familias CMT2K.

Se llevaron a cabo diferentes estrategias para identificar regiones genómicas altamente conservadas en el gen *JPH1* que pudieran ser relevantes en la regulación de su expresión (Figura 46). A parte de las regiones exónicas codificantes, destaca la elevada conservación observada en la región 3'-UTR de *JPH1* en vertebrados (Figura 46).

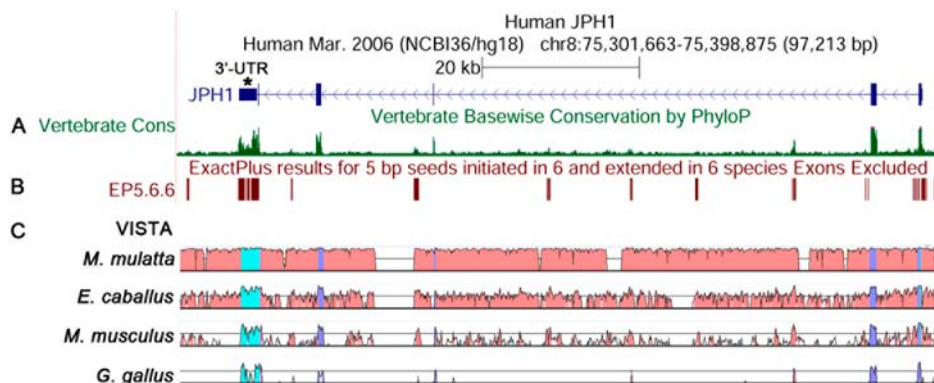


Figura 46. Identificación de regiones conservadas en el gen *JPH1*. En la parte superior se muestra la estructura del gen *JPH1* en el genoma humano, representado en orientación 3'-5'. Se indica con un asterisco la región 3'-UTR. (A) Datos de conservación de *JPH1* en vertebrados provenientes de los datos de PhyloP contenidos en UCSC. (B) Regiones conservadas de *JPH1* identificadas mediante la herramienta ExactPlus, excluyendo los exones codificantes y las regiones repetitivas. (C) Estudio genómico comparativo del gen *JPH1* humano respecto del ortólogo correspondiente en cada uno de los genomas de *Macaca mulatta*, *Equus caballus*, *Mus musculus* y *Gallus gallus*, para identificar las regiones más conservadas. En rosa se muestran las regiones intrónicas, en azul oscuro los exones codificantes, y en azul claro las regiones UTR.

Un rasgo característico de los genes *JPH* es la presencia de regiones 3'-UTR muy largas. En mamíferos hay cuatro genes *JPH*, todos ellos con largas 3'-UTR (Figura 47, Anexo 9); también se observan 3'-UTR largas en los genes *JPH1* de vertebrados (Anexo 9) e incluso en los ortólogos de invertebrados (Figura 47, Anexo 9), con longitudes de 0,8 Kb en *C. elegans*, 1,8 Kb en *D. melanogaster* y hasta de 2,4 Kb en el caso del gen *JPH1* humano. Estos valores son muy superiores a las longitudes medias de las 3'-UTR de los genes en estas especies, siendo de 200 nt en los casos de *C. elegans* y *D. melanogaster* y de 995 nt en humanos (Retelska et al., 2006, Mangone et al., 2010). En su conjunto, se pone de

manifiesto la existencia de regiones 3'-UTRs largas en los genes *JPH* y que esta región está muy conservada en el caso de *JPH1* en vertebrados, y que probablemente este hecho responda a una estricta necesidad para su regulación.

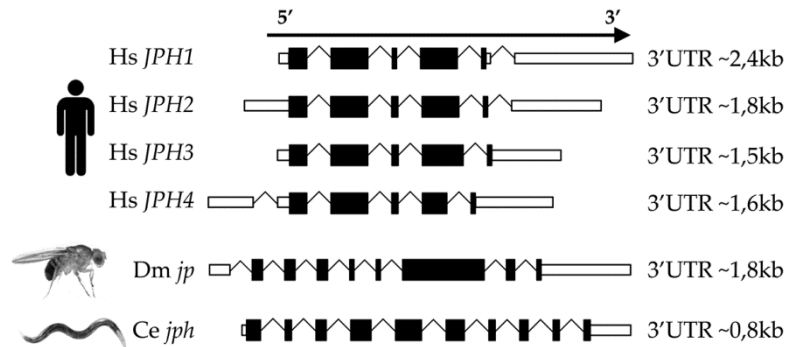


Figura 47. Los genes *JPH* contienen regiones 3'-UTR muy largas. Comparación de la estructura de los genes de las *JPH* de humanos (Hs), como representante de vertebrados, y de las especies de invertebrados *D. melanogaster* (DM) y *C. elegans* (Ce). Se muestran con recuadros negros las regiones exónicas codificantes, y en blanco las regiones UTR. Las regiones intrónicas no se han dibujado a escala. Se indican los tamaños de las regiones 3'-UTR de cada gen.

Aquellos genes cuya expresión se regula temporal o espacialmente, suelen contener regiones 3'-UTRs largas, ya que hay mayor número de sitios de unión a distintos miRNAs y permite una regulación más robusta (Cheng et al., 2009). De hecho, se ha demostrado que la expresión del gen *JPH2*, cuyas mutaciones son responsables de cardiopatías hipertróficas hereditarias y que su expresión se reprime en diferentes modelos de cardiomiopatías, está regulada por el miRNA mir-24, y que esta regulación tiene relevancia clínica en el desarrollo de dichas patologías cardíacas (Xu et al., 2012, Li et al., 2013b). En la región 3'-UTR de *JPH1*, a partir de la información extraída de TargetScan (Anexo 10), destaca la presencia de sitios conservados en vertebrados de unión a miRNAs relacionados con funciones reguladoras en el sistema nervioso, como miR-144, miR-145 y miR-214, relacionados recientemente en respuesta a daño en nervio ciático (Zhang et al., 2011), o el miR-124, importante por su relación con el sistema nervioso y con su regeneración (Cao et al., 2007, Wu et al., 2011, Nagata et al., 2014). Las regiones 3'-UTRs no sólo son importantes por ser dianas de miRNAs, sino que son fundamentales en el control de la estabilidad del mRNA, de la tasa de su traducción y hasta de su transporte (Andreassi and Riccio, 2009, Barrett et al., 2012). Incluso se ha visto en neuronas que en ciertos genes, las regiones 3'-UTR pueden influir en la estabilidad del mRNA en respuesta a señales de calcio (Fukuchi and Tsuda, 2010).

En su conjunto, la región 3'-UTR del gen *JPH1* pudiera ser una región candidata donde mutaciones o polimorfismos pudieran provocar variaciones en sus niveles de expresión y que en combinación con mutaciones dominantes de *GDAP1*, pudieran ser responsables de la variabilidad intrafamiliar en familias CMT2K.

3.9 Rastreo mutacional de la región 3'-UTR del gen *JPH1* en familias CMT2K con la mutación dominante *GDAP1* p.R120W

De entre los hallazgos de la secuenciación de las 2,4 Kb de la región 3'-UTR del gen *JPH1* en los enfermos portadores de la mutación *GDAP1* p.R120W pertenecientes a la serie clínica de familias CMT2K, destacan los cambios en heterocigosis NM_020647.2:c.*670C>T (rs13277002; MAF [G] = 0,19) y NM_020647.2:c.*1962G>A

(rs57375187; MAF [T] =0,05) identificados respectivamente en el probando de la fCMT-408 y en el probando de la fCMT-420. La posición correspondiente al polimorfismo rs13277002, en el genoma humano de referencia ha sido anotada con el alelo de menor frecuencia (rs13277002C). Por esta razón, el cambio observado en el probando de la familia fCMT-408 debería ser NM_020647.2:c.*670T>C. El resto de individuos secuenciados portan en homocigosis el alelo de mayor frecuencia rs13277002T.

De acuerdo con el predictor mirSNP (Liu et al., 2012) sobre el efecto de SNPs sobre posibles sitios de unión a miRNAs, ambos cambios podrían tener consecuencias. El cambio c.*670T>C podría alterar el hipotético sitio de unión del miR-1284 y/o reducir la posible unión del miR-4536-5p. El cambio c.*1962G>A podría reducir la unión del miR-330-3p y/o crear sitios de unión a miR-491-3p y miR-586. Sin embargo, no hay que olvidar que estos cambios también podrían alterar la unión de proteínas o incluso modificar la estructura secundaria del 3'-UTR en el mRNA.

En diferentes genes se han descrito variantes en regiones 3'-UTR que confieren riesgo a desarrollar enfermedades, pero también este tipo de variantes pueden ser la causa primaria de enfermedades mendelianas e incluso son capaces de actuar como modificadores de la severidad del fenotipo clínico en enfermedades monogénicas (Wang et al., 2008a, Delay et al., 2011, Liang et al., 2011, Papagregoriou et al., 2012, Akdeli et al., 2014, Dusl et al., 2015, Haghnejad et al., 2015).

3.10 Los portadores de la mutación GDAP1 p.R120W junto con la variante JPH1 c.*1962G>A presentan un cuadro clínico más grave

El cambio c.*670T>C en la región 3'-UTR identificado en la probando de la fCMT-408 (Figura 40, ID III:1), ya que no se ha detectado en su padre (ID II-4), seguramente haya sido transmitido por su madre sana (ID II-5), y por tanto, la variante estaría en *cis* con el cambio JPH1 p.R213P, y podría ser candidato a actuar como modificador.

El cambio JPH1 c.*1962G>A identificado en el probando de la fCMT-420 (Figura 48, ID III:1), también está presente en su hermano enfermo (ID III:2). Dado que el padre (ID II:1) no lo presenta, probablemente los pacientes III:1 y III:2 lo hayan heredado de la madre sana (ID II:2). El resto de familiares portadores de la mutación GDAP1 p.R120W no presentan dicho cambio en la región 3'-UTR de JPH1. Esta familia se caracteriza por la presencia de una gran variabilidad intrafamiliar. Tanto el padre (ID II:1) como el tío (ID II:3) del probando son prácticamente asintomáticos. Sin embargo, tanto el probando como su hermano (III:1 y III:2, de 10 y 8 años de edad respectivamente) cursan con un cuadro clínico más grave, con aparición muy temprana de los síntomas, mostrando importante discapacidad, atrofia y necesitando ortesis. Hemos descartado la existencia de posibles mutaciones en MFN2 como responsable de la clínica más grave tanto en el probando de la fCMT-420 (Figura 48, ID III:1) como en su hermano (ID III:2). Considerando que ambos niños comparten el cambio JPH1 c.*1962G>A, estando ausente en el resto de familiares enfermos prácticamente asintomáticos, este cambio es un potencial candidato como posible modificador negativo.

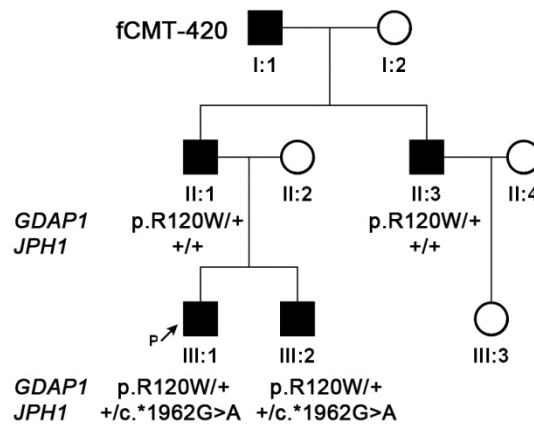


Figura 48. Familia fCMT-420. Árbol genealógico de la familia fCMT-420. Todos los individuos afectados portan la mutación *GDAP1* p.R120W, mientras que los pacientes III:1 y III:2 adicionalmente portan la variante *JPH1* c.*1962G>A.

3.11 La variante *JPH1* c.*1962G>A afecta a los niveles de expresión

Se realizaron ensayos de tipo luciferasa para determinar el efecto de las variantes candidatas identificadas en la región 3'-UTR de la *JPH1* sobre sus niveles de expresión. Como se puede ver en la Figura 49, la variante *JPH1* c.*670T>C no afecta de forma relevante, sin embargo la variante *JPH1* c.*1962G>A produce un fuerte incremento de los niveles de expresión obtenidos. Estos datos sugieren que la variante *JPH1* c.*670T>C no parece que contribuya como modificador del fenotipo en el probando de la fCMT-408, y en este individuo, la variante *JPH1* p.R213P sería la variante con mayor influencia sobre el propio *JPH1*. En cambio, para el caso de la variante *JPH1* c.*1962G>A podría ser responsable de la alteración de los niveles de expresión. Es posible que en presencia de un daño crónico en nervio ciático debido a *GDAP1* p.R120W, niveles desregulados de *JPH1* puedan contribuir a una potenciación de los efectos deletéreos, probablemente influyendo sobre la homeostasis del calcio.

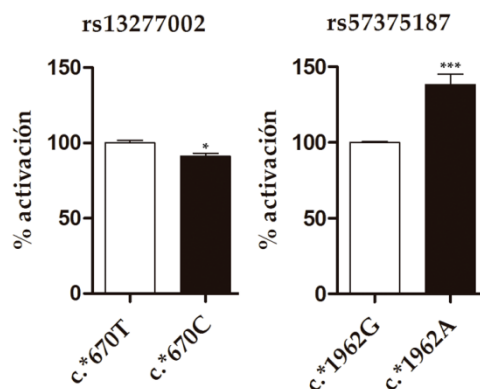


Figura 49. Efecto sobre los niveles de expresión de las variantes identificadas en 3'UTR de *JPH1*. Empleamos el vector pMIR, que expresa luciferasa bajo el promotor CMV, donde clonamos en su 3'-UTR tres copias en tándem de la secuencia que contiene cada variante a estudiar que se ha identificado en la 3'-UTR de *JPH1*. Las construcciones generadas (pMIR-3x_rs13277002T, pMIR-3x_rs13277002C, pMIR-3x_rs57375187G o pMIR-3x_rs57375187A) se transfectaron en células SH-SY5Y para evaluar el efecto de cada variante sobre los niveles de expresión de luciferasa. Los valores de la actividad luciferasa se normalizaron con los niveles de la actividad renilla. Se muestran los resultados relativizados frente a los del alelo de mayor frecuencia para cada polimorfismo (barras blancas). Las barras negras corresponden a los valores obtenidos con los alelos de menor frecuencia de los polimorfismos rs13277002 y rs57375187, identificados en las familias fCMT-408 y fCMT-420 respectivamente. En cada experimento se transfectaron tres pocillos por condición y cada experimento se realizó un mínimo de tres veces independientes.

Como se ha comentado anteriormente, se ha relacionado la desregulación de JPH con diferentes patologías, fundamentalmente del músculo esquelético y cardíaco (Takeshima et al., 2015). En distrofia muscular se ha detectado la alteración en los niveles proteicos de JPH1 debido a procesos de proteólisis (Murphy et al., 2013); pero también la desregulación de la expresión de *JPH2*, así como mutaciones en este gen, está implicada en disfunción cardíaca así como en diferentes tipos de cardiomiopatías tanto en modelos animales como en pacientes (Minamisawa et al., 2004, Landstrom et al., 2011, Murphy et al., 2013, Beavers et al., 2014). En el sistema nervioso, los niveles de JPH también tienen su relevancia. Los ratones *knock-out* de *Jph3*, tanto heterocigotos como homocigotos, muestran descoordinación motora así como una disfunción motora progresiva, (Nishi et al., 2002, Seixas et al., 2012), a pesar de seguir expresando *Jph4* (Nishi et al., 2003); mientras que los ratones doble *knockt-out* de *Jph3* y *Jph4* muestran además alteraciones de la memoria debido a defectos en la plasticidad de neuronas del hipocampo (Moriguchi et al., 2006). En humanos, las mutaciones dominantes en el gen *JPH3*, por la expansión anormal de repeticiones de tripletes CAG/CTG en el exón alternativo 2A de este gen, son responsables de la enfermedad de Huntington-like 2 (HDL2 MIM 606438) (Holmes et al., 2001). La presencia del fenotipo motor en ratones *knock-out* de *Jph3* en heterocigotos, así como la información obtenida a partir de estudios con los modelos murinos de HDL2 y de muestras *post-mortem* de cerebro de pacientes HDL2, han demostrado que en la patogénesis de HDL2 contribuye principalmente la disminución en los niveles proteicos de JPH3 (Seixas et al., 2012, Rudnicki et al., 2014).

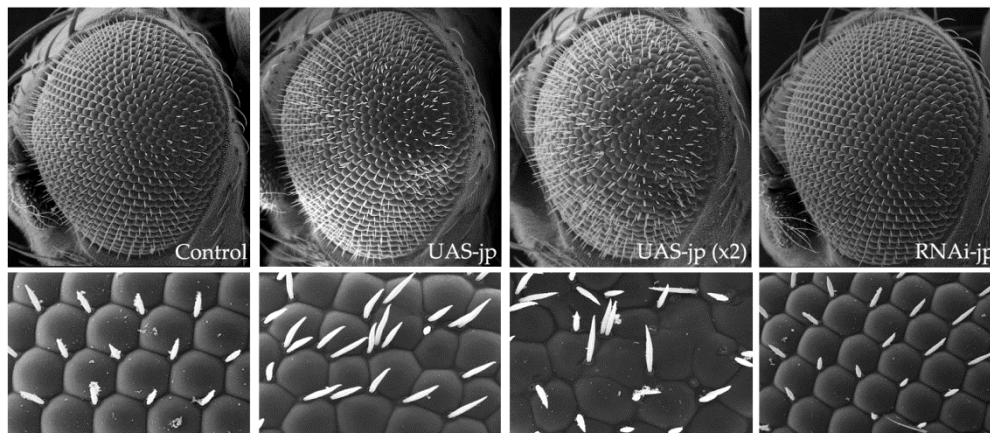
Hemos visto que JPH1 es un modificador genético y funcional de GDAP1, que está presente en el PNS, y que su expresión se regula tanto en el tiempo como ante el estrés de retículo o mitocondrial. La falta de GDAP1 produce una mayor susceptibilidad a estrés de retículo (Pla-Martin, 2012, Bolinches-Amoros, 2014, Pla-Martin et al., 2014), mientras que las mutaciones dominantes causan un bloqueo de la fusión mitocondrial (Niemann et al., 2009, Zimon et al., 2011), provocando un daño mitocondrial por aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), alteración del $\Delta\psi_m$ y mayor susceptibilidad a apoptosis (Niemann et al., 2009), e incluso también causan alteraciones en la homeostasis del calcio, así que es posible que adicionalmente se pueda inducir cierto estrés de retículo (Pla-Martin et al., 2014). La variante c.*1962G>A en la región 3'-UTR de *JPH1*, que conduce a niveles alterados del transcrito de *JPH1*, por sí sola no parece tener ningún efecto, puesto que probablemente esté presente en la madre sana de la fCMT-420 (Figura 48, ID II:2). Sin embargo, es posible que la presencia de niveles desregulados de *JPH1* actúe como un modificador negativo en combinación con un daño crónico axonal debido a la mutación dominante GDAP1 p.R120W, como ocurre en el probando de la fCMT-420 y en su hermano, los pacientes con un cuadro clínico más grave en la familia. Para tratar de estudiar cuál es el efecto de la desregulación de niveles de JPH1 sobre un daño neural debido a GDAP1, recurrimos al empleo de modelos animales.

3.12 La combinación de alteraciones en *Jp* y *Gdap1* potencia el daño neural en *D. melanogaster*

En *D. melanogaster* existen homólogos tanto de *JPH1* como de *GDAP1*. El gen *Gdap1* (CG4623) de *D. melanogaster* es el homólogo de los genes *GDAP1* y *GDAPL1* de vertebrados (Marco et al., 2004, Lopez Del Amo et al., 2015), mientras el gen *Junctophilin* (*Jp*, CG4405) es el de los genes *JPH1-4* (Garbino et al., 2009). Recientemente se ha descrito

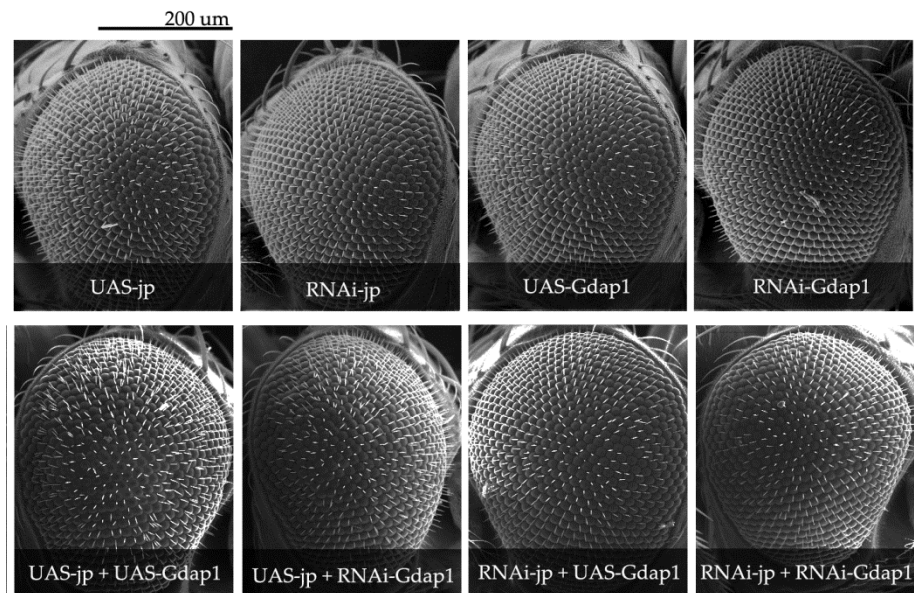
como la falta o la sobreexpresión de *Gdap1* en *D. melanogaster*, modelizando una pérdida o una ganancia de función respectivamente, produce neurodegeneración de los fotorreceptores (Lopez Del Amo et al., 2015). Quisimos estudiar los posibles efectos de la desregulación de *Jp* sobre el daño neural presente en estos modelos de *Gdap1*.

En primer lugar analizamos el posible efecto de sobreexpresar o silenciar *Jp* específicamente en el ojo de *D. melanogaster* mediante el *driver* GMR-Gal4. Como se puede ver en la Figura 50, el silenciamiento de *Jp* mediante RNAi no tiene consecuencias sobre la morfología externa del ojo de *D. melanogaster*. Sin embargo, la sobreexpresión de *Jp* altera la morfología externa, produciendo desorganización de omatidios y presencia de quetas interomatidiales supernumerarias. Además, el fenotipo observado se incrementa al sobreexpresar mayores niveles de *Jp* (Figura 50). En el caso de *Gdap1*, ya se había demostrado que ni su interferencia ni su sobreexpresión conllevan alteraciones en la morfología externa del ojo (Lopez Del Amo et al., 2015).



Figuras 50. Efecto de la Junctophilina en la morfología externa del ojo. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del ojo de moscas de menos de una semana (4-6 días), con sobreexpresión (UAS-Jp) o silenciamiento (RNAi-Jp) de la Junctophilina específicamente en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4. En el caso de la sobreexpresión de la Junctophilina, se muestran los fenotipos de moscas con una copia (inserto en heterocigosis) o dos copias (2x, inserto en homocigosis). Como control se ha empleado el *driver* GMR-Gal4 en heterocigosis. Se muestran dos magnificaciones diferentes para cada uno de los genotipos.

Quisimos evaluar los posibles efectos sobre la morfología externa del ojo cuando se combinan alteraciones tanto de *Jp* como de *Gdap1* en *D. melanogaster*. Como se puede ver en la Figura 51, las distintas combinaciones de sobreexpresión y/o interferencia de *Jp* y *Gdap1*, no producen modificaciones relevantes de la apariencia externa del ojo cuando se compara con las alteraciones producidas por cada gen por separado. Sin embargo, la neurodegeneración de los fotorreceptores no siempre se ve reflejada en la morfología externa. De hecho, los modelos de sobreexpresión e interferencia de *Gdap1* en *D. melanogaster* suponen un ejemplo de ello, ya que a pesar de presentar una evidente neurodegeneración de los fotorreceptores a nivel interno, no tiene consecuencias en la morfología externa del ojo (Lopez Del Amo et al., 2015).



Figuras 51. Análisis de la morfología externa del ojo al combinar la sobreexpresión y/o interferencia de Jp y Gdap1. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del ojo de moscas de menos de una semana (4-6 días), con sobreexpresión (UAS-Jp) o silenciamiento (RNAi-Jp) de Jp en combinación con sobreexpresión (UAS-Gdap1) o silenciamiento (RNAi-Gdap1) de Gdap1, específicamente en ojo, mediante el *driver* GMR-Gal4.

Por ello, quisimos evaluar los posibles efectos a nivel interno, determinando el número de neuronas fotorreceptoras por omatidio en cada genotipo. En cada plano de corte transversal del ojo de *D. melanogaster*, se identifican siete fotorreceptores por omatidio, como se aprecia mayoritariamente en el control (Figura 52A, B), mientras que la modificación en los niveles de Jp provoca alteraciones en el número de fotorreceptores por omatidio (Figura 52A, B, C). La sobreexpresión de Jp causa una importante presencia de omatidios con más de siete fotorreceptores (Figura 52A, C), mientras que la falta de Jp induce la pérdida de fotorreceptores (Figura 52A, D). Todo ello parece indicar la importancia de unos niveles adecuados de Jp para un correcto desarrollo de los omatidios y posiblemente para el correcto mantenimiento de la viabilidad neuronal.

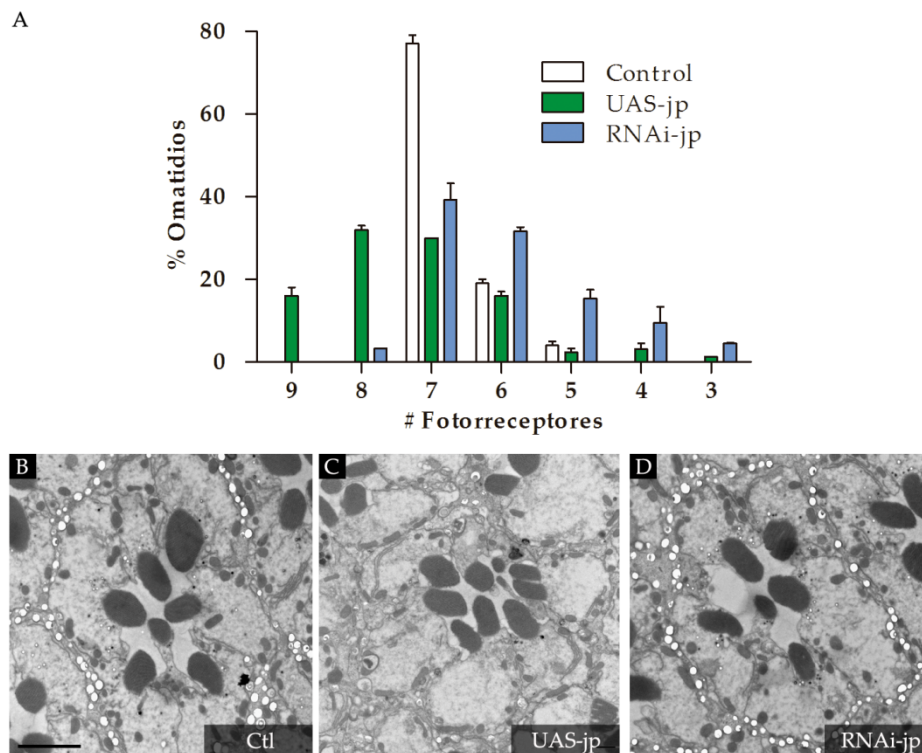


Figura 52. Efectos de *Jp* sobre el número de fotorreceptores. (A) Histograma del número de fotorreceptores por omatidio de moscas de menos de una semana sobreexpresando *Jp* (UAS-*Jp*) o con silenciamiento de *Jp* (RNAi-*Jp*) específicamente en ojo mediante el *driver* GMR-Gal4. Como control se han empleado moscas GMR-Gal4 en heterocigosis. Los contajes se han realizado a partir de un mínimo de tres individuos por genotipo. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de ojos de mosca control (B), con sobreexpresión de *Jp* (B y C) o con silenciamiento de *Jp* (E). La barra representa 3 μ m.

Al igual que se había descrito con anterioridad (Lopez Del Amo et al., 2015), la alteración de los niveles de *Gdap1* produce la degeneración de los fotorreceptores (Figura 53). Sin embargo, cuando se combinan en la misma mosca alteraciones en *Jp* y *Gdap1*, se induce una mayor neurodegeneración medida como un drástico incremento en la proporción de omatidios con menos de siete fotorreceptores. Como se puede apreciar en la Figura 53, la sobreexpresión de *Jp* en combinación con la sobreexpresión o la interferencia de *Gdap1* da lugar a la presencia de mayor número de omatidios con menor número de fotorreceptores. Esta pérdida de fotorreceptores se hace aún más evidente cuando se combina el silenciamiento de *Jp* con alteraciones en *Gdap1* (Figura 53). La degeneración no sólo se ve reflejada en la pérdida de fotorreceptores por omatidio, sino que además, la apariencia y organización de los omatidios está gravemente afectada en las combinaciones (Figuras 53). De hecho, en las combinaciones con la interferencia de *Jp* se induce la presencia de grandes estructuras de tipo vacuolar, siendo más generalizada y prominente en el caso de la combinación del silenciamiento de *Jp* con la sobreexpresión de *Gdap1*. Con todo, la combinación de alteraciones en ambos genes potencia considerablemente los daños neurales producidos por cada gen por separado.

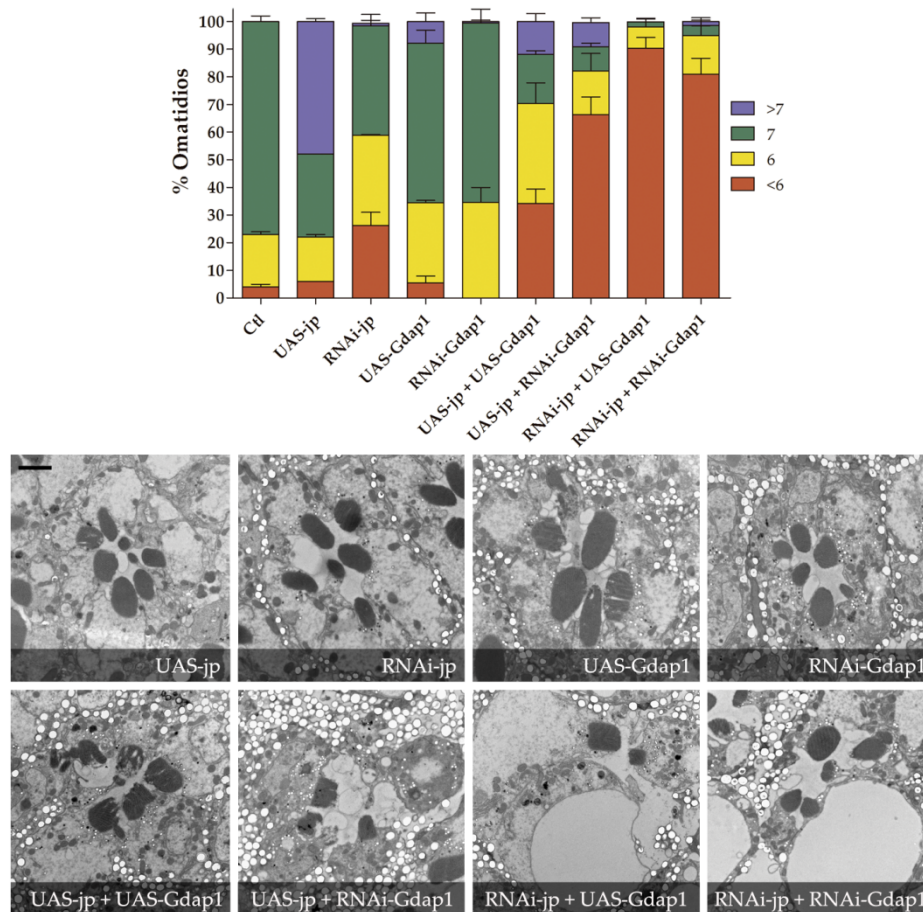


Figura 53. La combinación de alteraciones en los niveles de Jp y Gdap1 induce una mayor neurodegeneración. Mediante microscopía electrónica de transmisión a partir de cortes ultrafinos de ojos, se han analizado omatidios de moscas de menos de una semana en las que se ha combinado la sobreexpresión y/o interferencia de *Jp* y *Gdap1*. La expresión específica en el ojo se ha llevado a cabo empleando el *driver* GMR-Gal4. Como controles se ha incluido la sobreexpresión o interferencia de cada gen por separado, así como moscas con únicamente el *driver* GMR-Gal4 (Ctl). En la parte superior se muestra un histograma con las cuantificaciones de la proporción (en porcentaje) de omatidios con >7, 7, 6, o <6 fotorreceptores por omatidio de los genotipos indicados, con imágenes representativas en la parte inferior. Los contajes se han realizado a partir de un mínimo de tres individuos por genotipo. La barra representa 2 μ m.

Tras demostrar que *Jp* es capaz de potenciar el fenotipo debido a *Gdap1* en *D. melanogaster*, quisimos comprobar si la alteración de *Jp* también podría tener consecuencias sobre el fenotipo producido por otro gen CMT. Mutaciones en el gen *MFN2* causan la forma CMT2A2 (Zuchner et al., 2004). Funcionalmente *MFN2* presenta numerosas similitudes con *GDAP1*. *MFN2* se localiza en la membrana mitocondrial externa, donde participa en dinámica mitocondrial, aunque con un papel más directo y actuando como un factor de fusión (Chen et al., 2003, Song et al., 2009). También se localiza en las MAMs e influye en los contactos entre retículo-mitocondria y adicionalmente, la depleción de *MFN2* también afecta a la homeostasis de calcio (de Brito and Scorrano, 2008, Filadi et al., 2015).

El gen *Mfn* (*Marf*, CG3869) de *D. melanogaster* es el homólogo de los genes *MFN1* y *MFN2* de vertebrados (Hwa et al., 2002). La sobreexpresión de *Mfn* en *D. melanogaster*, provoca un fuerte fenotipo de ojo rugoso a nivel externo (Lopez Del Amo et al., 2015), pero causando además una disminución evidente de su tamaño (Figura 54D, G) en comparación con el control (Figura 54A, G). La combinación de la sobreexpresión de *Mfn* y *Jp* (Figura 54E, G), no da lugar a ninguna alteración evidente del fenotipo de ojo debido

a *Mfn* (Figura 54D, G). Sorprendentemente, la combinación de la sobreexpresión de *Mfn* con la interferencia de *Jp* provoca una clara potenciación del fenotipo, aumentando la despigmentación así como disminuyendo el tamaño de ojo (Figura 54F, G), en comparación con el efecto resultante de sobreexpresar únicamente *Mfn* (Figura 54D, G).

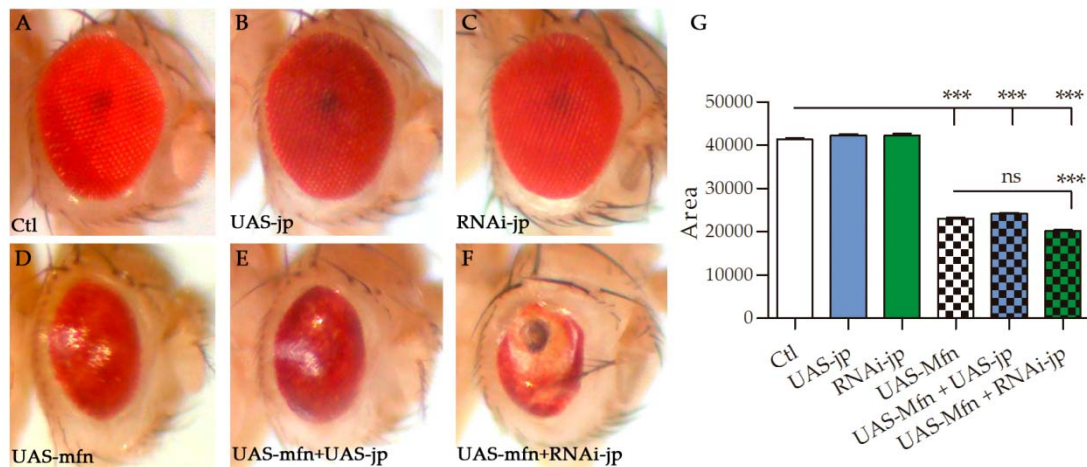


Figura 54. Efecto de *Jp* sobre el fenotipo externo del ojo debido a la sobreexpresión de *Mfn*. (A-F) Imágenes representativas del ojo de machos de menos de una semana de los genotipos indicados. Los elementos UAS y RNAi indicados se han sobreexpresado específicamente en ojo mediante el *driver* GMR-Gal4. Como control se han empleado moscas con únicamente el *driver* GMR-Gal4. (G) Representación de la media del área (píxeles al cuadrado) de los ojos de un mínimo de 20 machos por genotipo de menos de una semana (procedentes de al menos dos cruces independientes) medido mediante Image J a partir de imágenes tomadas con los mismos aumentos en una lupa con cámara acoplada. Análisis estadístico mediante ANOVA y aplicando el test de Tukey de comparación múltiple.

En su conjunto, demostramos que *Jp* es capaz de modificar el fenotipo debido a la sobreexpresión de otro gen CMT, como es *Mfn*. *GDAP1* y *MFN2* comparten diversas funciones celulares. Ambas son proteínas de la membrana mitocondrial externa, y participan, aunque de diferente forma, en dinámica mitocondrial, en la relación mitocondria-retículo, así como en la homeostasis de calcio (Pareyson et al., 2015). De hecho se ha demostrado su interacción génica tanto en *D. melanoster* como en *D. rerio* (Gonzaga-Jauregui et al., 2015, Lopez Del Amo et al., 2015), y en pacientes de CMT, la coexistencia de mutaciones en ambos genes da lugar a cuadros clínicos más graves (Cassereau et al., 2011, Vital et al., 2012, Kostera-Pruszczyk et al., 2014).

CMT2A2, debida a mutaciones en *MFN2*, es clínicamente muy heterogénea, cursando con cuadros clínicos leves hasta algunas formas graves. Puede presentarse como neuropatía CMT2 clásica, pero también puede dar lugar a formas más complejas en las que el CNS se puede ver también afectado (Bombelli et al., 2014, Stuppia et al., 2015). En algunos casos parte de la heterogéneidad clínica, evidenciada con una gran variabilidad interfamiliar, se explica con la diferente patogenicidad de las diferentes mutaciones en *MFN2* (Chung et al., 2006, Stuppia et al., 2015). Sin embargo, no en todos los casos se puede establecer una clara relación genotipo-fenotipo, ya que también se ha observado variabilidad entre familias con la misma mutación en *MFN2* e incluso hay claros ejemplos de variabilidad intrafamiliar (Lawson et al., 2005, Muglia et al., 2007, Del Bo et al., 2008, Stuppia et al., 2015). Aunque se ha sugerido la existencia de modificadores genéticos, hasta la fecha no se han descrito modificadores genéticos en pacientes CMT2A2 (Del Bo et al., 2008). Al igual que se ha comentado para los casos de mutaciones en *GDAP1*, la

presencia simultánea de mutaciones en *GDAP1* y *MFN2* en pacientes aislados conduce a cuadros clínicos más graves.

Dada la estrecha relación tanto genética como funcional de *GDAP1* y *MFN2*, resulta tentador pensar que puede haber modificadores genéticos comunes. En este trabajo hemos demostrado, a través de estudios de genómica comparativa, estudios funcionales, así como a partir de la información genética de pacientes CMT2K, que *JPH1* es un claro modificador tanto funcional como genético de *GDAP1*. Además, empleando *D. melanogaster* como organismo modelo hemos aportado un apoyo adicional al papel de *JPH1* como modificador de *GDAP1*. El uso de este organismo modelo nos ha permitido demostrar que *Jp* también puede modificar los fenotipos de otro gen CMT relacionado con *Gdap1*, como es *Mfn*. Teniendo todo esto en cuenta, es posible que *JPH1* también pueda ser un modificador genético de las formas debidas a mutaciones dominantes en *MFN2*. Por tanto, consideramos relevante hacer un estudio genético de *JPH1* en los casos de CMT2K y CMT2A2 en los que exista variabilidad intrafamiliar, y que ésta no se explique con la presencia de mutaciones adicionales en los propios genes *GDAP1* y *MFN2*.

A parte de las formas CMT2A2 y CMT2K, hay otras formas de CMT2 que se caracterizan por la presencia de variabilidad intrafamiliar y que están causadas por mutaciones dominantes en genes que se han relacionado con la homeostasis del calcio, como por ejemplo en *BSCL2* y *TRPV4* (Klein et al., 2011, Bi et al., 2014). El espectro clínico de las mutaciones en el gen *BSCL2*, que codifica para la proteína seipina, es muy amplio (Ito and Suzuki, 2009). Las mutaciones dominantes en *BSCL2*, suponen un claro ejemplo de penetrancia incompleta y expresividad variable, ya que las mismas mutaciones pueden dar lugar a CMT2, a la forma de neuropatía predominante motora HMN5B (MIM 600794), o a paraplegia espástica tipo Silver (SPG17; MIM 270685), incluso en una misma familia, y que además, pueden haber portadores asintomáticos o afectados subclínicamente (Irobi et al., 2004, Auer-Grumbach et al., 2005, Choi et al., 2013). Las mutaciones recesivas en *BSCL2* son responsables de la lipodistrofia congénita generalizada de tipo 2 (CGL2, acrónimo en inglés; MIM 269700). Seipina es una proteína del retículo endoplasmático implicada en el metabolismo lipídico. Las mutaciones dominantes en seipina afectan a su plegamiento normal en el retículo, provocando estrés de retículo (Ito and Suzuki, 2009), aunque también se producen defectos en el metabolismo de los *lipid droplets* (Tian et al., 2011, Falk et al., 2014, Fan et al., 2015). Recientemente se ha visto que seipina interactúa físicamente con SERCA, una bomba de calcio en el retículo endoplasmático responsable del transporte del calcio citosólico al lumen del retículo (Bi et al., 2014). De hecho, seipina es capaz de afectar a la actividad de SERCA, modulando la homeostasis del calcio intracelular (Bi et al., 2014). Además, en *D. melanogaster*, el silenciamiento del receptor de rianodina (RyR), un canal implicado en la salida de calcio del retículo al citosol, rescata parcialmente defectos del almacenamiento lipídico presente en mutantes de *dSeipin*, el homólogo de seipina en esta especie (Bi et al., 2014).

Las neuropatías debidas a mutaciones dominantes en *TRPV4* son muy variables fenotípicamente, y también suponen un claro ejemplo de expresividad variable y penetrancia incompleta. Las mutaciones en el gen *TRPV4* se han identificado en diferentes neuropatías dominantes, siendo responsable de la forma CMT2C (MIM 606071), de la atrofia muscular espinal escapuloperoneal (SPSMA, acrónimo en inglés; MIM 181405), y de la atrofia muscular espinal congénita distal (HMN8 o CDSMA, acrónimo en inglés; OMIM 600175) (Zimon et al., 2010, Echaniz-Laguna et al., 2014, Evangelista et al., 2015). El grado de severidad puede ser muy variable, desde formas leves a graves, incluso dentro de una misma familia, y es muy característica la penetrancia incompleta, siendo habitual

la presencia de portadores asintomáticos (Landoure et al., 2010, Zimon et al., 2010, Aharoni et al., 2011, Berciano et al., 2011, Klein et al., 2011, Koutsis et al., 2015). TRPV4 es un canal catiónico no selectivo, con mayor permeabilidad para el calcio, que se activa en respuesta a estímulos tanto físicos como químicos (Plant and Strotmann, 2007). Las mutaciones dominantes en TRPV4 responsables de las neuropatías causan una ganancia de función que incrementa la actividad del canal, dando lugar a elevados niveles de calcio intracelular, que resultan tóxicos para las neuronas (Landoure et al., 2010, Klein et al., 2011). Recientemente, en la última reunión de la *Peripheral Nerve Society* celebrada en Quebec (Canadá) en junio de 2015, el grupo liderado por el Dr. Thomas Lloyd describió en modelos de *D. melanogaster*, que el silenciamiento de *CaMKII*, una kinasa dependiente de calcio y de calmodulina que es fundamental en la señalización por calcio y en su homeostasis, es capaz de suprimir fenotipos debidos a la sobreexpresión de la forma mutante TRPV4 p.R269C responsable de la neuropatía en pacientes (Woolums et al., 2015).

En las neuropatías debidas a mutaciones en los genes *BSCL2* o en *TRPV4* se ha sugerido la existencia de modificadores genéticos (Irobi et al., 2004, Berciano et al., 2011, Klein et al., 2011). Existe relación funcional entre las proteínas JPH y las proteínas RYR y CAMKII, que como hemos comentado, son capaces de modificar, al menos en *D. melanogaster*, los fenotipos de mutantes en *BSCL2* y *TRPV4*, respectivamente. JPH1 interacciona físicamente con RYR1 y adicionalmente, se ha visto que JPH2 interacciona con RYR2 y participa regulando su estabilidad así como su actividad (Phimister et al., 2007, van Oort et al., 2011, Hill and Diwan, 2013). Parte de los fenotipos observados en los ratones doble *knock-out* de *Jph3* y *Jph4* se debe a CaMKII (Moriguchi et al., 2006, Moriguchi et al., 2015). La falta de *Jph3* y *Jph4* provoca la hiperactivación de CaMKII en neuronas (Moriguchi et al., 2006, Moriguchi et al., 2015).

Hemos demostrado el papel de JPH1 como modificador funcional y genético de GDAP1. Las variantes identificadas en *JPH1* explican en parte la variabilidad intrafamiliar presente en la fCMT-408 y en la fCMT-420. Sin embargo, la variabilidad clínica observada en otras familias (por ejemplo las familias fCMT-213 y fCMT-214), no puede ser explicada por mutaciones o polimorfismos en el gen *JPH1*. Por lo que deben existir otros genes modificadores en CMT2K. GDAP1 interacciona físicamente con RAB6B y caytaxina, implicadas en transporte retrógrado y anterógrado respectivamente, a través de las que GDAP1 podría regular el tráfico mitocondrial (Pla-Martin et al., 2013). Estos interactores podrían ser considerados posibles candidatos a modificadores. Las mutaciones dominantes en GDAP1 tienen una mayor interacción con estas proteínas (Pla-Martin et al., 2013). Podrían existir polimorfismos en los genes *RAB6B* o *caytaxina* que afectasen a sus niveles de expresión o incluso variantes en estas proteínas que influyeran en su interacción con GDAP1 y pudieran modificar los efectos sobre la motilidad, distribución e incluso morfología mitocondrial.

Sin embargo, como se ha comentado a lo largo de este capítulo, aquellos genes capaces de influir en la homeostasis de calcio, son posiblemente candidatos más relevantes. De entre las proteínas identificadas mediante ensayos de doble híbrido de interaccionar con GDAP1 (Pla-Martin, 2012), destaca la proteína adenilato ciclasa 8 (AC8) codificada por el gen *ADCY8*, como posible candidato a modificador. Se trata de una adenilato ciclasa unida a membrana que se expresa específicamente en sistema nervioso y que está regulada por calcio; responde selectivamente al SOCE (Martin et al., 2009), y de hecho, interacciona físicamente con ORAI1 (Willoughby et al., 2012), la proteína formadora del poro de los canales SOC y que junto a STIM1 es la responsable de la entrada de calcio por

el mecanismo del SOCE. La relación entre ORAI1-AC8 permite coordinar las señalizaciones de calcio y AMPc (Willoughby et al., 2012). Por tanto, AC8 es un potencial candidato a ser modificador de GDAP1, y modular de alguna manera los efectos de GDAP1 mutado sobre la homeostasis de calcio.

Además, mutaciones y/o polimorfismos que afectasen a los niveles y/o a la función de RYR o CAMKII, implicados directamente en calcio, y que como hemos visto anteriormente, son capaces de modificar, respectivamente, los fenotipos de mutantes de *BSCL2* y *TRPV4* en *D. melanogaster*, y que además, están relacionados con las proteínas JPH, podrían ser potenciales candidatos de actuar como modificadores genéticos en CMT2K, pero también en estas otras formas de CMT2 debidas a mutaciones dominantes en genes que se han relacionado con la homeostasis del calcio, como *BSCL2*, *MFN2* y *TRPV4*.

3.13 Cribado mutacional de *JPH1* en la serie de CMT sin diagnóstico genético

Dado el papel de *JPH1* como modificador en CMT2K quisimos comprobar si mutaciones en el gen *JPH1* pudieran ser responsables de la neuropatía en pacientes CMT sin diagnóstico genético. Para ello se analizaron los exones codificantes de *JPH1* de 46 probandos en los que previamente se habían descartado mutaciones en los genes CMT conocidos hasta la fecha (Sivera et al., 2013), y que por tanto, permanecen sin diagnóstico genético. El rastreo mutacional de *JPH1* reveló únicamente una variante novel en uno de los pacientes. El resto de variantes identificadas en estos pacientes se descartaron como causales por ser polimorfismos con una MAF > 0,1. La mutación se identificó en heterocigosis en el DNA 854 (fCMT-313) y se trata del cambio sinónimo *JPH1* c.849C>T (p.Gly283=) (Figura 55A). A nivel nucleotídico, según todos los predictores del *splicing* consultados (NNSPLICE9, HSF y NetGene), la mutación generaría un nuevo sitio donador que podría ser reconocido durante el *splicing*, que provocaría la pérdida de parte del exón 2 de *JPH1*. La mutación se localiza en la última posición de un codón que codifica para el aminoácido glicina (GGC>GGT). El aminoácido glicina, está codificado por cualquiera de las combinaciones GGA, GGC, GGG o GGT; pero curiosamente, el triplete GGT generado por la mutación c.849C>T, es la única combinación no presente en el codón correspondiente en el gen *JPH1* del genoma de las diferentes especies de vertebrados analizados (Figura 55B). Para ahondar en los posibles efectos de la mutación c.849C>T sobre el *splicing*, se llevó a cabo un estudio de minigenes. Tanto en la forma WT como en la forma mutante, aparece el producto normal esperado del correcto procesamiento de los intrones y la presencia del exón 2 completo (Figura 55C). Sin embargo, únicamente en la forma mutante aparece una banda adicional de menor tamaño que se corresponde con el producto de un *splicing* aberrante debido a la mutación (Figura 55C). La secuenciación de las correspondientes bandas confirmaron las predicciones de los programas informáticos, demostrando la afectación del *splicing*. La mutación genera un nuevo sitio GT donador, provocando un *splicing* anormal que conlleva la pérdida en pauta de 292 nt del exón 2, lo que daría lugar a una proteína JPH1 sin dos de sus dominos MORN (Figura 58D).

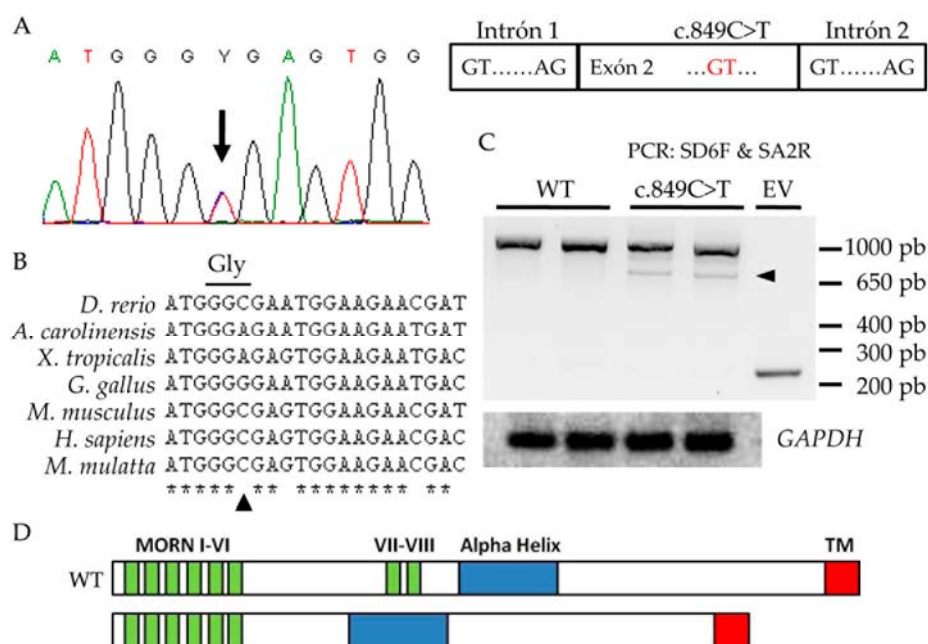


Figura 55. La mutación *JPH1* c.849C>T genera un nuevo sitio donador del splicing. (A) Electroferograma de la mutación en heterocigosis *JPH1* c.849C>T (señalada con una flecha) identificada en el DNA 854 (fCMT-313). (B) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de organismos vertebrados representativos de la región donde se localiza la mutación (indicada por la cabeza de flecha). La mutación corresponde a la última posición del triplete que codifica para el aminoácido glicina (Gly). (C) Estudio de minigenes. Células HeLa fueron transfectadas con el plásmido pSPL3 con la forma WT o mutante (c.849C>T) del exón 2 de la *JPH1* y parte de las regiones intrónicas flanqueantes. A las 24 h se obtuvo el cDNA que se empleó como molde para amplificar por PCR con los oligos SD6F y SA2R los productos del *splicing*. Como control se usó el plásmido pSPL3 vacío (EV). Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa. Como control de la amplificación se detectó la expresión de *GAPDH*. Los tamaños observados corresponden con los tamaños esperados al amplificar el producto del *splicing* normal (1023 pb) en los carriles pSPL3-*JPH1*-Ex2 WT y c.847C>T, y al del *splicing* aberrante (731 pb) únicamente identificado en la forma mutante c.847C>T (banda señalada con la punta de flecha). El producto observado con el vector vacío corresponde con el tamaño esperado de 263 pb. El experimento se repitió dos veces independientes. Las bandas fueron purificadas y secuenciadas para confirmar los productos del *splicing* obtenidos. (D) Predicción a nivel de proteína de las consecuencias del *splicing* aberrante debido a la mutación *JPH1* c.849C>T. Se produciría una pérdida en pauta de parte del exón 2 de la *JPH1*, lo que generaría una proteína *JPH1* sin dos de los dominios MORN.

Los dominios MORN de las proteínas JPH permiten su asociación con la membrana plasmática. Además, las proteínas JPH interactúan con otras proteínas a través de la región de unión (Golini et al., 2011), la zona que une los dominios MORN I-VI con los dominios MORN VII-VIII. Además, las mutaciones en *JPH2* que causan cardiopatía hipertrófica, se localizan tanto en la región de unión como en los dominios MORN más cercanos a ésta (Garbino et al., 2009, Landstrom et al., 2014). Así, la pérdida de dominios MORN como consecuencia del *splicing* aberrante en *JPH1* debido a la mutación *JPH1* c.849C>T (Figura 58C, D), podría afectar a su capacidad de asociación con la membrana plasmática así como alterar la unión con otras proteínas. Se podría plantear un escenario hipotético en el que esta forma mutante de *JPH1* podría actuar como dominante negativo al perder por ejemplo, la interacción con proteínas reguladoras.

Sin embargo, no se han podido obtener muestras de gDNA de otros miembros de la familia fCMT-313, por lo que no se ha podido llevar a cabo un estudio de segregación que permitiera conocer si dicha mutación co-segrega con la enfermedad. Por lo tanto, actualmente desconocemos la relevancia de dicha mutación, ya sea como mutación causal

o incluso como posible modificador del fenotipo. Recientemente se ha puesto de manifiesto cómo la carga genética puede influir en el desarrollo de neuropatías (Gonzaga-Jauregui et al., 2015), y esto podría ser reflejo de un escenario más complejo en el que por ejemplo, en este paciente la presencia de esta mutación en *JPH1* en combinación con otra variante en otro gen, puedan ser las responsables de la neuropatía. Si bien, todo parece indicar que mutaciones en el gen *JPH1* no sean causa directa de CMT.

3.14 Los genes *JPH* como modificadores de otras enfermedades neurológicas

Mutaciones dominantes en el gen *JPH3*, consistentes en la expansión anormal de repeticiones de tripletes CAG/CTG en su exón alternativo 2A, son responsables de la enfermedad de Huntington-like 2 (HDL2, MIM 606438) (Holmes et al., 2001), una fenocopia clínicamente indistinguible de la enfermedad de Huntington (HD, MIM 143100). HD está causada por la expansión de repeticiones del trinucleótido CAG en el gen *Htt* que codifica para la proteína huntingtina. Se trata de una enfermedad autosómica dominante que cursa con un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por corea, distonía, problemas de coordinación, deterioro cognitivo, demencia y trastornos conductivos. Los principales determinantes para que se desarrolle HD y de cuándo se exprese son, respectivamente, la presencia y la longitud de la expansión en *Htt*, aunque la precisa manifestación de la enfermedad así como sus tiempos exactos, son claramente modificables por otros factores, incluyendo factores genéticos, y es por ello, que se han dedicado muchos esfuerzos en identificar modificadores genéticos (Gusella and MacDonald, 2009). Se ha demostrado que proteínas que interactúan físicamente con huntingtina pueden ser modificadores genéticos en modelos animales de HD (Kaltenbach et al., 2007). En uno de los *screenings* realizados, de entre las proteínas identificadas que interactúan con huntingtina, se identificó la proteína JPH2 (Kaltenbach et al., 2007). Teniendo en cuenta la elevada similitud de secuencia que comparten las cuatro proteínas JPH en mamíferos, es posible que huntingtina pueda interactuar también con las otras JPH. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conocido el posible papel de las proteínas JPH como modificadores genéticos en HD. Teniendo en cuenta que mutaciones en *JPH3* son responsables de HDL2, y que en parte, esto se debe a la reducción de sus niveles, y que al menos JPH2 interactúa físicamente con huntingtina, todo ello nos hizo plantearnos si las proteínas JPH podrían actuar como modificadores genéticos de HD.

Para comprobar esta hipótesis utilizamos el modelo de HD de *D. melanogaster*, en el que la sobreexpresión del fragmento de la proteína huntingtina humana que contiene la expansión patológica de poliglutaminas (Htt-ex1-pQ93), conduce a una neurodegeneración progresiva (Pouladi et al., 2013), y lo combinamos con la sobreexpresión o el silenciamiento de *Jp*. En *D. melanogaster* la sobreexpresión de Htt-ex1-pQ93 en el ojo mediante el *driver* GMR-Gal4, inicialmente no produce ningún efecto en la apariencia externa, como se aprecia en moscas de un día post-eclosión (Figura 56A), en concordancia con lo que se había establecido con anterioridad (Steffan et al., 2001). Sin embargo, la neurodegeneración se va manifestando externamente en forma de una despigmentación gradual en el ojo, que se va incrementando a medida que avanza el tiempo. A las cuatro semanas se puede ver una despigmentación evidente debido a la neurodegeneración inducida por Htt-ex1-pQ93 (Figura 56D). Sorprendentemente, cuando se combina la sobreexpresión de huntingtina mutada con el silenciamiento de *Jp*, se observa una despigmentación muy evidente ya desde el día 1 post-eclosión (Figura 56C). Y esta potenciación del fenotipo se va haciendo más evidente con el tiempo, con la presencia de una fuerte despigmentación del ojo a las cuatro semanas (Figura 56F), y que es mucho más pronunciada que la producida sólo por Htt-ex1-pQ93 a la misma edad (Figura 56D). Además, la combinación con la sobreexpresión de *Jp* (Figura 56B, E), retrasa en el tiempo la despigmentación debida a Htt-ex1-pQ93, siendo mucho menos marcada que la inducida únicamente por Htt-ex1-pQ93. Al igual que en el control (Figura 56G), ni la sobreexpresión (Figura 56H) ni el silenciamiento (Figura 56I) de *Jp* producen por sí mismos despigmentación. Así, demostramos que *Jp* es modificador genético en HD; mientras que su sobreexpresión actúa como supresor, su silenciamiento actúa como

potenciador del fenotipo de neurodegeneración causado por huntingtina mutada, al menos en *D. melanogaster*.

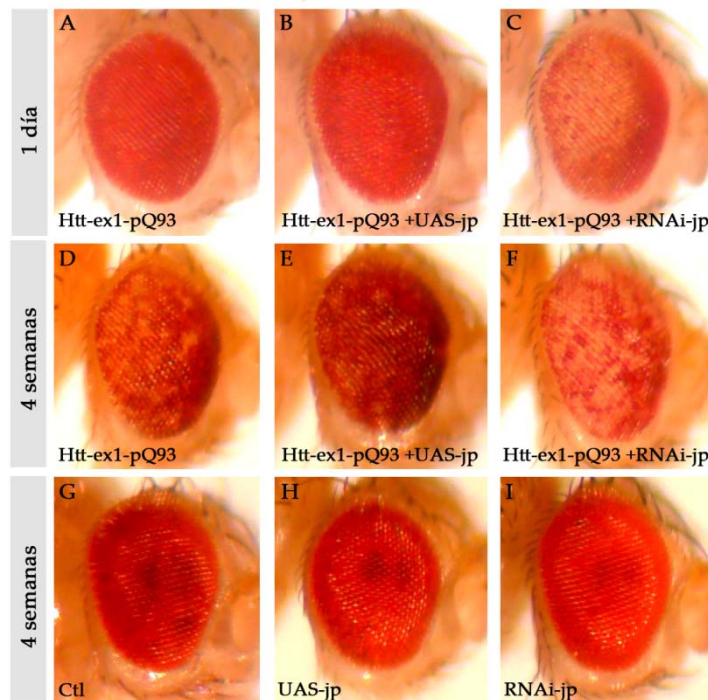


Figura 56. Los niveles de Jp modifican la neurodegeneración inducida por Htt-ex1-pQ93 en el modelo de Huntington en *D. melanogaster*. Se ha empleado la sobreexpresión del fragmento de la proteína humana huntingtina (Htt) correspondiente al exón 1 con la repetición patológica con 93 glutaminas (Q93), y se ha combinado con la sobreexpresión (UAS-Jp) o silenciamiento (RNAi-Jp) de Jp específicamente en el ojo mediante el *driver* GMR-Gal4, para estudiar el efecto sobre la neurodegeneración debida a Htt-ex1-pQ93, evaluando el grado de despigmentación. Se muestran imágenes representativas del ojo de machos de un día (A-C) o de 4 semanas (D-I) de los genotipos indicados. Como controles se han empleado moscas con únicamente el *driver* GMR-Gal4 (G), pero también con solo la sobreexpresión (H) o el silenciamiento (I) de Jp.

En mamíferos, las proteínas JPH más representadas en cerebro son JPH3 y JPH4 (Nishi et al., 2003), por lo que posiblemente éstas son las que pudieran influir como modificador en HD. Además, nuestros resultados pueden tener también otras implicaciones, como que las proteínas JPH puedan jugar algún papel en la patogénesis de HD. Las mutaciones en *JPH3* responsables de HDL2, provocan la disminución en los niveles proteicos de JPH3, lo que constituye uno de los principales mecanismos en la patogénesis de HDL2 (Seixas et al., 2012, Rudnicki et al., 2014). Y este hecho se ve fortalecido por la presencia de fenotipo motor en ratones *knock-out* de *Jph3* en heterocigotos (Seixas et al., 2012, Rudnicki et al., 2014). En la patogénesis de HD, existen evidencias de interacciones proteína-proteína aberrantes; la proteína huntingtina mutada forma agregados que pueden secuestrar e interferir con la función de las proteínas que une (Boutell et al., 1999, Nucifora et al., 2001, Suhr et al., 2001, Kim and Kim, 2014). De hecho, el tratamiento con moléculas que impiden la formación de estos agregados de huntingtina mutada en modelos de HD en *D. melanogaster*, inhiben la neurodegeneración debida a huntingtina (Kazantsev et al., 2002). Se ha visto que huntingtina es capaz de interactuar con JPH2 (Kaltenbach et al., 2007), por lo que posiblemente lo haga con otras JPH debido a su similitud. Por tanto, es posible que en el CNS los agregados de huntingtina mutada secuestran, entre otras proteínas, a JPH3 y que su pérdida de función contribuya en parte en el fenotipo de HD. La reducción de los niveles proteicos de JPH3 contribuye al fenotipo de HDL2 (Seixas et al., 2012, Rudnicki et al., 2014), que es clínicamente indistinguible de HD.

3.15 Los genes *JPH* como modificadores de rutas de señalización en *D. melanogaster*

Anteriormente habíamos visto que en *D. melanogaster* la sobreexpresión de *Jp*, empleando el *driver* GMR-Gal4 que se expresa en células post-mitóticas en el desarrollo tardío del ojo, producía un incremento en el número de fotorreceptores por omatidio (Figura 52), que podría ser indicativo de defectos de señalización (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997). Quisimos analizar el efecto de alterar los niveles de *Jp* de forma ubicua y desde el desarrollo temprano, empleando el *driver* Act5c-Gal4, de modo que los fenotipos obtenidos nos pudieran permitir ahondar en el conocimiento de su función así como en las rutas en las que pueda participar *Jp* en *D. melanogaster*. El silenciamiento de *Jp* en todos los tejidos desde el desarrollo temprano, resulta en letalidad (Figura 57A), lo que demuestra lo esencial que es este gen para un correcto desarrollo. Sorprendentemente, la sobreexpresión de *Jp* en toda la mosca, a pesar de no alcanzar excesivos niveles de sobreexpresión (Figura 57B), da lugar a una multitud de fenotipos en diferentes tejidos (Figura 57F-J), incluyendo el fenotipo de ojo rugoso similar al observado con GMR-Gal4. En comparación con el control (Figura 57C-E), al sobreexpresar *Jp* se observa un mayor número de quetas de la parte inferior del ojo (vibrisas) (Figura 57F), pero también de microquetas en el *notum* (Figura 57G) e incluso se observan duplicaciones de macroquetas en el *scutellum* (Figura 55I), y duplicaciones en las quetas en la esternopleura (Figura 57H). Además, en el ala se observan engrosamientos de las venas (Figura 57J).

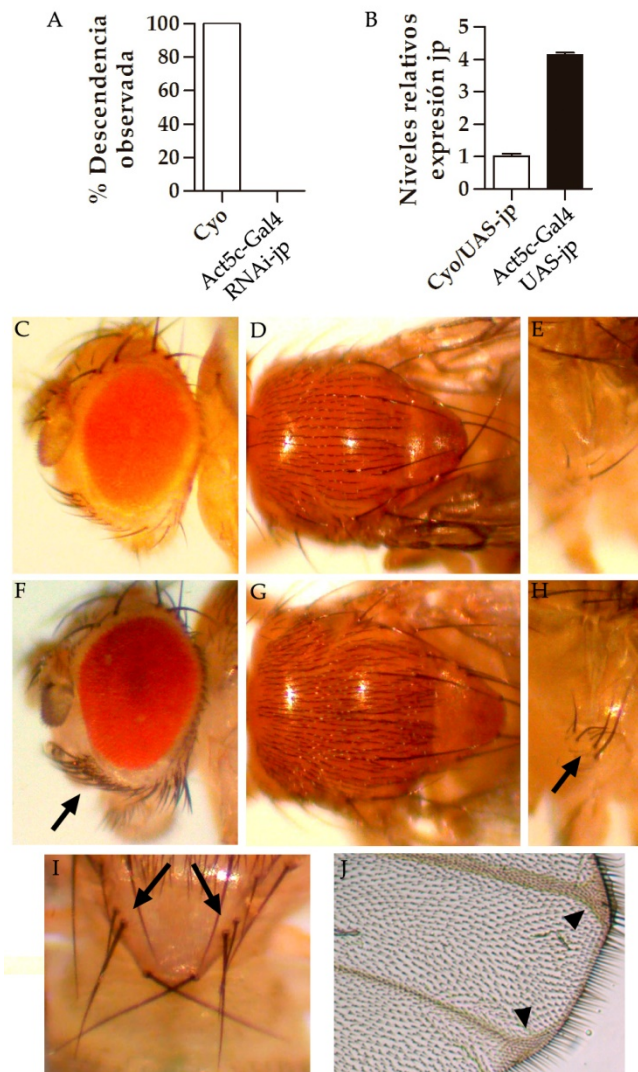


Figura 57. Efectos de la alteración de los niveles de *Jp* en *D. melanogaster*. (A) Estudio de viabilidad del silenciamiento de *Jp* en toda la mosca mediante el *driver* Act5c-Gal4; para ello se cruzaron moscas Act5c-Gal4/Cyo;UAS-Dcr2 con moscas RNAi-*Jp*/Cyo. Si no se afectara a la viabilidad, se esperaría un 66,7% de moscas Cyo en la descendencia, mientras que un 33,3% de moscas serían no Cyo (que expresasen RNAi-*Jp*). Se analizaron un total de 301 moscas nacidas a partir de dos cruces experimentales independientes. (B) Cuantificación de los niveles de expresión de *Jp*. Se realizaron qRT-PCRs a partir de moscas que sobreexpresan *Jp* en toda la mosca (Act5c-Gal4/UAS-*Jp*). Los niveles de expresión se normalizaron frente a *Gapdh* y se relativizaron frente a los niveles de *Jp* obtenidos en la mosca control (Cyo/UAS-*Jp*), que no sobreexpresa *Jp*. (F-J) Fenotipos debidos a la sobreexpresión de *Jp* en todos los tejidos mediante el *driver* Act5c-Gal4. Como control se han empleado moscas con Act5c-Gal4 en heterocigosis (C-E). En las imágenes se muestran defectos en el número de quetas (flechas) de la parte inferior del ojo (vibrisas) (F), del *notum* (G), del esternopleura (H), del *scutellum* (I), y también se muestra magnificación del fenotipo tipo delta (cabezas de flecha) en las venas de las alas (J).

Los fenotipos observados debidos a la sobreexpresión de *Jp*, como las duplicaciones de quetas así como los defectos en las venas son típicos de alteraciones en la ruta de Notch. Las duplicaciones de quetas suelen deberse a defectos en la inhibición lateral, un proceso crítico para la determinación del destino celular que está gobernado por la ruta de Notch (Fiuza and Arias, 2007, Fortini, 2009). Para ahondar en estos resultados y para evitar la letalidad debido al silenciamiento de *Jp* en toda la mosca (Figura 57A), empleamos el *driver* Rn-Gal4, que se expresa en ala, entre otros tejidos, a principios del tercer estadio larvario (St Pierre et al., 2002), analizando posibles defectos en ala. Como se puede apreciar en comparación con el control (Figura 58A), la sobreexpresión de *Jp* provoca el engrosamiento de las venas, especialmente de las venas longitudinales L3 y L5, pero también se observa el ensanchamiento de la parte distal de todas las venas longitudinales (Figura 58B), así como un menor área total del ala. Además, se produce un acortamiento de la distancia entre las venas L4-L5 (Figura 58B). También se identifican defectos en la especificación celular con la presencia de quetas ectópicas del tipo de margen del ala en las venas debido a la sobreexpresión de *Jp* (Figuras 58B, B' y B''). Sin embargo, no se observan fenotipos anormales evidentes en el ala al silenciar la expresión de *Jp* (Figura 58C).

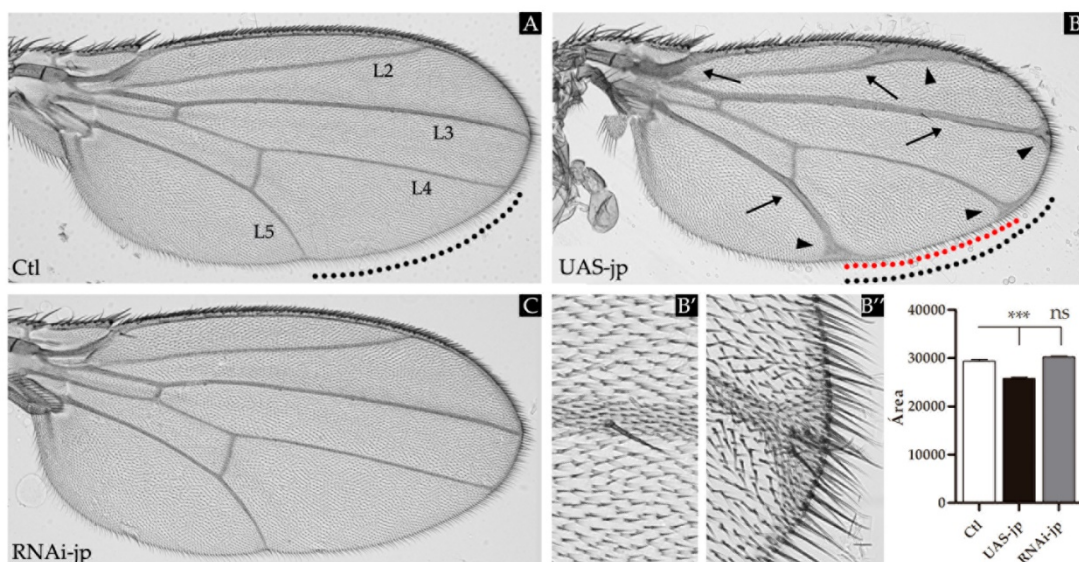


Figura 58. Fenotipos en ala debidos a la sobreexpresión de *Jp*. Imágenes de alas de *D. melanogaster* con sobreexpresión (B) o silenciamiento (C) de *Jp* en el ala completa mediante el *driver* Rn-Gal4. Como control (Ctl) se han empleados moscas con el *driver* Rn-Gal4 en heterocigosis (A). Las flechas señalan las venas engrosadas, mientras que las cabezas de flechas señalan los ensanchamientos de la parte final de las venas del ala. Las líneas de puntos representan la distancia entre las venas longitudinales L4 y L5, en el control (línea de puntos negra) y con sobreexpresión de *Jp* (línea de puntos roja). (B', B'') Magnificaciones del ala sobreexpresando *Jp*, donde se muestran defectos en la especificación celular con la presencia de quetas ectópicas del tipo de

margen del ala en las venas del ala. En la parte inferior derecha se muestra la cuantificación del área del ala mediante Image J, procedente del análisis de un mínimo de 10 individuos por genotipo. Análisis estadístico mediante ANOVA y aplicando el test de Dunnett.

Estos resultados de los fenotipos de *Jp* en ala, se ven apoyados por observaciones realizadas en dos trabajos independientes a partir de *screenings* de ganancia de función de genes, empleando diferentes colecciones de moscas transgénicas con inserciones que permiten sobreexpresar de forma sistemática genes en *D. melanogaster* (Molnar et al., 2006, Cruz et al., 2009). En ambos trabajos, donde pretendían identificar en *D. melanogaster* genes implicados en el desarrollo del ala así como en la formación de las venas del ala, de entre los listados de líneas transgénicas en las que observaron fenotipos anormales en ala, hay dos líneas diferentes capaces de sobreexpresar *Jp* (Molnar et al., 2006, Cruz et al., 2009). Sin embargo, en estas dos líneas transgénicas la sobreexpresión de *Jp* no es exclusiva. En ambas líneas, un elemento P-GS está insertado en la región *upstream* del gen *Jp*. Dicho elemento contiene dos secuencias UAS, una en cada extremo del elemento y dispuestas en orientaciones opuestas, que permitirían la sobreexpresión de los genes localizados en ambas orientaciones desde la inserción; por lo que además del gen *Jp* se podría sobreexpresar el gen *CG3838* vecino de *Jp* en el genoma de *D. melanogaster*. Nosotros hemos empleado una línea transgénica que permite sobreexpresar específica y exclusivamente *Jp* (detallado en la sección correspondiente de Material y métodos). Así, nuestros resultados, apoyados por las observaciones independientes contenidas en estos dos trabajos, demuestran que un exceso de función de *Jp* en ala provoca defectos en el desarrollo normal de este tejido, fundamentalmente en las venas. En la formación de las venas participan las rutas de señalización de Notch, EGFR y Dpp (De Celis, 2003, Molnar et al., 2006), por lo que es posible que *Jp* pueda influir directa o indirectamente en alguna de éstas. Además, anteriormente habíamos visto que la sobreexpresión de *Jp* en toda la mosca y desde el desarrollo temprano, producía duplicaciones de quetas, que suelen deberse a defectos en la inhibición lateral, siendo la ruta de Notch el actor principal (Fiuza and Arias, 2007, Fortini, 2009). Por tanto, todo apunta a que algunos de los fenotipos producidos por *Jp* pudieran estar relacionados con alteraciones en la ruta de Notch, aunque no podemos descartar la influencia de otras rutas de señalización.

3.16 *Jp* puede actuar como modificador de la ruta de Notch

El ojo de *D. melanogaster* ha sido ampliamente empleado para estudiar diferentes componentes de la ruta de Notch (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1996, 1997), e incluso se ha utilizado para identificar modificadores de esta ruta de señalización (Shalaby et al., 2009). Además, en este tejido hemos visto que tanto la sobreexpresión (a nivel externo e interno) como la interferencia (a nivel interno) de *Jp* dan lugar a fenotipos. Para estudiar la posible relación de *Jp* con elementos de la ruta de Notch, usamos la sobreexpresión en ojo de *Serrate* (*Ser*) y *Delta*, ambos ligandos de Notch, que dan lugar a fenotipos evidentes alterando el tamaño de ojo y produciendo fenotipos de ojo rugoso en *D. melanogaster* (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997, Gibson and Schubiger, 2000) (Figura 59), y lo combinamos con la sobreexpresión o el silenciamiento de *Jp*. Como se puede ver en comparación con el control (Figura 59A, J), tanto la sobreexpresión de *Ser* (Figura 59D, J) como de *Delta* (Figura 59G, J) producen una fuerte reducción del área del ojo, mientras que ni la sobreexpresión ni la interferencia de *Jp* afectan al tamaño del ojo por sí mismas (Figura 59B, C, J). Sorprendentemente, la sobreexpresión de *Jp* es capaz de modificar los fenotipos debidos tanto a *Ser* como *Delta* (Figuras 59E y H en comparación con 59D y G, respectivamente). La sobreexpresión de *Jp* actuaría por un lado como supresor parcial del

fenotipo producido por *Ser* incrementando el área del ojo (Figura 59E, J); mientras que por otro lado es capaz de potenciar el fenotipo debido a *Delta*, disminuyendo el área del ojo (Figura 57H, J). En cambio, el silenciamiento de *Jp* no produce alteraciones evidentes de los fenotipos externos debidos a la sobreexpresión de los ligandos de Notch (Figura 59F, I, J). Por tanto, demostramos que *Jp*, al menos su sobreexpresión, es capaz de interactuar genéticamente con los elementos de la ruta de Noch.

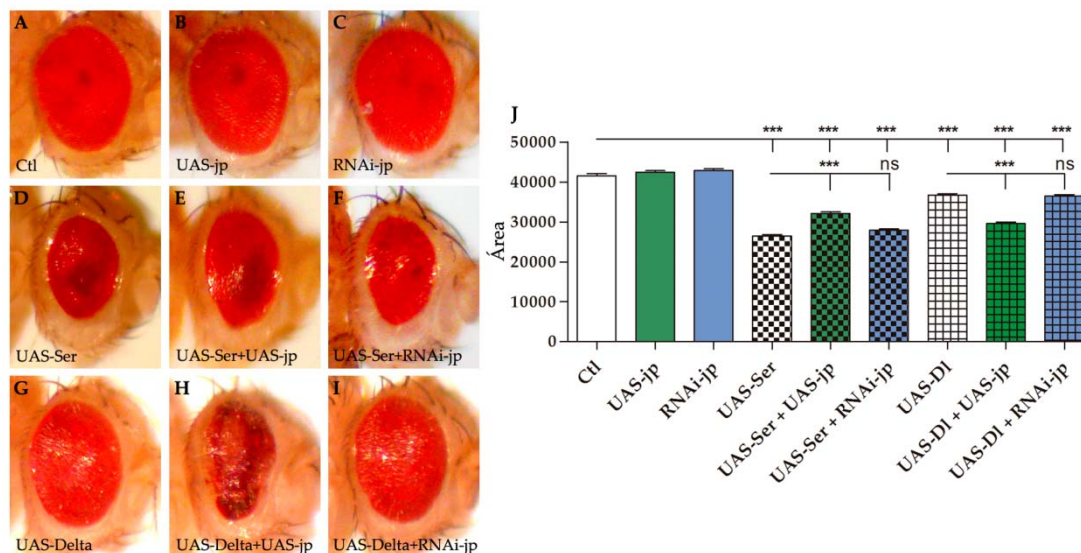


Figura 59. Efecto de *Jp* sobre el fenotipo externo del ojo debido a la sobreexpresión de los ligandos de Noth, Serrate y Delta. Se muestran imágenes representativas del ojo de machos de menos de una semana de los genotipos indicados. Los elementos UAS y/o RNAi se han sobreexpresado específicamente en el ojo mediante el *driver* GMR-Gal4. Como control se han empleado moscas con únicamente el *driver* GMR-Gal4 en herozigosis (A). A la derecha se muestra la cuantificación del área del ojo de los genotipos indicados (J). El área se cuantificó mediante Image J y se analizaron un mínimo de 20 individuos por genotipo. Análisis estadístico mediante ANOVA y aplicando el test de Tukey de comparación múltiple.

Al igual que ocurría con los fenotipos en ala, también existen observaciones independientes a nuestros resultados que apoyan el papel de *Jp* como modificador de la ruta de Notch. En el trabajo de Shalaby y colaboradores, donde realizaron un *screening* para identificar genes modificadores de la ruta de Notch (Shalaby et al., 2009), de entre el listado de líneas modificadoras, está una línea transgénica con la inserción *P[XP]d04563* capaz de sobreexpresar *Jp*. Sin embargo, esta inserción no permite la sobreexpresión exclusiva de *Jp* debido a la presencia de otra secuencia UAS adicional en el elemento de inserción. La sobreexpresión empleando dicho elemento, aparece en este trabajo como un potenciador del fenotipo de ojo debido a la sobreexpresión de Delta (Shalaby et al., 2009), uno de los ligandos de Notch que nosotros también hemos empleado. Para sobreexpresar *Jp*, nosotros hemos empleado la línea transgénica que contiene la inserción *P[XP]d04563*, la misma que la empleada por Shalaby y colaboradores (Shalaby et al., 2009); sin embargo, nosotros previamente habíamos eliminado la secuencia UAS localizada en orientación opuesta a *Jp* mediante modificación genómica; de este modo, únicamente mantiene un UAS para sobreexpresar específica y exclusivamente *Jp* (detallado en la sección correspondiente de Material y métodos). Así, nuestros resultados son una evidencia de que los fenotipos se deben únicamente a la sobreexpresión de *Jp*, y por lo tanto, sus observaciones apoyan nuestras evidencias de que *Jp* es capaz de actuar como modificador genético de Notch, al menos en *D. melanogaster*.

La señalización canónica de Notch comienza cuando el receptor Notch recibe un estímulo de un ligando tipo DSL (Delta y Serrate en *D. melanogaster*) de una célula adyacente, lo que induce un *cleavage* dependiente de una γ -secretasa en Notch,

permitiendo la translocación del dominio intracelular de Notch (NICD, acrónimo en inglés) al núcleo, donde actúa como co-activador transcripcional (de Celis, 2013). A pesar de la aparente simplicidad de este mecanismo, una serie de procesos post-traduccionales regulan la actividad de Notch durante su síntesis y secreción, su activación dependiente de ligando en la superficie, su tráfico endocítico, y su degradación (Fortini, 2009). Además, se puede producir una inhibición en *cis* cuando se expresan en la misma célula ligandos tipo DSL y el receptor (del Alamo et al., 2011), e incluso, Notch también puede ser activado de forma no canónica, en un proceso independiente de los ligandos tipo DSL (Hori et al., 2012).

La sobreexpresión de *Jp* modifica de forma contraria los fenotipos debidos a la sobreexpresión de Delta y Ser en el ojo. Estos resultados son un ejemplo de la complejidad de la propia ruta de Notch. Además, hay que considerar que la propia sobreexpresión de un ligando de Notch, como es Delta, en el ojo da lugar tanto a fenotipos de ganancia como de pérdida de función de Notch (Shalaby et al., 2009), debido probablemente a la expresión diferencial de GMR-Gal4 en diferentes tipos celulares del ojo o a que distintos tipos celulares responden de forma diferente a la sobreexpresión ectópica de Delta (Shalaby et al., 2009). También hay que tener en cuenta que niveles altos de los ligandos de Notch pueden provocar inhibición en *cis* (Becam et al., 2010, del Alamo et al., 2011). Con todo, hemos demostrado que *Jp*, al menos su sobreexpresión, es capaz de interactuar genéticamente con elementos de la ruta de Notch, y considerando los resultados anteriores, posiblemente los fenotipos que hemos observado debidos a la sobreexpresión de *Jp*, incluyendo el incremento del número de fotorreceptores por omatidio, las duplicaciones de las quetas, así como los defectos en las venas del ala, puedan deberse a alteraciones en la ruta de Notch. De hecho, fenotipos de este tipo se han observado debidos a genes implicados directamente en la ruta de Notch (Sun and Artavanis-Tsakonas, 1997, Mummery-Widmer et al., 2009, Shalaby et al., 2009).

Hasta la fecha no se habían relacionado los genes *JPH* y la ruta de Notch, ni en invertebrados ni en vertebrados. En *D. melanogaster* se han identificado diferentes genes implicados en la regulación de los niveles intracelulares de calcio capaces de modificar fenotipos de Notch (Eid et al., 2008, Shalaby et al., 2009, van de Hoef et al., 2009), entre los que destacan *RyR* y *dStim*, por la estrecha relación entre sus respectivos homólogos en vertebrados con las proteínas *JPH*. En *D. melanogaster*, *dStim* (CG9126), el homólogo de los genes de mamíferos *STIM1* y *STIM2*, es capaz de interactuar genéticamente con la ruta de Notch, actuando en la especificación del destino celular y del patrón tisular (Eid et al., 2008). De hecho, la alteración de los niveles de *dStim* provoca en *D. melanogaster*, al igual que *Jp*, alteraciones en el desarrollo normal del ojo, en quetas del *notum* y en venas del ala (Eid et al., 2008).

Es posible, por tanto, que proteínas implicadas en la regulación de los niveles intracelulares de calcio modulen la ruta de Notch, aunque desconocemos el mecanismo molecular por el que ocurriría. En neuronas de ratones doble *knock-out* de los genes *Jph3* y *Jph4*, como consecuencia de la alteración de los niveles de calcio, se produce una desregulación de las actividades de CaMKII y de calcineurina (Moriguchi et al., 2006, Moriguchi et al., 2015). *STIM1* es necesario para una correcta activación de la ruta de NFAT en diferentes tipos celulares en mamíferos (Oh-Hora et al., 2008, Hou et al., 2013, Zhou et al., 2014). Aunque NFAT es específico de vertebrados, existen genes que codifican a *calcineurina* en invertebrados. De hecho, en un *screening* para identificar reguladores de la ruta de NFAT en células de *D. melanogaster*, expresando la proteína NFAT de mamífero fusionada a GFP, se identificaron varias proteínas implicadas directamente en la

homeostasis del calcio, incluyendo a *dStim*, como reguladores de la translocación nuclear de NFAT y de su desfosforilación (Gwack et al., 2006). En células de mamíferos se ha visto que tanto CaMKII como calcineurina/NFAT pueden regular la ruta de Notch (Mamaeva et al., 2009, Kasahara et al., 2013). Cada vez hay más evidencias de la inter-relación entre las rutas calcineurin/NFAT y Notch (Mammucari et al., 2005, Zanotti et al., 2011, Kasahara et al., 2013). El mecanismo molecular exacto por el que en *D. melanogaster*, la sobreexpresión de Jp da lugar a fenotipos relacionados con alteraciones en la ruta de Notch, permanece sin conocer, aunque como hemos comentado, probablemente tenga que ver con la señalización del calcio. Además, no hay que descartar la implicación de Jp en otras rutas de señalización. En *D. melanogaster*, *dStim* interacciona genéticamente tanto con la ruta de Notch como la de Wg (Eid et al., 2008). Dada la relación funcional de JPH con STIM1 en mamíferos (Pla-Martin et al., 2015, Takeshima et al., 2015), así como la similitud de los fenotipos de sus respectivos homólogos en *D. melanogaster* (Eid et al., 2008), es posible que Jp también pueda modificar la ruta de Wg, al menos en invertebrados.

La ruta de Notch regula diferentes procesos del desarrollo, pero también se ha visto que participa en el mantenimiento de tejidos adultos e incluso participa en mecanismos de enfermedad (Sato et al., 2012). Los resultados obtenidos en esta última parte del trabajo, abren nuevos interrogantes acerca de la función de los genes *JPH* en mamíferos: ¿existe relación entre los genes *JPH* de mamíferos con la ruta de Notch? Y si es así, ¿la ruta de Notch participa de alguna manera en los defectos en el desarrollo observados en los ratones *knock-out* de los diferentes genes *JPH*? ¿Tiene algo que ver la ruta de Notch en las enfermedades causadas por las mutaciones en los genes *JPH2* y/o *JPH3*, o incluso en el papel modificador de *JPH1* en CMT2K? Aunque puede resultar tentador especular sobre estos aspectos, se requieren estudios específicos al respecto para poder clarificar estas cuestiones.

4. Conclusiones del Capítulo II

1. Hemos identificado y demostrado que JPH1 es un modificador genético y funcional de GDAP1. Ambos genes constituyen un *cluster* conservados de genes funcionalmente relacionados en vertebrados. La sobreexpresión de JPH1 rescata los defectos en el SOCE en las células deficientes en GDAP1. La mutación JPH1 p.R213P, identificada en un paciente CMT2K con un cuadro clínico más grave que el resto de sus familiares enfermos, en combinación con la mutación GDAP1 p.R120W provocan en células de neuroblastoma un incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio y defectos en la respuesta del SOCE. JPH1 p.R213P actuaría como un modificador negativo de la forma mutante dominante de GDAP1.
2. La alteración de los niveles de *JPH1* en pacientes CMT2K también puede influir en las consecuencias fenotípicas de las mutaciones en *GDAP1*. Empleando modelos de *D. melanogaster* hemos demostrado que la combinación de alteraciones tanto en *Jp* como en *Gdap1* incrementa el daño neural, aportando más apoyo al papel de JPH1 como modificador de GDAP1.
3. Los hallazgos empleando el organismo modelo *D. melanogaster* nos han permitido, a su vez, proponer a JPH1 como modificador de *MFN2*. Por ello, sugerimos la secuenciación de *JPH1* en los casos de variabilidad intrafamiliar en formas de CMT debidas a mutaciones dominantes en *GDAP1* o *MFN2*. Es posible que *JPH1* pueda actuar como modificador genético de otras formas de CMT debidas a mutaciones dominantes en genes relacionados con la homeostasis de calcio.
4. Los genes *JPH* pueden tener un papel como modificadores de otras enfermedades neurológicas. Hemos demostrado que *Jp* modifica la neurodegeneración debida a Htt-ex1-pQ93 en un modelo de la enfermedad de Huntington en *D. melanogaster*. Teniendo en cuenta estos resultados, y que JPH2 es capaz de interactuar físicamente con Htt y que mutaciones en *JPH3* causan una forma clínicamente indistinguible de la enfermedad de Huntington, es posible que la familia proteica de las JPH puedan participar en la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa.
5. Hemos identificado la implicación de proteínas JPH en la ruta de señalización de Notch usando modelos de *D. melanogaster*. La sobreexpresión de *Jp* conduce a fenotipos típicos asociados con alteraciones de la ruta de Notch, y *Jp* es capaz de modificar fenotipos debidos a elementos de la propia ruta de Notch. Estos hallazgos amplían el abanico de funciones en las que los genes *JPH* pueden estar implicados.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes

1.1 fCMT-129

La familia fCMT-129 fue remitida por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid, donde el probando fue diagnosticado de una neuropatía recurrente hereditaria, con un patrón probable de herencia autosómica dominante (Figura M1). El debut clínico del probando fue a los 14 años de edad, cuando acudió a consulta por dolor y disminución de fuerza en los miembros superiores tras realizar un ejercicio físico intenso. Desarrolló dolor progresivo en hombros, y prosiguió con una disminución de fuerza en miembros superiores, llegando a la incapacidad de sujetar objetos, disestesias y parestesias en las manos, junto a alteraciones sensitivas. La clínica se desarrolló en el curso de una semana. El paciente mejoró progresivamente, si bien, ha sufrido episodios agudos coincidiendo con esfuerzo físico repetido y mantenido, de los que se recupera prácticamente en su totalidad. Estudios electrofisiológicos indicaron una lesión axonal del plexo braquial inferior con importante pérdida de axones y con un bloqueo en la conducción a dicho nivel revelando una neuropatía axonal sensitivo-motora, con mayor afectación en miembros superiores. Exploraciones posteriores evidenciaron cambios en la conducción nerviosa sensitiva y motora sugestivos de desmielinización residual, lo que ha conducido a una neuropatía mixta desmielinizante-axonal.

Los datos de la historia familiar, con varios familiares en la rama materna con parestesias y debilidad recurrente en miembros (Figura M1), sugerían sobre todo una neuropatía hereditaria con sensibilidad a la parálisis por presión (HNPP); pero el caso índice con afectación hiperalgésica orientaba más hacia una posible plexopatía braquial aguda posiblemente familiar (HNA). Finalmente al descartar la posible implicación de los tres genes, *PMP22*, *SEPT9* y *SCN9A*, hasta la fecha conocidos que conducen a neuropatías con un cuadro clínico similar, se trató ésta como una neuropatía recurrente hereditaria novel.

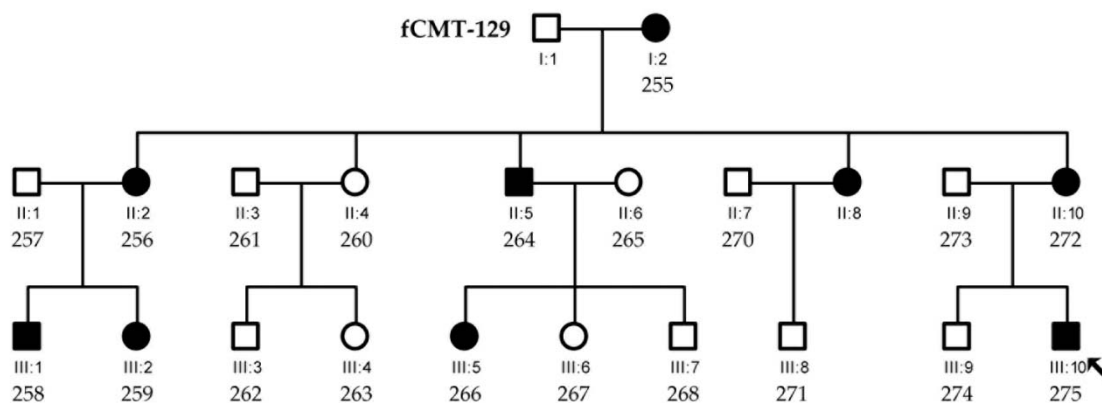


Figura M1. Árbol genealógico de la familia fCMT-129. Se tuvo disponibilidad de DNA de aquellos individuos en los que se muestra un identificador numérico.

1.2 fCMT-266

La familia fCMT-266 fue remitida por el Servicio de Neurología del Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia, donde la probando fue diagnosticada de una neuropatía recurrente hereditaria, con un patrón de herencia compatible con el de una enfermedad monogénica autosómica dominante (Figura M2). Los individuos afectados en esta familia pueden padecer: 1) episodios recurrentes de parestesias y disestesias focales migratorias en extremidades: territorio de manos, antebrazo, pie, piernas o muslo; 2) crisis

recurrentes de dolor y disestesias con distribución polineuropática en calcetín y guante, a veces acompañadas de eritromelalgia; c) parálisis recurrentes mononeuropáticas (parálisis cubital, peroneal, intercostal o toraco-abdominal); d) parálisis recurrentes del plexo lumbosacro. Es decir, el cuadro clínico puede adoptar diversas formas clínicas de neuropatía: neuropatía sensitiva focal migratoria, polineuropatía sensitiva de fibra fina (dolorosa) con o sin eritromelalgia, parálisis de nervio focales recurrentes, bien como mononeuropatías o bien como plexopatía preferentemente lumbosacra. Al descartar la implicación del gen candidato *SCN9A* (polineuropatía de fibra fina y eritromelalgia), y de otros genes relacionados con neuropatías recurrentes hereditarias (*PMP22*, *SEPT9*), se consideró como una forma novel de neuropatía recurrente hereditaria.

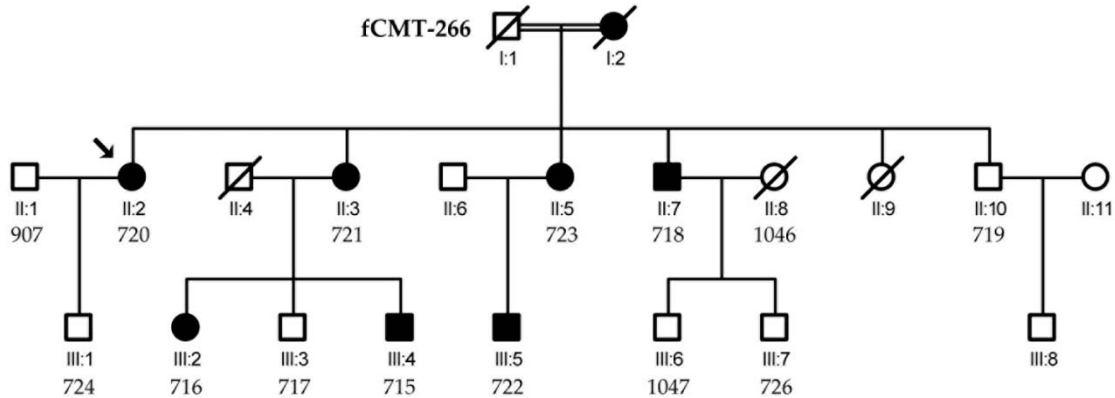


Figura M2. Árbol genealógico de la familia fCMT-266. Se tuvo disponibilidad de DNA de aquellos individuos en los que se muestra un identificador numérico.

1.3 Familias CMT2K

Hemos investigado una serie clínica caracterizada en profundidad de 29 pacientes CMT2K portadores de la mutación *GDAP1* p.R120W (c.358C>T) pertenecientes a diez familias no relacionadas (fCMT-53, fCMT-119, fCMT-213, fCMT-214, fCMT-234, fCMT-372, fCMT-406, fCMT-408, fCMT-420 y fSGT-371). Dos de estas familias (Figura M3) se caracterizan por la presencia de una notable variabilidad intrafamiliar en cuanto a la gravedad y a la edad de aparición de los síntomas.

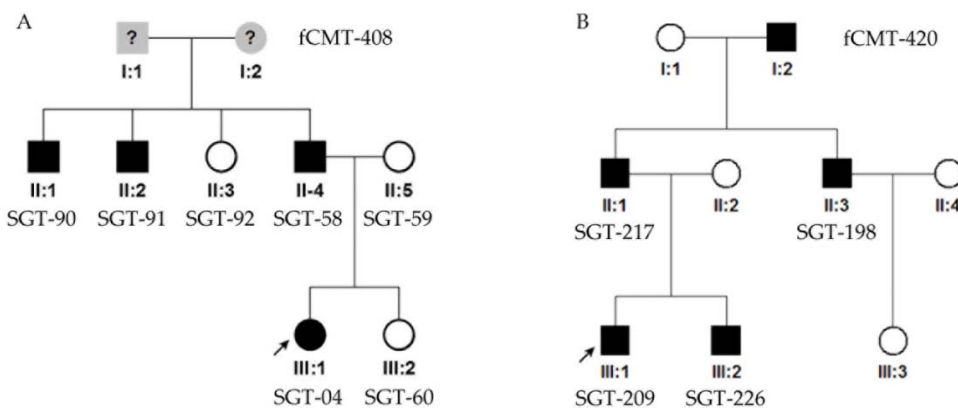


Figura M3. Árbol genealógico de la familia fCMT-408 (A) y fCMT-420 (B). Se tuvo disponibilidad de DNA de aquellos individuos en los que se muestra un identificador numérico. Todos los enfermos de estas familias son portadores de la mutación autosómica dominante *GDAP1* p.R120W.

1.4 Familias CMT sin diagnóstico genético

Disponemos de una colección de DNAs de 46 probandos pertenecientes a pacientes de la serie clínica de CMT del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, en los que previamente se habían descartado mutaciones en los genes CMT conocidos hasta la fecha

(Sivera et al., 2013, Lupo et al., 2015), y que por tanto, permanecen sin diagnóstico genético. Se realizó el rastreo mutacional de los exones codificantes del gen *JPH1*.

2. Material biológico

2.1 Cepas bacterianas

La bacteria *Escherichia coli* se ha empleado en los trabajos rutinarios de clonación molecular. La cepa *DH5α* se utilizó como hospedador de los plásmidos. Se usó la cepa *dam-/dcm-* (C2925, New England Biolabs) para obtener plásmidos libres de metilación mediada por las metiltransferasas Dam o Dcm. En la Tabla M1 se indican los genotipos de las cepas bacterianas utilizadas.

Tabla M1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

Cepa	Genotipo
<i>DH5α</i>	<i>supE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>
<i>dam-/dcm-</i>	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) TetS endA1 rspL136 (StrR) dam13::Tn9 (CamR) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>

Las cepas se crecieron en general en medio completo LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L) a 37 °C en placas sólidas o en medios líquidos con agitación. Para la selección de plásmidos se suplementaron estos medios con diferentes antibióticos en función del marcador de resistencia presente en el plásmido: ampicilina (50 µg/ml en placa o 100 µg/ml en medio líquido) o kanamicina (50 µg/ml.). La criopreservación de las cepas se hizo en viales con glicerol al 20% a una temperatura de -80°C.

2.2 Líneas celulares inmortalizadas de mamíferos

La manipulación de cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar y el crecimiento de los cultivos celulares se llevó a cabo en un incubador humidificado con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. Salvo algunas excepciones, todas las líneas se cultivaron en medio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS (siglas en inglés de suero bovino fetal), 2 mM de glutamina, 100 U.I./mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (Invitrogen). Todas las líneas celulares utilizadas en el trabajo son de adhesión y crecen formando una monocapa. Para su criopreservación, las células se resuspendieron en su correspondiente medio de cultivo, suplementando con un 20% de FBS y un 10% de DMSO, sometiendo a una congelación gradual hasta -80°C (en un contenedor con isopropanol), para finalmente almacenar los criotubos en tanques de nitrógeno líquido.

A continuación se describen las líneas celulares de mamíferos utilizadas a lo largo del trabajo:

- HeLa (ECACC no. 93021013): células epiteliales humanas derivadas de carcinoma cervical.
- HEK293T (ATCC no. CRL-3216): línea celular embrionaria derivada de riñón humano.
- C2C12, células establecidas a partir de mioblasto de ratón. Fueron amablemente cedidas por la Dra. Ana Cristina Llorente Izquierdo (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid).

-HEI-193 (ATCC no. PTA-4544): células humanas de Schwannoma generadas a partir de tumor derivado de células de Schwann.

-SW10 (ATCC no. CRL-2766): células de Schwann obtenidas a partir de cultivos primarios de células de Schwann de ratón.

-SH-SY5Y, (ATCC no. CRL-2266): células derivadas de neuroblastoma humano. Estas células se cultivaron en medio DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con las mismas concentraciones de FBS, glutamina y antibióticos anteriormente mencionadas. Además se empleó el clon SH-SY5Y GDAP1-G4 con silenciamiento estable del gen *GDAP1* mediante RNAi, y el control pLKO.1-NT (Pla-Martin et al., 2013). Estos clones se cultivaron en presencia de 2 mg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) para mantener la selección.

2.3 Líneas de *D. melanogaster*

Las diferentes líneas de moscas se han mantenido en incubadores a 18°C o 25°C, según la necesidad en la rapidez de desarrollo y proliferación, y usando tubos con comida preparada a base de harina de maíz y de soja, azúcar, levadura y agar como espesante. Para evitar contaminaciones se añadió nipagín (metil p-oxibenzoato) como fungicida y ácido propiónico como bactericida. Todos los cruces experimentales se han mantenido a 25°C.

En todos los experimentos usando *D. melanogaster* se empleó el método GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) para dirigir la expresión de los genes a las regiones/tejidos de interés. Se trata de un sistema de regulación transcripcional basado en el activador transcripcional GAL4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por el que la proteína activadora GAL4 se une a la secuencia reguladora UAS (del inglés, *upstream activator sequence*), activando la transcripción del gen ubicado hacia la dirección 3' de dicha secuencia. En la Figura M4 se muestra un esquema explicativo del sistema GAL4/UAS en *D. melanogaster*.

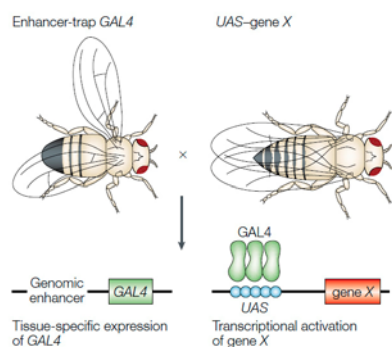


Figura M4. Esquema del funcionamiento del sistema GAL4/UAS. Cruzando moscas en las que la expresión de GAL4 está dirigida por un promotor específico con una línea que posee un gen de interés *downstream* de la secuencia UAS, se puede lograr en la progenie la expresión de dicho gen bajo el patrón de expresión dirigido por el promotor de GAL4. Extraído de *The art and design of genetic screens: Drosophila melanogaster* (St Johnston, 2002).

La mayoría de las líneas de moscas provienen de repositorios como el *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC) de Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) en Estados Unidos o el *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) de Viena (<http://stockcenter.vdrc.at/>) en Austria (Dietzl et al., 2007). Otras líneas han sido amablemente cedidas por otros grupos de investigación, e incluso algunas han sido generadas en este trabajo. En las siguientes tablas (Tablas M2-5) se describe la procedencia de las líneas empleadas, así como sus características básicas.

Tabla M2. Líneas GAL4 empleadas. Se indica el patrón de expresión principal, el cromosoma donde se localiza la inserción y la procedencia de la línea.

Línea	Patrón de expresión	Cromosoma	Origen
Act5c-GAL4	Ubicuo	II	BDSC (4414)
Mhc-GAL4	Muscular	II	BDSC
Twil-GAL4,Mef2-GAL4	Muscular	II	Dr. R. Artero
Elav-GAL4	Neural	II	BDSC (8765)
GMR-GAL4	Ojo	II	BDSC (1104)
GMR-GAL4	Ojo	I	Dra. R. Johnson
Rn-GAL4	Ala	III	Dr. Galindo
En-GAL4	Compartimento posterior	II	Dr. Galindo

Tabla M3. Líneas UAS.

Línea	Cromosoma	Origen
UAS- <i>Dcr2</i>	III	VDRC
UAS-GFP	II	BDSC (1521)
UAS- <i>hSMYD4</i> WT	Varias líneas	Este trabajo
UAS- <i>hSMYD4</i> K82E	Varias líneas	Este trabajo
UAS- <i>hSMYD4</i> -GFP WT	Varias líneas	Este trabajo
UAS- <i>hSMYD4</i> -GFP K82E	Varias líneas	Este trabajo
RNAi <i>CG1868</i>	II	VDRC (106709, KK)
RNAi <i>CG1868</i>	II	VDRC (25378, GD)
RNAi <i>CG8378</i>	III	VDRC (40705, GD)
RNAi <i>CG8378</i>	III	VDRC (40706, GD)
RNAi <i>CG14122</i>	III	VDRC (51782, GD)
RNAi <i>CG14122</i>	III	VDRC (51783, GD)
RNAi <i>CG7759</i>	II	VDRC (100412, KK)
RNAi <i>CG7759</i>	I	VDRC (21052, GD)
hsFLP, MKRS//TM6b	III	BDSC (279)
P(XP)Jp[d04563]	II	BDSC (19205)
UAS- <i>Jp</i>	II	Este trabajo
RNAi <i>Jp</i>	II	VDRC (100555, KK)
RNAi <i>dStim</i>	III	VDRC (47073, GD)
UAS- <i>Marf</i>	II	Dr. J. Chung
UAS- <i>dGdap1</i>	II;III	Dr. I. Galindo
RNAi <i>dGdap1</i>	II	Dr. I. Galindo
UAS-Htt-ex1-pQ93	II	Dr. R. Artero
UAS- <i>Serrate</i>	III	Dra. S. Bray
UAS- <i>Delta</i>	II	Dr. T. Klein

Tabla M4. Línea salvaje y líneas con balanceadores.

Línea	Cromosoma	Origen
Oregon R (wild type)	-	Dr. J. Roote
If/Cyo;MKRS/TM6b	II;III	Dr. Galindo
(lethal)/FM7;Wg ^{sp1} ;Cyo	I;II	Dra. R. Johnson

Tabla M5. Stocks adicionales generados para el trabajo.

Línea	Cromosoma	Uso
RNAi <i>Jp</i> /Cyo;UAS- <i>Dcr2</i>	II;III	Análisis fenotipos RNAi del gen <i>Jp</i>
Act5c-GAL4/Cyo;UAS- <i>Dcr2</i>	II;III	Análisis fenotipos líneas RNAi
Mhc-GAL4;UAS- <i>Dcr2</i>	II;III	Análisis fenotipos líneas RNAi
Elav-GAL4/Cyo;UAS- <i>Dcr2</i>	II;III	Análisis fenotipos líneas RNAi
GMR-GAL4;UAS- <i>Dcr2</i>	II;III	Análisis fenotipos líneas RNAi
GMR-GAL4, UAS- <i>Dcr2</i>	I	Análisis fenotipos líneas RNAi. Recombinante generado por la Dra. R. Johnson
GMR-GAL4, UAS- <i>Dcr2</i> ;UAS- <i>Jp</i>	I;II	Estudio interacciones génicas del gen <i>Jp</i>
GMR-GAL4, UAS- <i>Dcr2</i> ;RNAi <i>Jp</i> /Cyo	I;II	Estudio interacciones génicas del gen <i>Jp</i>

2.4 Anticuerpos

En la Tabla M6 se recogen los anticuerpos primarios empleados en este trabajo. En el caso de la detección de la proteína SMYD4 se emplearon dos anticuerpos capaces de detectar la proteína SMYD4 humana en WB que validamos tanto por su capacidad de detectar la proteína humana sobreexpresada, como por detectar la disminución de los niveles proteicos de la proteína SMYD4 endógena tras tratamiento con *SMYD4 siRNA* para silenciar de forma transitoria la expresión de este gen.

Tabla M6. Anticuerpos primarios empleados. Se muestran las características de los anticuerpos así como las condiciones usadas para Western Blot (WB) y/o inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Dilución
Anti HA	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	WB, 1:3000
Anti HA	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	WB, 1:3000
Anti GFP	Monoclonal de ratón	Santa cruz	WB, 1:3000
Anti GFP	Policlonal de conejo	Rockland	WB, 1:3000
Anti Lamina A/C	Monoclonal de ratón	Santa cruz	WB, 1:3000
Anti α -Tubulina	Monoclonal de ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	WB, 1:3000
Anti Actina	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	WB, 1:5000
Anti SMYD4	Monoclonal de ratón	Abcam	WB, 1:1000
Anti SMYD4	Policlonal de conejo	Novus biologicals	WB, 1:1000
Anti HSP90	Monoclonal de ratón	Santa cruz	WB, 1:5000 IF, 1:500
Anti JPH1	Monoclonal de ratón	Abcam (ab57425)	WB, 1:3000

3. Metodología de Genética Humana

3.1 Cartografiado genómico

El cartografiado genómico se realizó mediante arrays de genotipado de SNPs (*Affymetrix GeneChip Human Mapping 500k Array Set*) en la Unidad Central de Investigación (UCIM) de la Universitat de València. El tratamiento de los datos obtenidos con esta plataforma de genotipado y el posterior análisis de ligamiento multipuntual se realizó en colaboración con el Departamento de Bioinformática del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF). Con el fin de garantizar un análisis exhaustivo, se llevó a cabo un re-análisis adicional con la ayuda del Dr. Carlo Rivolta (Department of Medical Genetics, University of Lausanne, Suiza).

3.2 Cartografiado fino

El cartografiado fino se realizó en la Unidad de Genotipado de la Fundación de Investigación Clínico de Valencia. Se estudiaron marcadores microsatélites localizados dentro de las regiones candidatas y en sus regiones flanqueantes, con el fin de confirmar la cosegregación de la enfermedad y de identificar posibles fenómenos de recombinación para acotar dichas regiones. Los marcadores incluidos en el cartografiado fino para la familia fCMT-129 se muestran en la Tabla M7, mientras que en la Tabla M8 se muestran los marcadores adicionales incluidos en el acotamiento posterior de la región candidata del cromosoma 21. Los marcadores microsatélites se analizaron en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). El listado de todos los genes que codifican para proteína y miRNAs localizados en la región candidata identificada en el cromosoma 21 para la familia fCMT-129 se muestran en la Tabla M9.

Tabla M7. Marcadores microsatélites empleados en el cartografiado fino para la familia fCMT-129.

Microsatélite	Cromosoma	Inicio	Fin
<i>D2S335</i>	2q31.1	172566496	172566717
<i>D2S2188</i>	2q31.1	175604570	175604893
<i>D2S384</i>	2q31.3	181502736	181503067
<i>D2S364</i>	2q31.3	183034533	183034924
<i>D2S1361</i>	2q32.1	186216697	186217009
<i>D2S152</i>	2q32.1	188231596	188231993
<i>D3S1580</i>	3q28	188542793	188543136
<i>D3S3530</i>	3q28	189155639	189155916
<i>D3S1314</i>	3q28	190091875	190092240
<i>D3S2747</i>	3q28	190280369	190280680
<i>D3S3043</i>	3q28	190532557	190532760
<i>D21S1899</i>	21q21.1	20067702	20067995
<i>D21S1441</i>	21q21.1	22244879	22245413
<i>D21S1914</i>	21q21.2	25622317	25622632

Tabla M8. Marcadores microsatélites adicionales incluidos en la región candidata del cromosoma 21 empleados en el cartografiado fino para la familia fCMT-129.

Microsatélite	Inicio	Fin
<i>D21S1904</i>	16510368	16510727
<i>D21S1911</i>	16140736	16141126
<i>D21S1432</i>	17343307	17343705
<i>D21S11</i>	20554263	20554483
<i>D21S1437</i>	21646683	21647003
<i>D21S1442</i>	28818455	28818753
<i>D21S1258</i>	28819681	28820061
<i>D21S1265</i>	29729157	29729268
<i>D21S1270</i>	31706752	31707084

Tabla M9. Listado de los genes estudiados de la región candidata del cromosoma 21.

Nombre	Ensembl ID	Inicio(bp)	Fin (bp)	Hebra	Tipo de gen*
<i>C21orf37</i>	ENSG00000232560	18811208	18821503	+	P
<i>CXADR</i>	ENSG00000154639	18884700	18965897	+	P
<i>BTG3</i>	ENSG00000154640	18965971	18985265	-	P
<i>C21orf91</i>	ENSG00000154642	19161284	19191703	-	P
<i>CHODL</i>	ENSG00000154645	19273580	19639690	+	P
<i>TMPRSS15 (PRSS7)</i>	ENSG00000154646	19641433	19858197	-	P
<i>NCAM2</i>	ENSG00000154654	22370633	22915650	+	P
<i>MRPL39</i>	ENSG00000154719	26957968	26979829	-	P
<i>JAM2</i>	ENSG00000154721	27011584	27089874	+	P
<i>ATP5J</i>	ENSG00000154723	27088815	27107984	-	P
<i>GABPA</i>	ENSG00000154727	27106881	27144771	+	P
<i>APP</i>	ENSG00000142192	27252861	27543446	-	P
<i>CYYR1</i>	ENSG00000166265	27838528	27945603	-	P

ADAMTS1	ENSG00000154734	28208606	28217728	-	P
ADAMTS5	ENSG00000154736	28290231	28338832	-	P
Nombre	Ensembl ID / miRBase ID	Inicio(bp)	End (bp)	Hebra	Tipo de gen
hsa-mir-99a	ENSG00000207638/ MI0000101	17911409	17911489	+	M
hsa-let-7c	ENSG00000199030/ MI0000064	17912148	17912231	+	M
hsa-mir-125b-2	ENSG00000207863/ MI0000470	17962557	17962645	+	M
AP000745.1	ENSG00000221335 /-	19264028	19264116	+	M
hsa-mir-548x	ENSG00000265841/ MI0014244	20058408	20058482	-	M
AP001537.1	ENSG00000221041/ -	20076689	20076772	-	M
AP001137.1	ENSG00000221210 /-	22770068	22770146	-	M
hsa-mir-6130	-/MI0021275	24451606	24451714	+	M
hsa-mir-155	-/MI0000681	26946292	26946356	+	M
AP001340.1	ENSG00000238660/ -	26711319	26711413	+	M
hsa-mir-4759	ENSG00000266133/ MI0017400	28326280	28326362	+	M

*P= proteína; M= miRNA.

3.3 Análisis de ligamiento

El análisis de ligamiento multipuntual se llevó a cabo empleando una adaptación del software MERLIN (Abecasis et al., 2002). Los valores LOD del análisis de ligamiento bipuntual realizado tras el cartografiado fino, se estimaron mediante el programa MLINK 5.1 (Cottingham et al., 1993, Schaffer et al., 1994) del paquete estadístico LINKAGE (Lathrop et al., 1984). Ambos análisis se realizaron con la premisa de herencia autosómica dominante y penetrancia completa, y empleando como mapa de marcadores el ensamblaje GRCh37/hg19 del genoma humano.

3.4 Análisis de haplotipo

El haplotipo se construyó a partir del patrón de segregación de los marcadores. Para determinar la fase de los mismos se aplicó el principio de máxima parsimonia, de forma que se tomaron como más probables aquéllos que precisaron menos sucesos de recombinación. Una vez establecidos los haplotipos y teniendo en cuenta un patrón de herencia dominante, se consideró como susceptible de contener el *locus* responsable de la enfermedad, aquella región cromosómica común entre afectados y ausente entre sanos.

3.5 Selección de genes candidatos en el estudio genético en la fCMT-129

A partir de las bases de datos disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) y miRBase (<http://www.mirbase.org/>) se determinaron los genes contenidos en la región candidata del cromosoma 21 para la familia fCMT-129. La priorización de los genes a estudiar se realizó según su posible función y/o expresión en el sistema nervioso mediante el empleo de las herramientas bioinformáticas Endeavour (Aerts et al., 2006, Tranchevent et al., 2008) y BioMart (Ensembl). La herramienta Endeavour permite seleccionar genes potencialmente similares a genes candidatos conocidos.

3.6 Análisis mutacional

Los genes a estudiar se secuenciaron usando oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar por PCR cada uno de los exones junto a sus regiones intrónicas flanqueantes. En el Anexo I se incluyen todos los oligonucleótidos empleados para

amplificar y secuenciar exones de genes humanos. Los productos de PCR se purificaron usando High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) o GeneJet PCR purification Kit (Fermentas) y se secuenciaron en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se realizó empleando las herramientas bioinformáticas Chromas 2 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), que permite la visualización de electroferogramas y Blast (NCBI), que permite realizar alineamientos de secuencias.

3.7 Hibridación genómica comparada (CGH)

Con el fin de identificar posibles deleciones y/o duplicaciones en la región genómica candidata del cromosoma 21 en la familia fCMT-129, se realizó una hibridación genómica comparada (CGH), utilizando un array-CGH customizado, tipo *Human Array CGH 4x44K* (AgilentTechnologies, p/n G4426A-29618), en el Servicio de Genómica del CIPF. El diseño de este array se realizó con una cobertura de alta resolución con 34000 HD sondas correspondientes a la región chr 21:17,283,526-29,813,213 (UCSC hg19), lo que supone aproximadamente 1 sonda (de 60 nt cada sonda) por cada 365 pb de media. Para el análisis se empleó la plataforma Agilent Genomic Workbench 5.0 (Agilent Technologies). Se estableció como criterio de posible alteración en el número de copias del DNA aquellas muestras que tuvieran un mínimo de 2 sondas consecutivas alteradas. Además, dado que en la familia fCMT-129 se estudiaron un total de 4 familiares, de los cuales 2 eran enfermos y los otros 2 sanos, para considerar como candidatas las posibles alteraciones, debían además cosegregar con la enfermedad

3.8 Secuenciación de exoma mediante *Next Generation Sequencing*

La secuenciación de exoma se realizó en el Centro de Análisis Genómico (CNAG) de Barcelona. El enriquecimiento en secuencias exónicas se llevó a cabo usando el *kit* SeqCapE v2.0 de Nimblegen. Para la secuenciación masiva se empleó el secuenciador Illumina HiSeq 2000. El análisis bioinformático fue llevado a cabo por el CNAG siguiendo su *pipeline* específico. Con el fin de garantizar un análisis exhaustivo, también se llevó a cabo un re-análisis bioinformático de los datos de exoma en la plataforma del BIER (CIBERER) usando su propio *pipeline* recientemente descrito (Tort et al., 2013). Teniendo en cuenta el modelo de herencia dominante propuesto para la neuropatía de la familia fCMT-266, se priorizaron aquellas variantes en heterocigosis compartidas por los pacientes analizados. Para seleccionar cambios candidatos potencialmente patogénicos, se seleccionaron aquellas que provocasen cambios no sinónimos, que provocasen pérdida o ganancia de codón de parada, o que afectasen a los sitios esenciales de *splicing* y se eliminaron aquellas variantes anotadas en bases de datos (1000G, dbSNP, dbCNAG, EVS-NHLBI) con un frecuencia >1%. En sucesivos filtrados más estrictos se eliminaron todas aquellas variantes descritas en dichas bases de datos, y aquellas presentes en las bases de datos con exomas de población española, del BIER (<http://bioinfo.cipf.es/apps-beta/exome-server/beta/>) y la recién creada base de datos "Spanish Population Variability" con información procedente de más de 250 exomas (<http://spv.babelomics.org>). Para aquellas variantes candidatas no identificadas en las diferentes bases de datos y que co-segregasen con la enfermedad en la familia estudiada, se examinó su presencia en población española sana adicional procedente del Banco Nacional de DNA Carlos III situado en Salamanca mediante secuenciación Sanger o mediante dHPLC (del inglés *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*).

4. Análisis filogenéticos y estudios de genómica comparativa

4.1 Búsqueda de homólogos de la familia de proteínas Smyd, alineamientos de secuencias y reconstrucción filogenética

Para la construcción de la filogenia de la familia de las proteínas Smyd en metazoos, se seleccionaron especies que representan un amplio conjunto de los filos animales y de los que hay un proyecto de genoma suficientemente informativo. De entre los animales más basales se incluyeron especies de un placozoo (*Trichoplax adhaerens*) y de dos cnidarios (*Hydra magnipapillata* y *Nematostella vectensis*). De entre los organismos protóstomos, se incluyeron especies pertenecientes a las ramas principales: Lophotrochozoa (el molusco *Lottia gigantea*) y Ecdysozoa (el crustáceo *Daphnia pulex*, y los insectos *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* y *Anopheles gambia*). Como deuteróstomos representativos se incluyeron un hemicordado (*Saccoglossus kowalevskii*), un urocordado (el tunicado *Ciona intestinalis*), un cefalocordado (*Branchiostoma floridae*) y cuatro especies de vertebrados (*Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis* y *Danio rerio*) (Tabla M10). En un análisis posterior se incluyeron especies no animales (Tabla M10).

Tabla M10. Especies incluidas en los estudios filogenéticos de la familia de proteínas SMYD.

Especies de metazoos	
<i>Trichoplax adhaerens</i>	Metazoa; Placozoa
<i>Hydra magnipapillata</i>	Metazoa; Cnidaria; Hydrozoa
<i>Nematostella vectensis</i>	Metazoa; Cnidaria; Anthozoa
<i>Lottia gigantea</i>	Metazoa; Lophotrochozoa; Mollusca
<i>Daphnia pulex</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Apis mellifera</i> <i>Anopheles gambiae</i>	Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Metazoa; Hemichordata; Enteropneusta
<i>Ciona intestinalis</i>	Metazoa; Chordata; Tunicata
<i>Branchiostoma floridae</i>	Metazoa; Chordata; Cephalochordata
<i>Homo sapiens</i> <i>Gallus gallus</i> <i>Xenopus tropicalis</i> <i>Danio rerio</i>	Metazoa; Chordata; Vertebrata
Especies no metazoos	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Viridiplantae; Magnoliophyta; Brassicales
<i>Capsaspora owczarzaki</i>	Opisthokonta; Filasterea
<i>Monosiga brevicollis</i>	Opisthokonta; Choanoflagellida

Se realizaron búsquedas sistemáticas de proteínas Smyd en los organismos seleccionados mediante BLASTP, usando como *query* las proteínas SMYD humanas como punto de partida. Posteriormente se refinaron las búsquedas usando como *query* miembros de SMYD de clados específicos. En organismos con una menor información genómica, se realizaron TBLASTN adicionales. Solo aquellas secuencias con alta similitud (valor E < 10⁻⁷) continua en la región que contiene los dominios SET y MYND fueron seleccionadas para generar el *dataset* de proteínas Smyd. El conjunto de secuencias resultante se alineó mediante Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los alineamientos fueron editados en Jalview 2 (Waterhouse et al., 2009) para seleccionar la región continua que comprende los dominios SET, MYND y post-SET (tomando como referencia la región que va de los aminoácidos 18-279 de la secuencia de SMYD1 humana,

Uniprot ID Q8NB12) y eliminando del alineamiento las regiones (extremos N y C terminales) que quedan fuera de esta región seleccionada. Esta región seleccionada (*core*) fue empleada para generar los árboles filogenéticos. Se realizaron estudios adicionales incluyendo únicamente las secuencias pertenecientes al grupo de las proteínas Smyd4, empleando el core completo o seleccionado únicamente las regiones más conservadas mediante el uso de GBlocks (Castresana, 2000). Todos los alineamientos de proteínas SMYD generados en el estudio, siguiendo los procedimientos anteriormente detallados, se encuentran disponibles en el siguiente *link*:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134106>.

Para asegurarnos de que la topología obtenida era consistente, se emplearon dos métodos diferentes de reconstrucción filogenética: *Maximum Likelihood* (ML) y *Neighbor Joining* (NJ), usando las rutinas disponibles en MEGA 6 (Tamura et al., 2013). En general, los *gaps* fueron tratados usando la opción *partial deletion* (cut-off: 65%). En el caso del estudio de la subfamilia de Smyd4 en el que se usó GBlocks, los *gaps* fueron tratados con la opción *pairwise deletion* para NJ, mientras que para ML se consideraron todos los sitios.

En el análisis mediante ML, el árbol inicial se realizó mediante NJ/BioNJ. Se usó el modelo de sustitución de aminoácidos de LG (Le and Gascuel, 2008), considerando una distribución discreta Gamma (G) de cinco categorías y se permitieron sitios invariables (I). Este modelo de LG+G+I fue elegido porque fue el mejor modelo obtenido de acuerdo al análisis comparativo de modelos para ML disponible en MEGA 6.

En el análisis mediante NJ, las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de sustitución de JTT (Jones et al., 1992). La tasa de variación entre los sitios fue modelada con una distribución Gamma (G) de cinco categorías. La fiabilidad de las reconstrucciones filogenéticas fue estimada mediante análisis de *Bootstrap*, con 500 réplicas para cada análisis.

4.2 Estudio genómico comparativo del *locus* de *GDAP1* y *GDAP1L1*

Se compararon los contextos genómicos de los genes *GDAP1* y *GDAP1L1* en los siguientes representantes de vertebrados: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Anolis carolinensis*, *Xenopus tropicalis* y *Danio rerio*. La información de la arquitectura genómica y de los posibles ortólogos fue obtenida de los genomas correspondientes contenidos en NCBI. Los posibles ortólogos seleccionados (Anexo II) fueron confirmados con búsquedas de BLAST y mediante la comparación con los contextos genómicos de los genes *GDAP1* y *GDAP1L1* humanos.

4.3 Búsqueda de regiones reguladoras conservadas en la familia génica de las *JPH* en vertebrados.

La identificación de regiones conservadas en el gen *JPH1*, se llevó a cabo usando los datos de conservación disponibles en UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu/index.html>) y en VISTA (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>). Adicionalmente se realizó un estudio comparativo, similar al empleado por Brewer y colaboradores (Brewer et al., 2014), y que se describe a continuación: las secuencias genómicas de los ortólogos de gen *JPH1* humano en ratón, rata, perro, vaca y zarigüeya se descargaron de UCSC. Las secuencias de DNA repetitivo fueron enmascaradas (mediante las opciones de formato en UCSC) y

las secuencias genómicas se procesaron con el algoritmo de MultiPipMaker (Elnitski et al., 2010) para su alineamiento. Se usó como referencia la secuencia genómica del gen *JPH1* humano y seleccionando las opciones de 'Search both strands' y 'Chaining'. El alineamiento "acgt" obtenido mediante MultiPipMaker se usó en el programa ExactPlus (<http://research.nhgri.nih.gov/sci-hub.org/exactplus/>) (Antonellis et al., 2006), seleccionando los siguientes parámetros: *minimum length of exact match to seed* = 5, *minimum number of species to seed* = 6, *minimum number of species to extend an alignment* = 6. Este análisis permite identificar regiones conservadas excluyendo las regiones repetitivas y los exones codificantes. Además, se buscaron en las regiones 3'-UTR de los genes *JPH* sitios conservados en vertebrados de unión a miRNAs mediante la herramienta TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), identificando miRNAs específicos de cada gen *JPH* (*JPH1-4*) de vertebrados.

5. Métodos moleculares

Todos los reactivos y *kits* han sido usados según las instrucciones del fabricante, excepto cuando se especifique lo contrario. En general, los métodos moleculares han sido extraídos del manual de clonación molecular de Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989).

5.1 Extracción de ácidos nucleicos

5.1.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*, se realizó utilizando los *kits* de extracción *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), cuando era a pequeña escala (*minipreps*), y *PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit* (Life Technologies) para extracciones a mediana escala.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la obtención de DNA genómico (gDNA) a partir de individuos adultos de *D. melanogaster*:

- Recolección de 15-30 individuos anestesiados, transferir a tubo tipo "eppendorf" de 1,5 mL y congelar a -80°C (poniendo en hielo seco).
- Adicionar 200 µL del tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS al 1%) y homogeneizar mediante un homogeneizador de tejidos de tipo desechable.
- Adicionar otros 200 µL del tampón de lisis y continuar la homogeneización hasta que solo quede la cutícula.
- Incubar 30 minutos a 65°C.
- Añadir 800 µL de solución LiCl/KAc (1 parte de Acetato de potasio 5 M y 2,5 partes de LiCl 6 M) e incubar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 10000 g durante 15 min a temperatura ambiente (TA).
- Transferir 1 mL del sobrenadante a un tubo nuevo, evitando coger los restos que permanecen flotando.
- Añadir 600 µL de isopropanol, mezclar bien y centrifugar a 10000 g durante 15 min a TA.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración, lavar el precipitado con etanol al 70 %. Centrifugar 5 min, eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire con el tubo abierto.
- Resuspender el precipitado con 150 µL de Tris 10 mM (pH 7).

El gDNA de los pacientes analizados se obtuvo a partir de sangre periférica. Para los estudios de cartografiado genómico y para la secuenciación de exoma, la extracción de gDNA se realizó según el método clásico de digestión enzimática con proteinasa K y purificación con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico, seguido de precipitación con etanol (Kunkel et al., 1982).

5.1.2 Extracción de RNA

La obtención de RNA de células de mamífero en cultivo, se llevó a cabo usando el *kit RNeasy Mini* (Qiagen) de acuerdo a las especificaciones del producto, y con la opción de lisis facilitada por el paso del extracto celular a través de aguja con calibre 20G (0,9 mm de diámetro) con una jeringa. Los tejidos de interés de ratón adulto (9 meses), fueron congelados en nitrógeno líquido y el RNA se extrajo mediante el uso de Trizol, siguiendo las indicaciones del producto.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la obtención de RNA a partir de individuos adultos de *D. melanogaster*:

- Homogeneizar 4-5 moscas por genotipo en 800 µL de Trizol
- Incubar el homogeneizado durante 5 min a TA.
- Añadir 160 µL de cloroformo, mezclar fuertemente durante 15 seg e incubar 3 min a TA.
- Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y precipitar añadiendo 400 µL de isopropanol. -
- Incubar 10 min a TA.
- Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4°C.
- Eliminar sobrenadante y lavar el precipitado de RNA con 1 mL de etanol al 75 %. -
- Centrifugar durante 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire con el tubo abierto a TA (aproximadamente 15 min).
- Resuspender el RNA con agua libre de RNasas. Incubar a 55°C (5-10 min) para favorecer la resuspensión.

5.1.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos

Tras la extracción de los ácidos nucleicos se procedió a su cuantificación y análisis de su pureza empleando un espectrofotómetro de tipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

5.2 Amplificación de los ácidos nucleicos

La amplificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante PCR usando oligonucleótidos específicos. En las PCRs destinadas a amplificar regiones concretas a partir de gDNA para su secuenciación, se empleó la enzima Taq DNA polimerasa de Biotools, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. En ciertas ocasiones, fundamentalmente para amplificar fragmentos de gran tamaño y/o para amplicones ricos en GCs, se empleó la enzima *Long PCR Enzyme Mix* (Fermentas).

Para examinar la presencia de colonias positivas de *E. coli* con la construcción de interés durante los procesos de clonación, se llevó a cabo una variación de la PCR convencional, en la que se usaba como molde la propia colonia y empleando la Taq DNA polimerasa de Biotools.

5.3 Vectores, clonaciones, subclonaciones y mutagénesis dirigida

5.3.1 Vectores

En la Tabla M11 se listan los vectores empleados como esqueletos para las clonaciones y subclonaciones, así como otros vectores empleados para sobreexpresión. En la sección de clonaciones se indicarán las construcciones o plásmidos generadas en este trabajo a partir de estos vectores, así como un resumen de su obtención mediante técnicas de biología molecular.

Tabla M11. Vectores de clonación y de expresión empleados en este trabajo.

Nombre	Origen	Uso
pCR2.1-TOPO	Invitrogen	Permite la clonación directa de productos de PCR. Empleado como paso intermedio en algunas clonaciones y también utilizado para generar sondas para hibridaciones <i>in situ</i> .
pEGFP-N1 pEGFP-C1	Clontech	Permite sobreexpresar la proteína de interés fusionada a la etiqueta verde fluorescente GFP (etiqueta situada en extremo C o N-terminal respectivamente) en células de mamíferos. Empleados para sobreexpresar SMYD4 y JPH1.
pCMV-Myc pCMV-HA	Clontech	Permite sobreexpresar la proteína fusionada a etiqueta Myc o HA respectivamente (etiqueta en extremo N-terminal) en células de mamíferos.
pcDNA3	Dr. D. Baretino	Permite sobreexpresar la proteína en células de mamíferos. Usado para generar la construcción mCherry-GDAP1.
pCAGIG	Dra. N. Flames	Vector bicistrónico que permite sobreexpresar en células de mamíferos la proteína de interés y la proteína GFP como proteínas independientes a partir de un único transcrito. Empleado para sobreexpresar la JPH1 humana (tanto WT como formas mutantes) y murina.
pMIR	Dra. M.E. Armengod	Contiene un sitio de clonación múltiple (MCS, acrónimo en inglés) tras la ORF de la luciferasa. Útil para clonar secuencias 3'UTR <i>downstream</i> de la luciferasa y ver cómo afectan a los niveles de expresión mediante ensayo luciferasa.
pSPL3	Dr. J.M. Millán	Vector empleado para la generación de minigenes híbridos. Se utilizó para el estudio del efecto de variantes nucleotídicas identificadas, candidatas a tener algún efecto sobre el <i>splicing</i> .
pUASt	Dr. I. Galindo	Permite expresar la construcción de interés a expresar en <i>D. melanogaster</i> . Empleada para generar las moscas transgénicas que sobreexpresan la proteína SMYD4 humana.
pL8G5-Luc pGAL4 pcDNA3-GAL4-LHX3-LIM2 pLexA-VP16	Dr. Simon J. Rhodes (Showalter et al., 2002).	Usados en los estudios de represión transcripcional de SMYD4.
pRL-TK	Dr. P. Sanz	Usado en los ensayos de luciferasa para normalizar los niveles de transfección.
pcDNA3-HSP90 HA	Addgene (Plásmido 22487)	Estudio interacción entre la proteína HSP90 y SMYD4.
pCAGGSneo-HA-HSP90 AB1[1-724] HSP90 AB1[1-500] HSP90 AB1[250-724] HSP90 AB1[500-724]	Dr. Ryuji Hamamoto (Hamamoto et al., 2014).	Utilizados en los estudios de interacción entre fragmentos de la proteína HSP90 y SMYD4.
pCMV-Myc-GDAP1 pCMV-HA-GDAP1 Formas WT y p.R120W	Generados previamente en el laboratorio. (Pla-Martin et al., 2013).	Empleados para generar las construcciones de pCDNA3-mCherry-GDAP1

5.3.2 Clonaciones y subclonaciones

La obtención de los insertos de DNA para su clonación se realizó mediante amplificación por PCR para introducir los sitios de restricción. En general se usaron la enzima Pfu turbo DNA polimerasa (Agilent) y un programa de tiempos y temperaturas adecuado para la extensión y naturaleza génica del fragmento.

En el caso de las subclonaciones, siempre que fue posible se hizo directamente mediante restricción y ligación, o modificando los extremos del inserto digerido para generar extremos compatibles con los sitios del vector destino.

Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA amplificados por PCR y/o digeridos con la enzima de restricción correspondiente, se purificaron utilizando el *High Pure PCR Product Purification Kit*.

En los casos en los que se tuvo que aislar el fragmento de interés mediante separación electroforética en gel de agarosa, se cortó la banda de interés y se purificó mediante el uso del *kit QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen). En algunos casos los vectores se trataron con la fosfatasa alcalina FastAP (Fermentas) para desfosforilar los extremos 5' y evitar procesos de religación. Para la ligación de los plásmidos se utilizó la T4 DNA ligasa (Fermentas). La obtención del clon de interés se realizó transformando el producto de ligación en cepas de *E. coli DH5α* electrocompetentes (preparadas de acuerdo con Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989)) mediante electroporación a 1.700 voltios.

Con el fin de identificar la presencia del inserto, posteriormente se analizaron las posibles colonias positivas mediante PCR de colonia y/o análisis de restricción del plásmido purificado.

5.3.3 Mutagénesis dirigida

La introducción de mutaciones de interés en las construcciones se realizó mediante mutagénesis dirigida por PCR. Para ello, se introdujeron las mutaciones de interés en los oligonucleótidos cebadores empleados, y usando la enzima Pfu turbo DNA polimerasa (Agilent). Las condiciones empleadas se establecieron en base al protocolo descrito en el *kit QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* (Agilent).

Las secuencias de todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación automática en un analizador genético ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

En la Tabla M12 se muestran todas aquellas construcciones generadas en el trabajo a través de procesos de clonación, subclonación y/o mutagénesis dirigida. En el Anexo IV se listan todos aquellos oligonucleótidos empleados para generar dichas construcciones. Las construcciones correspondientes a los vectores pSPL3 y pMIR se indican en los apartados correspondientes a su utilización.

Tabla M12. Construcciones generadas en el trabajo.

Construcción	Obtención
p.EGFP-SMYD4 WT y p.K82E	Amplificación de <i>SMYD4</i> humano a partir de cDNA de la línea celular HEI-193, usando los oligos SMYD4_pEGFP_XhoI_D y SMYD4_pEGFPN1_BamHI_R. Clonación en los sitios XhoI/BamHI del vector pEGFP-N1. El mutante p.K82E se obtuvo mediante mutagénesis dirigida usando los primers SMYD4_K82E_D y SMYD4_K82E_R.
pCMV-HA-SMYD4	Amplificación de <i>SMYD4</i> humano a partir de cDNA de la línea celular HeLa, usando los primers SMYD4_EcoRI_D y SMYD4_XhoI_R. Clonación en sitios EcoRI/XhoRI del vector pCMV-HA.
pCMV-HA-Smyd4 de ratón	Amplificación de <i>Smyd4</i> murino a partir de cDNA de la línea celular de SW10, usando los oligos Mm_Smyd4_EcoRI_D y Mm_Smyd4_XhoI_R. Clonación intermedia en el vector pCR2.1-TOPO. Subclonación en los sitios EcoRI/XhoI del vector pCMV-HA.

p.GAL4-SMYD4 WT y p.K82E	Se pasó el plásmido pcDNA3-GAL4-LHX3-LIM2 por la cepa de <i>E. coli dam-dcm-</i> para evitar metilación en el sitio XbaI. Eliminación del inserto mediante digestión EcoRI/XbaI y purificación del esqueleto pcDNA-GAL4 EcoRI/XbaI. Amplificación de SMYD4 empleando como molde las construcciones p.EGFP-SMYD4 WT y p.K82E, y usando los primers GAL4_SMYD4_EcoRI_D y GAL4_SMYD4_XbaI_R. Clonación en el esqueleto pcDNA3-GAL4 EcoRI/XbaI previamente generado.
pUASst-SMYD4 WT y p.K82E	Subclonación en los sitios EcoRI/XbaI del vector pUASst de los insertos SMYD4 WT y p.K82E procedentes de las construcciones p.GAL4-SMYD4 WT y p.K82E.
pUASst-SMYD4-GFP WT y p.K82E	Subclonación en los sitios XhoI/XbaI del vector pUASst de los insertos SMYD4-GFP WT y p.K82E procedentes de las construcciones p.EGFP-SMYD4 WT y p.K82E. Paso previo de los plásmidos de p.EGFP-SMYD4 por cepa de <i>E. coli dam-dcm-</i> para evitar metilación en el sitio XbaI del vector.
pEGFP-N1-JPH1 pECFP-C1-JPH1 WT, p.R213P, p.D624H	Amplificación de JPH1 humano usando como molde el clon IMAGE: 9021744 pCR4-TOPO-JPH1 (MHS1768-99865553, OpenBiosystems), usando los primers JPH1_pEGFP_HindIII_D y JPH1_pEGFPN1_SalI_R o JPH1_pECFP_C1_SalI_R, y clonación en los sitios HindIII/SalI de los vectores pEGFP-N1 o pECFP-C1, respectivamente. Las variantes p.R213P y p.D624H fueron generadas mediante mutagénesis dirigida empleando los oligonucleótidos JPH1_R213P_D y JPH1_R213P_R, o D624H-JPH1-D y D624H-JPH1-R respectivamente.
pCAGIG-JPH1 WT, p.R213P, p.D624H	Usando como molde el vector pCR4-TOPO JPH1 se generaron mediante mutagénesis dirigidas las versiones mutantes p.R213P y p.D624H. Subclonación en sitio EcoRI del vector pCAGIG de las formas JPH1 WT, p.R213P y p.D624H.
pCAGIG-Jph1 de ratón	Subclonación en el sitio EcoRI del vector pCAGIG del inserto Jph1 murino procedente del clon IMAGE: 40129762 pCR4-TOPO-mouse Jph1 (MMM1013-211691633, OpenBiosystems).
pCAGIG-GDAP1 WT y p.R120W	Subclonación en los sitios EcoRI/NotI del vector pCAGIG de los insertos GDAP1 WT o p.R120W de los vectores pCMV-Myc-GADP1 WT o p.R120W respectivamente.
pcDNA3-mCherry-GDAP1 WT y p.R120W	La ORF que codifica para la etiqueta fluorescente mCherry fue amplificada por PCR (sin codon de parada) usando los primers mCherry-BamHI-D y mCherry-EcoRI-R, y clonada en los sitios BamHI/EcoRI del vector pcDNA3. Los insertos GDAP1 WT y p.R120W (procedentes de las construcciones pCMV-Myc-GADP1 WT o p.R120W) fueron subclonados en los sitios EcoRI/NotI del vector pcDNA3-mCherry generado, quedando GDAP1 en la misma pauta que mCherry.

5.4 Transfección de células de mamífero

Las transfecciones transitorias de células de mamífero en cultivos, se realizaron usando FuGene HD (Promega). Para la transfección de *siRNA* y para los ensayos en los que se usaron las construcciones de pMIR se empleó Lipofectamina 2000 (Life Technologies). En todos los casos, la mezcla a transfectar se realizó en el medio libre de suero OPTI-MEM (Life Technologies). En el caso de las transfecciones con Lipofectamina 2000, se cambió a medio fresco transcurridas 4-6 h post-transfección, para minimizar la posible toxicidad celular.

6. Generación de moscas transgénicas

6.1 Generación de moscas transgénicas para la sobreexpresión de SMYD4 humano

Para obtener moscas transgénicas que pudieran sobreexpresar la proteína humana SMYD4 o la proteína de fusión SMYD4-GFP (tanto la versión WT como la forma mutante p.K82E), se generaron las distintas construcciones clonadas en el vector pUASst (Tabla M12). Este vector contiene elementos UAS *upstream* de la secuencia clonada, lo que permite su expresión mediante el sistema GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993), anteriormente detallado.

Las construcciones generadas fueron enviadas a la empresa BestGene Inc. (EEUU) para su microinyección en embriones de *D. melanogaster*. Se obtuvieron al menos 5 líneas para cada transgén. Dado que la inserción del transgén en el genoma de *D. melanogaster* es un proceso aleatorio, es preciso realizar cruces prueba para conocer la localización de la

inserción, aprovechando estos cruces para balancear con un cromosoma balanceador. En la Figura M6 se muestra el esquema de cruces seguidos para conocer la localización de la inserción.

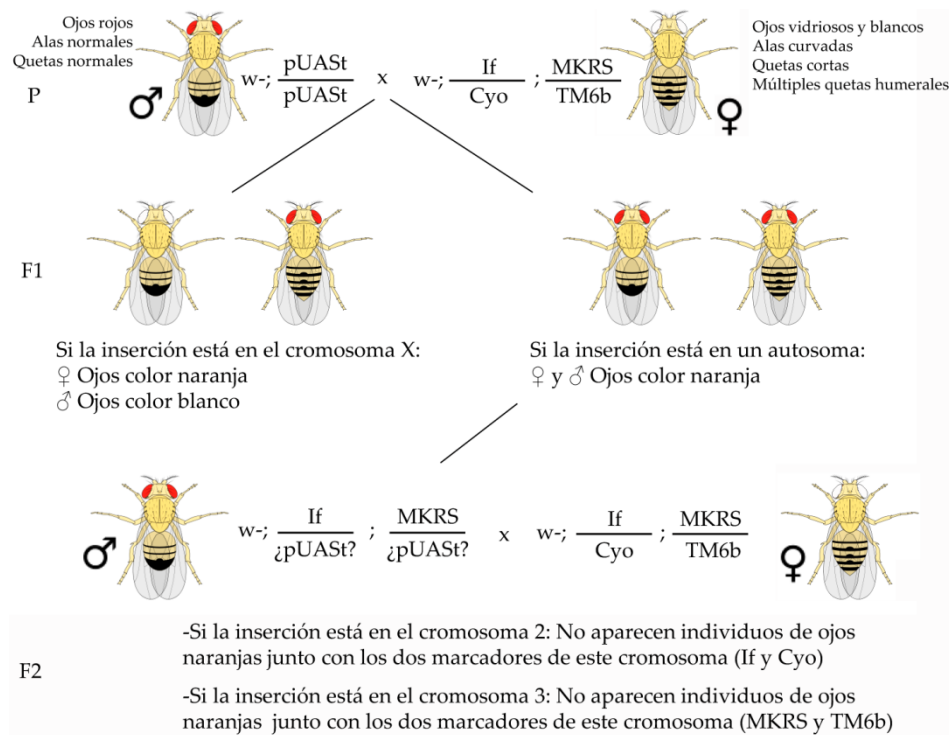


Figura M6. Esquema de los cruces necesarios para mapear las inserciones.

6.2 Generación de línea para la sobreexpresión del gen *Jp* (CG4405)

Se consultaron las diferentes colecciones disponibles de *D. melanogaster* con elementos transponibles insertados al azar en su genoma que contuvieran sitios UAS, con el fin de disponer de una línea capaz de sobreexpresar de forma dirigida el gen *Jp* (CG4405). Los elementos de inserción han sido ampliamente utilizado en *D. melanogaster* para dirigir la sobreexpresión de los genes que flanquean el elemento o incluso para disrumpir genes (Rorth et al., 1998, Bellen et al., 2011). En la colección de Exelixis (Harvard Medical School) generada por Thibault y colaboradores (Thibault et al., 2004), está disponible la línea P(XP)*Jp*[d04563], que contiene el elemento XP insertado en la región contigua a la región 5'-UTR del gen de la *Jp* (Figura M7). El elemento XP contiene 2 sitios UAS situados en los extremos del elemento y con orientaciones opuestas, lo que permitiría la sobreexpresión hacia ambos lados de la inserción (Figura M7A). Uno de los sitios UAS está flanqueado por sitios FRT (del inglés *short flippase recognition target*), lo que permite su eliminación mediante recombinación homóloga mediada por la recombinasa Flipasa (FLP). El sistema de recombinación FLP-FRT es ampliamente empleado en la manipulación genética de *D. melanogaster* (Golic and Lindquist, 1989), y es análogo al sistema Cre-Lox. En la Figura M8 se muestra el esquema de cruces seguidos para conseguir la línea en la que mediante recombinación homóloga mediada por la FLP, se ha eliminado del genoma el sitio UAS adicional del elemento XP.

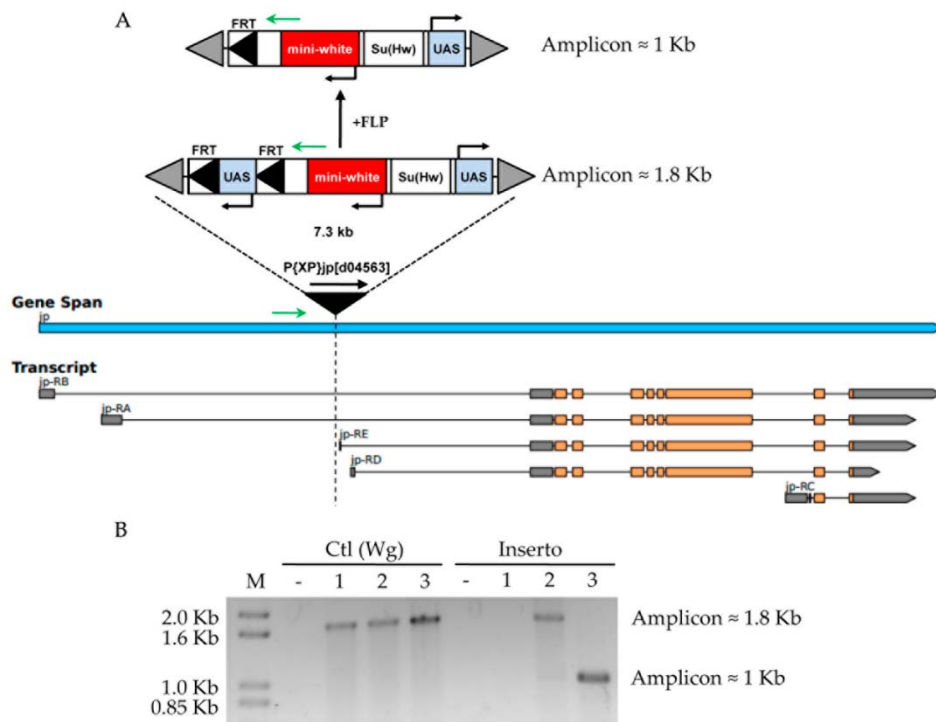


Figura M7. Línea de mosca para la sobreexpresión de *Jp* en *D. melanogaster*. (A) Se muestra el elemento XP insertado en la región cercana a la región 5'-UTR del gen *Jp* (*CG4405*) en el genoma de *D. melanogaster*. Se indican los tamaños esperados al amplificar con los oligonucleótidos JP-CG4405-FLPout-F/R (flechas en verde) usados en el cribado por PCR a partir de gDNA de la línea con la inserción P{XP}Jp[d04563] o de la línea a la que se ha eliminado el UAS adicional mediante la acción de la Flipasa (FLP). (B) Imagen de un gel de agarosa obtenido al resolver los productos de PCR al amplificar la inserción (carriles Inserto) con los oligonucleótidos JP-CG4405-FLPout-F/R usando gDNA de la línea con la inserción P{XP}Jp[d04563] (carril 2) o de la línea a la que se ha eliminado el UAS adicional mediante la acción de la Flipasa (carril 3). En el carril 3 se puede ver que el tamaño observado (1Kb) coincide con el tamaño esperado de eliminar el sitio UAS adicional. Control se ha usado gDNA de mosca wt OrR (carril 1). Como control de amplificación del gDNA se ha amplificado parte de la región genómica del gen *Wg* (carriles Ctl (*Wg*)) de *D. melanogaster*.

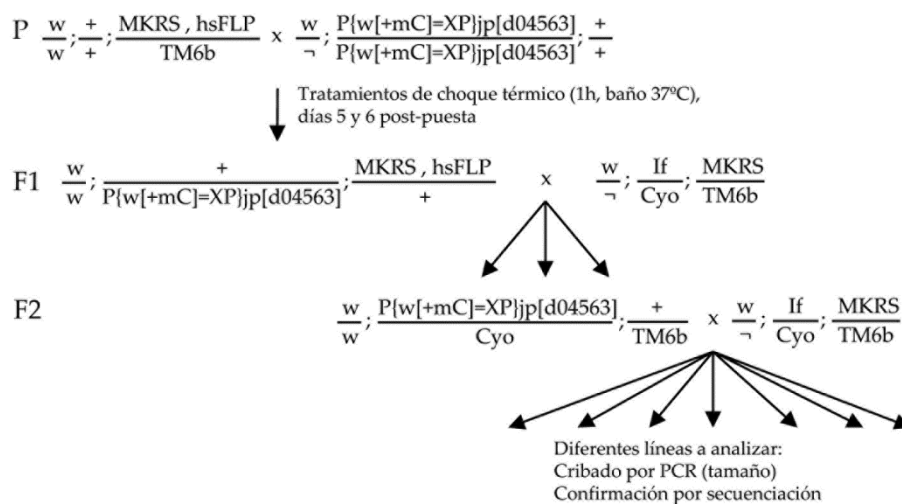


Figura M8. Esquema de cruces seguidos para la generación de la línea UAS-*Jp*. Se partió de las líneas hsFLP (Flipasa que se induce con tratamiento de choque térmico) y P{XP}Jp[d04563] (contiene el elemento XP insertado en la región cercana al 5' UTR del gen *Jp* en el genoma de *D. melanogaster*).

La expresión de la FLP empleada está dirigida por un promotor que se induce en presencia de choque térmico. La inducción se llevó a cabo incubando el tubo durante 1 h en un baño a 37°C los días 5 y 6 post-puesta (Figura M8), para incrementar la eficiencia del proceso, ya que para que el evento de recombinación se pueda heredar a la

descendencia, debe producirse en la línea germinal. Para garantizar que los sucesos analizados sean fruto de recombinaciones germinales y no somáticas, se analizaron directamente individuos procedentes de la descendencia de la F2.

La eliminación del sitio UAS se comprobó mediante PCR a partir de gDNA de las líneas analizadas procedentes de individuos de la descendencia de la F2. Se usaron el oligonucleótido JP-CG4405-FLPout-F (5'-TGCTGTGGTCCGTTCTCTTGGC-3') que hibrida en la región genómica 5' antes de la inserción, y el oligonucleótido JP-CG4405-FLPout-R (5'-TCGGCTGCTGCTCTAAACGACG-3'), que hibrida dentro de la inserción, en la región 3' posterior a los sitios FRT. Adicionalmente la eliminación se confirmó mediante secuenciación. En la Figura M7A se muestra un esquema donde se ilustra la localización del elemento insertado en el genoma de *D. melanogaster*, así como el cribado por PCR realizado para identificar la línea de mosca a la que se ha eliminado el sitio UAS adicional (Figura M7B).

7. Análisis de expresión de genes

En todos los métodos descritos en este apartado se ha trabajado en condiciones libre de RNasas.

7.1 Obtención del cDNA mediante retrotranscripción, RT-PCR y qRT-PCR

La obtención de cDNA para el análisis de la expresión génica se hizo en general partiendo de 1 µg de RNA total y usando la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen). En el caso particular del cDNA generado a partir de RNA total de individuos adultos de *D. melanogaster*, se empleó el kit *SuperMix cDNA qScript* (Quanta Bioscience). El cDNA obtenido se empleó como molde para el estudio de la expresión génica mediante RT-PCR y/o qRT-PCR. En el Anexo V se listan todos los oligonucleótidos empleados en estos análisis de expresión.

En aquellos casos en los que se quiso determinar la expresión de un gen de forma cualitativa, el cDNA procedente de los tejidos de interés se empleó como molde para realizar una PCR convencional usando la DNA Taq polimerasa (Biotools) (RT-PCR). Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2%. Como control positivo se empleó la expresión del gen de expresión constitutiva *GAPDH* (tanto en células en cultivo, tejidos murinos o en *D. melanogaster*), usando oligonucleótidos específicos para cada organismo Anexo V).

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante qRT-PCRs, empleando para ello el sistema de *SYBR Green Taq Mastermix* (Quanta Biosciences) y el equipo *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche).

En general, los oligonucleótidos empleados en las qRT-PCRs se diseñaron con la herramienta Primer3 contenida en la sección *Assay Design Center* disponible en la web de Roche (<http://lifescience.roche.com/>). Todos los oligonucleótidos fueron sometidos a un proceso de validación mediante RT-PCR para confirmar su especificidad y que produjeran un único amplicón. Junto a los datos de cada qRT-PCR en el LightCycler también se obtuvieron las curvas de fusión (*melting curves*), para confirmar la presencia de un único pico en cada amplicón. Los datos de la qRT-PCR se analizaron con el método de Pffaf (Pffaffl, 2001). Este método requiere el cálculo de la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos. Las eficiencias se calcularon en cada qRT-PCR con el método de los *Fit Points*. Los resultados se expresaron en términos de cambios de expresión comparados

con el control experimental, y normalizados con el control de carga (gen de expresión constitutiva).

7.2 Datos de expresión *High-Throughput* de *D. melanogaster*

Con el fin de comparar los perfiles de expresión de los genes *Smyd4* de *D. melanogaster*, se emplearon los datos de expresión *High-Throughput* disponibles en Flybase (<http://flybase.org/>) que proceden de los consorcios FlyAtlas y modENCODE.

Los los datos del perfil de expresión anatómico de FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007), contiene los niveles de expresión de cada gen en una colección de 25 tejidos de larva y adulto, y que en la Figura 26 corresponden con los siguientes tejidos y en este orden: sistema nervioso central de larva, región anterior del intestino de larva, región posterior del intestino de larva, tubos de Malpighi de larva, cuerpo graso de larva, glándula salivar de larva, tráquea de larva, carcasa de larva, cabeza de adulto, ojo de adulto, cerebro de adulto, ganglio torácico-abdominal de adulto, *crop* de adulto, región anterior del intestino de adulto, región posterior del intestino de adulto, tubos de Malpighi de adulto, cuerpo graso de adulto, glándula salivar de adulto, corazón de adulto, espermateca (órgano de almacenamiento espermático) de hembra virgen adulta, espermateca de hembra inseminada adulta, ovario de adulto, testículos de adulto, glándula accesoria de adulto, carcasa de adulto.

Los datos del perfil de expresión temporal de modENCODE (Graveley et al., 2011), contienen información sobre los niveles de expresión génica en 30 tiempos diferente a lo largo del desarrollo, desde la fertilización hasta el individuo adulto., y que en la Figura 26 corresponden con los siguientes estadios temporales y en este orden: embrión de 2-4h, embrión de 4-6h, embrión de 6-8 horas, embrión de 8-10h, embrión de 10-12h, embrión de 12-14h, embrión de 14-16h, embrión de 16-18h, embrión de 18-20h, embrión de 20-22h, embrión de 22-24h, larva L1, larva L2, larva L3 de 12h, larva L3 *puff stage* (PS) 1-2, larva L3 PS 3-6, larva L3 PS 7-9, prepupa blanca (WPP, del inglés *white pre-pupa*) nueva, prepupa blanca 12h, prepupa blanca 14h, pupa 2d post-WPP, pupa 3d post-WPP, pupa 4d post-WPP, macho adulto de 1 día, macho adulto de 5 días, macho adulto de 30 días, hembra adulta de 1 día, hembra adulta de 5 días, hembra adulta de 30 días.

7.3 Hibridación *in situ* de embriones de *D. melanogaster*

El patrón de expresión de los genes *Smyd4* en *D. melanogaster* se determinó mediante hibridaciones *in situ* en embriones. Las diferentes soluciones empleadas en este análisis se detallan en el Anexo III.

7.3.1 Generación de las sondas de RNA para hibridaciones *in situ* de embriones de *D. melanogaster*

Para la construcción de los plásmidos usados para generar las sondas de RNA se amplificaron por PCR las regiones génicas que contuvieran los exones de los genes de interés, usando como molde gDNA de la cepa salvaje OrR de *D. melanogaster*. Los oligonucleótidos empleados están listados en el Anexo VI. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se seleccionaron las construcciones que contuvieran el inserto en orientación opuesta respecto del promotor T7 del vector, para poder generar sondas *antisense* que hibridasen con los transcritos de los genes de interés. La orientación se determinó mediante PCR

dirigida (usando uno de los oligonucleótidos empleados para amplificar los insertos y el oligonucleótidos M13 *forward* o *reverse* específicos del vector) y se confirmó mediante secuenciación directa. Como control positivo de la técnica se usó una sonda *antisense* generada específicamente frente al gen *Wg*, y como control negativo se empleó la sonda *sense* frente al mismo gen. En la Figura M9 se muestra un esquema del vector linealizado.

Para generar las sondas, los vectores fueron linealizados mediante digestión enzimática (HindIII, excepto en el caso de los vectores de *Wg*, en los que se usó BamHI). La linealización se confirmó en gel de agarosa. Los vectores linealizados fueron purificados mediante precipitación con el *kit Pellet Paint* (Novagen) y se usaron como molde para la síntesis *in vitro* de las sondas de RNA marcadas con digoxigenina (DIG)-UTP mediante el uso de la enzima T7 RNA polimerasa y el *DIG RNA Labeling KIT* (Roche). Una vez se completó la reacción, se llevó a cabo una reacción de hidrólisis mediante la adición del Tampón carbonato 2X e incubación durante 15-20 min a 65°C. Este paso es crucial para obtener fragmentos de las sondas más pequeños y facilitar su acceso a los diferentes tejidos de los embriones de *D. melanogaster*. Posteriormente se purificó mediante precipitación y se resuspendió en agua. Se confirmó en gel la hidrólisis parcial de las sondas. El rendimiento en la producción de las sondas se determinó mediante titulación siguiendo el *spot test* detallado en el *RNA Labeling Kit* (Roche); para ello se prepararon diluciones seriadas tanto de una sonda control de concentración conocida, como de las sondas preparadas. Se emplearon membranas de nylon positivamente cargadas (Roche). La unión del RNA a la membrana se facilitó mediante tratamiento con luz UV. La detección se hizo empleando el anticuerpo anti-DIG conjugado a una fosfatasa alcalina del kit (Roche). En la Figura M9 se muestra uno de los *spot tests* realizados para determinar la concentración de las sondas.

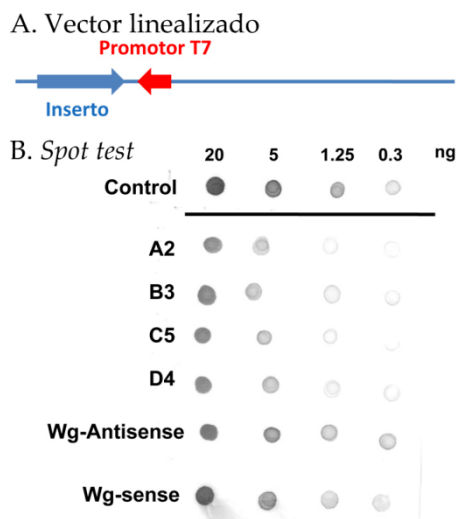


Figura M9. (A) Vector linealizado para la generación de sondas y (B) ejemplo del *spot test* para la titulación de las sondas.

7.3.2 Recolección, fijación y procesamiento de los embriones de *D. melanogaster*

Se recolectaron embriones de la cepa salvaje OrR de *D. melanogaster* de 0 a 16 h a partir de placas de puesta (compuestas por agua, zumo de uva, nipagín y agar como espesante, y suplementado con levadura) y se transfirieron a un tamiz dónde se les aplicaron los siguientes tratamientos:

- Lavar abundantemente con agua para eliminar restos de levadura.
- Decorionizar con lejía al 50% durante 2 min.
- Eliminar la lejía y lavar abundantemente con agua hasta eliminar los restos.

- Transferir los embriones a una mezcla 1:1 de heptano:paraformaldehído 4% (PFA). Incubación durante 20 min en agitador (balanceador oscilante).
- Eliminar la fase inferior, correspondiente al fijador (PFA) y añadir el mismo volumen de metanol 100%. Agitar vigorosamente (vórtex) para desvitelinizar los embriones.
- Dejar reposar hasta que los embriones desvitelinizados caigan al fondo del tubo.
- Desechar la fase superior (heptano) y rellenar con metanol.
- Lavar con metanol (al menos un lavado).
- Almacenar a -20°C hasta su uso.

7.3.3 Hibridación y detección

Una vez los embriones están fijados, se procede con los pretratamientos y el protocolo de hibridación *in situ* que a continuación se detalla. Si no se indica lo contrario, los embriones se mantienen en agitación durante los diferentes tratamientos.

-Rehidratar y fijar mediante incubaciones sucesivas en cada una de estas mezclas decrecientes en el contenido de metanol:

7 partes metanol / 3 partes paraformaldehído 4%

5 partes metanol / 5 partes paraformaldehído 4%

3 partes metanol / 7 partes paraformaldehído 4%

- Incubar 20 min con paraformaldehído al 4%.
- Realizar 3 lavados de 2 min con PBT.
- Incubar con proteinasa K (50 µg/ml) durante 2 min en agitación.
- Eliminar la proteinasa K y lavar dos veces durante 2 min con glicina 2 mg/mL en PBT para detener la digestión.
- Lavar dos veces con PBT.
- Incubar durante 10 min con una mezcla 1:1 de PBT y solución de hibridación.
- Lavar con solución de hibridación durante 10 min.
- Prehibridar con solución de hibridación a 55°C en baño durante 1h. Sin agitación.
- Preparar la sonda (aproximadamente 200 ng) en solución de hibridación. Desnaturalizar la sonda hirviendo durante 5 min. Enfriar inmediatamente en hielo.
- Hibridación: incubar a 55°C los embriones con la sonda desnaturalizada (en solución de hibridación) toda la noche y sin agitación.
- Al día siguiente, atemperar todo lo necesario a 55°C para los lavados.
- Retirar la sonda (guardar para su reutilización). Lavar en baño a 55°C con agitación suave:
 - 2 lavados de 20 min con solución de hibridación
 - 20 min con 8 partes solución hibridación / 2 PBT
 - 20 min con 6 partes solución hibridación / 4 PBT
 - 20 min con 4 partes solución hibridación / 6 PBT
 - 20 min con PBT
- A partir de aquí todo a TA.
- Lavar durante 20 min con PBT.
- Incubar durante 2 h con anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) a una concentración de 1:2000 diluido en PBT (no es necesario preabsorber este anticuerpo).
- Realizar 4 lavados de 15 min con PBT.
- Lavar 3 veces durante 5 min con solución de detección (tampón para la fosfatasa alcalina).
- Transferir los embriones a un recipiente en el que se puedan observar a la lupa, e incubar con solución de detección.

-Para la detección de la señal se utilizó un método colorimétrico. El anticuerpo anti-DIG está conjugado al enzima fosfatasa alcalina, de manera que al añadir el sustrato, basado en NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche) y X-fosfato (BCIP, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine Salt, Roche), se produce una reacción de color.

-Preparar una mezcla de BCIP/NBT en solución de detección (siguiendo recomendaciones del *kit* de Roche).

-Incubar los embriones en esta mezcla en oscuridad y sin agitación. El tiempo de aparición de la señal es variable, por eso es conveniente comprobar periódicamente la reacción.

-Lavar con PBT para detener la reacción de color.

-Montar sobre portaobjetos con medio de montaje Aqua Polymount (Polysciences Inc.); posteriormente añadir con cuidado el cubreobjetos (evitando la aparición de burbujas), dejar secar al aire durante 1 h, y guardar en nevera hasta su visualización en el microscopio.

7.4 Hibridación *in situ* en cortes de embriones de ratón

Para determinar el patrón de expresión de *Smyd4* en embriones de ratón, se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* sobre cortes de criostato de embriones.

7.4.1 Generación de las sondas de RNA para hibridaciones *in situ* en cortes de embriones de ratón

El diseño de oligonucleótidos para generar las sondas para la detección de *Smyd4* mediante hibridación *in situ* se siguió según el protocolo "*Technical white paper: in situ hybridization*" disponible en la web de Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>). Brevemente, se diseñaron los oligonucleótidos Mm-*Smyd4*_E10_Hyb-D y Mm-*Smyd4*_3UTR-SP6_Hyb-R (disponibles en el Anexo VII), que permiten amplificar una región que contiene parte de la secuencia 3'-CDS/3'-UTR del transcrito de *Smyd4* murino. El oligonucleótido reverso contiene la secuencia de unión a la Sp6 RNA polimerasa (5'-GCGATTTAGGTGACACTATAG-3') para permitir la síntesis *in vitro* de la sonda de RNA. La amplificación por PCR se realizó a partir de cDNA de cerebro de ratón adulto y usando la Taq DNA polimerasa (Biotools). Para obtener suficiente cantidad de partida, el producto de PCR se clonó en el pCR2.1-TOPO. El constructo resultante se usó de molde para amplificar con los oligonucleótidos Mm-*Smyd4*_E10_Hyb-D y Mm-*Smyd4*_3UTR-SP6_Hyb-R. Se purificó el producto de PCR mediante el protocolo de MinElute PCR Purification kit (Qiagen). Este producto se usó como molde para la síntesis *in vitro* de la sonda de RNA marcada con DIG con la Sp6 RNA polimerasa del *DIG RNA Labeling KIT* (Roche). Una vez completada la reacción, se purificó la sonda de RNA, se resuspendió en agua y se le adicionó formamida. El producto se testó en gel de agarosa. Se guardó en -80°C hasta su uso.

7.4.2 Prehibridación, hibridación, detección y montaje

Se emplearon secciones de 15 µm obtenidas mediante criostato a partir de embriones de E14.5 de edad de ratones *C57BL/6J*. Los cortes fueron amablemente cedidos por el laboratorio de la Dra. Nuria Flames. Las diferentes soluciones empleadas en este análisis se detallan en el Anexo III. A continuación se detalla el protocolo seguido:

a) Prehibridación: se lleva a cabo en un recipiente que permita cubrir los portaobjetos con los cortes:

- Lavar con PBS
- Fijar con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a TA.
- Lavar 3 veces (3 min cada) con PBS.
- Digerir con proteinasa K (10 µg/mL en PBS) durante 5 min a TA. Sin agitación.
- Fijar con paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 min a TA.
- Lavar 3 veces (5 min cada) con PBT.
- Incubar 10 min en la solución de acetilación a TA.
- Lavar 3 veces (5 min cada) con PBT.

b) Hibridación: se lleva a cabo en cámaras de incubación. Aquí las soluciones se añaden con cuidado sobre los cortes situados en los portaobjetos.

- Añadir 500 µL de solución de hibridación en los portaobjetos e incubar durante 1-2 h a 62°C. En la cámara de incubación añadir SSC 5x, y formamida al 50%.
- Transcurrido ese tiempo, eliminar la solución de hibridación y añadir la sonda de RNA marcada con DIG, previamente desnaturalizada (80°C durante 5 min y después al hielo). Normalmente se prueban dos diluciones de la sonda, preparadas sobre solución de hibridación. Añadir 80 µL de solución de hibridación con la sonda marcada por portaobjetos. Repartir uniformemente y añadir cubreobjetos, evitando que se formen burbujas. Incubar toda la noche a 62°C en la cámara de incubación (con SSC 5x y formamida al 50%).

c) Lavados y detección: los lavados se llevan a cabo en un recipiente que permita cubrir los portaobjetos.

- Sumergir los portaobjetos en una solución con SSC 0,5x, formamida al 50% y Tween al 0,1% durante 15 min a 62°C. Pasado ese tiempo, al coger los portaobjetos, los cubreobjetos se pueden retirar fácilmente.
- Lavar 3 veces lavados de 30 min cada a 62°C con nueva solución de SSC 0,5x, formamida al 50% y Tween al 0,1%.
- Lavar 3 veces con MABT durante 5 min a TA.
- Transferir los portaobjetos a cámaras húmedas (con papel de filtro humedecido con agua destilada), y añadir 500 µL de solución de bloqueo. Incubar durante 1h a TA.
- Preparar el anticuerpo anti-DIG (Roche) a una concentración de 1:5000 en MABT con suero de oveja al 1% y con bloqueo comercial (Roche) al 1%. Añadir 500 µL por portaobjetos y dejar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
- Al día siguiente hacer sucesivos con MABT. Los lavados se hacen en recipiente que permita sumergir el portaobjetos. Se hacen 10 lavados de 20-30 min cada lavado con MABT a TA y con agitación suave.
- Lavar 3 veces con tampón B1
- Para desarrollar la reacción de color se emplea la mezcla de BCIP/NBT, al igual que se explicó anteriormente.
- Detener la reacción sumergiendo en TE (pH 8).

d) Montar: para su visualización al microscopio.

- Fijar en paraformaldehído al 4%, sin agitación.
- Lavar 3 veces con TE
- Lavar con agua.
- Realizar deshidrataciones seriadas: Etanol al 70%, 95% y 100%, durante 1 minuto en cada. Después 2 pasos por xileno, 10 min cada.

-Montar en medio DPX, colocando un cubreobjetos con cuidado de no introducir burbujas.

8. Análisis de proteínas

Todos los procedimientos de obtención de extractos y lisis se realizaron a 4°C. La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el kit *BCA protein assay* (Pierce, Thermo-Scientific).

8.1 Preparación de extractos proteicos totales a partir de células de mamífero en cultivo

Para la obtención de extractos proteicos de a partir de células en cultivos, éstas se recogieron mediante raspado en tampón PBS. En los casos en los que se usaron pocillos de 35 mm o menores (placas de 12 pocillos), las células se levantaron mediante tripsinización (adición de tripsina, incubación durante 1-3 min a 37°C, e inactivación con medio con suero). Posteriormente se centrifugaron (1000g, 5 min, 4°C) y lavaron con PBS frío. El precipitado celular resultante se resuspendió en tampón de lisis (HEPES KOH 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 al 1%, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche)), y se incubó durante 30 min a 4°C. Posteriormente el lisado se clarificó mediante centrifugación (15000 g, 20 min, 4°C), pasando el sobrenadante a tubo nuevo.

8.2 Detección de la proteína SMYD4 en tejidos humanos

Con el fin de caracterizar la expresión tisular de la proteína SMYD4 en tejidos humanos, se empleó la membrana comercial *Human normal tissue Blot II* (#1522, ProSci, suministrada por Abynek), empleando el anticuerpo anti SMYD4 (Novus biologicals) y siguiendo las instrucciones del fabricante (ProSci) para su análisis mediante WB.

8.3 Preparación de extractos proteicos a partir de tejidos de ratón

Los tejidos de ratón adulto fueron homogeneizados en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 0,5 mM, EDTA 5mM, Triton X-100 1%, DTT 1 mM, NaF 50 mM, Na₂VO₃ 1 mM, PMSF 0,1 mM y suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche)) usando un homogeneizador de tipo *polytron*. Antes de la homogeneización con el *polytron*, los tejidos más fibrosos, como músculo esquelético y cardíaco fueron pulverizados en nitrógeno líquido con mortero. Los homogeneizados procedentes de nervio ciático y de DRG fueron sonicados (5 ciclos de pulsos de 10 seg de sonicación (5 microns) con 50 seg de separación entre pulsos) en hielo. Los homogeneizados se clarificaron mediante centrifugación (15000 g, 15 min, 4°C). Los lisados se resolvieron mediante SDS-PAGE y WB.

8.4 Preparación de extractos proteicos por fraccionamiento subcelular

Para separar las fracciones nuclear y citoplasmáticas, se llevó a cabo el fraccionamiento subcelular siguiendo el método REAP (acrónimo en inglés de *Rapid, Efficient And Practical*) descrito por Suzuki y colaboradores (Suzuki et al., 2010). Brevemente, las células se recofieron mediante raspado en PBS frío, se centrifugaron (mediante *spin* de 10 seg en centrífuga de mesa tipo *Eppendorf table top microfuge*), se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en NP-40 al 0,1% en PBS usando micropipeta p1000 con punta cortada. Se separó una fracción del lisado, correspondiente al lisado total (TCL)

y se le añadió tampón de carga de proteínas. El resto del lisado se centrifugó (*spin* de 10 seg), y se separó una alícuota del sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática, a la que se le añadió tampón de carga de proteínas. Se eliminó el resto del sobrenadante, el precipitado se resuspendió en NP-40 al 0,1% en PBS y se centrifugó (*spin* de 10 seg). Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado, correspondiente a la fracción nuclear, se resuspendió directamente en tampón de carga. A continuación las fracciones que contienen DNA, TCL y nuclear, se sonicaron (2 pulsos de 5 seg). Los extractos de las diferentes fracciones obtenidas se hirvieron para su desnaturalización y se cargaron en geles de SDS-PAGE para su análisis mediante WB. Se utilizó la proteína alfa Tubulina como marcador citoplasmático y la proteína Lamina A/C como marcador nuclear.

8.5 Electroforesis, transferencia e inmunodetección mediante Western Blot

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE usando geles de diferentes porcentajes de poliacrilamida (8-12,5 %). Las muestras se diluyeron en tampón de carga de proteínas (Tris HCl 45 mM pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01 %, SDS 1 %, DTT 50 mM) y se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C, antes de ser cargadas en un sistema electroforético Miniprotean Electrophoresis System (BioRad). La electroforesis se realizó a 100 voltios constantes y en un tampón compuesto por glicina 0,192 M, Tris 25 mM, SDS 0,1%. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF durante 2 h a 100 voltios constantes a 4°C, y en tampón compuesto por glicina 0,192 M, Tris 25 mM y metanol 20%. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau S, con el fin de comprobar la eficacia de la transferencia. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) y seguidamente se incubaron en tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T), durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios específicos correspondientes disueltos en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras 4 lavados de 10 min con TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Finalmente, las proteínas se detectaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Biosciences). La imagen se obtuvo mediante revelado de película fotográfica o mediante un lector electrónico LAS-3000 (FUJIFILM), y la densitometría se analizó con el programa IMAGE J. Todos los anticuerpos primarios empleados para la inmunodetección de las proteínas se detallan en la Tabla M8.

8.6 Estudios de interacción de proteínas mediante ensayo de coimmunoprecipitación

Las células sembradas en placas de 10 cm, fueron transfectadas con las construcciones de interés a estudiar y tras 24-48h de expresión post-transfección, fueron procesadas. Las células se lavaron con PBS se recogieron por rascado en PBS y se lisaron en 200 µL de tampón de lisis (HEPES KOH 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 al 1%, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche)) y en las condiciones anteriormente detalladas. Tras clarificar el lisado, se tomaron alícuotas de 50 µL para analizar por WB el lisado celular total (TCL, acrónimo en inglés). Para la inmunoprecipitación, al resto del lisado se le añadió tampón de lisis hasta completar un volumen final de 200 µL y se le añadió el anticuerpo frente a la proteína/etiqueta que se quería inmunoprecipitar. La mezcla de lisado con el anticuerpo se incubó con rotación en noria durante 4 h a 4°C. Para la inmunoprecipitación se usaron 50 µL de bolas de sefarosa recubiertas con proteína G (GE Healthcare). Antes de su uso, las bolas se lavaron al menos

3 veces con tampón de lavado (HEPES KOH 10 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Tritón X-100 0,2%), durante 5-10 min en noria a 4°C cada lavado, centrifugando 1 min a 1000 g a 4°C tras cada lavado para eliminar el sobrenadante. Tras los lavados, se añadió la mezcla de proteínas y anticuerpo a las bolas y se incubó toda la noche a 4°C con rotación en noria.

Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla, se eliminó el sobrenadante y se lavó el inmunoprecipitado con tampón de lavado frío al menos 3 veces (5-10 min cada lavado, con rotación en noria a 4°C). Finalmente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con tampón de carga de proteínas 2x (Tris HCl 90 mM pH 6.8, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02 %, SDS 2 %, DTT 100 mM) y se hirvió durante 5 min antes de cargar las muestra en un gel SDS-PAGE para su análisis mediante WB.

8.7 Búsqueda de interactores mediante inmunoprecipitación seguido de cromatografía líquida y espectrometría de masas

La identificación de posibles interactores de SMYD4, se realizó mediante inmunoprecipitación y secuenciación. Para ello, se sembraron células SH-SY5Y en placas de 15 cm y se transfectaron con SMYD4-GFP. Como control se usaron células transfectadas con el vector vacío. Tras 24 h de expresión post-transfección, se lavaron las células con PBS frío y se recogieron mediante rascado. Se lisaron en 250 µL de tampón de lisis (HEPES KOH 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 al 1%, suplementado con inhibidores de proteasas (Roche)) como se ha explicado anteriormente. Después de lavar las bolas de sefarosa recubiertas con proteína G (lavados con Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,2 %), se realizó una preincubación del lisado con las bolas de sefarosa para eliminar uniones inespecíficas (30 min a 4°C). Tras esta preincubación, se centrifugó (1 min a 1000 g a 4°C) y el sobrenadante (lisado sin bolas de sefarosa) se pasó a tubo nuevo. Se añadió el anticuerpo anti-GFP (1:200) y se incubó a 4°C durante 4 h en agitación. Tras ese tiempo de incubación, se añadieron nuevas bolas de sefarosa prelavadas y se dejó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se centrifugó la mezcla, se eliminó el sobrenadante y se lavó el inmunoprecipitado con tampón de lavado frío al menos 3 veces (5-10 min cada lavado, con rotación en noria a 4°C). Finalmente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con tampón de carga de proteínas y se desnaturalizaron las muestras (100°C, 5 min).

Los inmunoprecipitados se resolvieron en gel SDS-PAGE de acrilamida al 10%. Una vez finalizada la carrera, se realizó tinción con azul de Coomassie (Biorad). A partir de aquí, las muestras fueron procesadas por el servicio de Proteómica de la Universitat de València para su análisis mediante cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

La identificación de proteínas se hizo usando el *software* MASCOT (Matrix-Science). Se realizaron búsquedas en NCBIInr, considerando digestiones trípticas y permitiendo 1 corte perdido. Se consideró la carbamidometilación en cisteínas como una modificación fija y oxidación de las metioninas y desamidaciones de Asn y Gln como modificaciones variables.

A continuación se detalla el criterio seguido para la identificación de posibles interactores de SMYD4. De los listados de proteínas solo se consideraron aquellas proteínas identificadas con un *unused score* mayor que 1,3 (equivale a una confianza > 95%). Se llevaron a cabo 2 réplicas experimentales. Se consideraron una serie de criterios seguidos en la identificación de interactores de otras proteínas SMYD (Abu-Farha et al.,

2011). Se consideraron como interactores aquellas proteínas identificadas en la condición con SMYD4 sobreexpresada y ausente en la condición control. Además, se rescataron como posibles proteínas interactoras aquellas que tuvieran al menos 3 veces más de péptidos en la condición con sobreexpresión de SMYD4 que en la condición control. Además, para que una proteína se mantuviera en la lista de interactores, debía aparecer como interacto en las dos réplicas experimentales.

9. Microscopía

En este apartado se recogen los diferentes protocolos seguidos para la preparación de las muestras para su observación y análisis mediante microscopía.

9.1 Microscopía de campo claro

9.1.1 Análisis de fenotipos externos en individuos adultos de *D. melanogaster*

En el caso de fenotipos externos (visualización del *notum*, esternopleura, tamaño o pigmentación de los ojos) en *D. melanogaster*, las moscas se anestesiaron y diseccionaron para su visualización bajo una lupa tipo Olympus SZ60 stereomicroscope (Olympus, Tokyo, Japan) al que se le acopló una cámara Scopetek MDC200 Digital Camera (Hangzhou Scopetek Opto-Electric Co., Hangzhou, China). El área de la retina o del ala de moscas adultas se midió empleando la herramienta de selección *Polygon* del programa ImageJ 1.47v software (NIH, Bethesda, MA, USA), a partir de al menos 10 individuos del mismo sexo y edad para cada genotipo. Los estudios estadísticos así como la generación de los gráficos procedentes de estos estudios se obtuvieron empleando GraphPad Prism 5.0.

9.1.2 Preparación de cutículas de individuos adultos de *D. melanogaster* para su visualización al microscopio

La composición de los medios empleados se describe en el Anexo III. Las moscas adultas de interés fueron recogidas y preservadas en medio SH. Para su procesamiento, las moscas se lavaron en etanol 100%, posteriormente se lavaron con agua y se pasaron a pocillos con agua para llevar a cabo su disección. Las partes diseccionadas (cabeza, tórax y abdomen), se calentaron en NaOH 1 M durante 10 min a 65°C. Posteriormente se lavaron con agua, se transfirieron a medio de Hoyer y se incubaron de nuevo durante 10 min a 65°C. Una vez transcurrido este tiempo, se pasaron a pocillos de disección con medio de Hoyer para completar la disección, separando las patas junto con pleura por un lado, y las alas junto con el *notum* por otro. El montaje de las muestras en portaobjetos se llevó a cabo sobre gotas de medio de Hoyer. Se cubrió con un cubreobjetos, evitando la presencia de burbujas. Se dejaron los portaobjetos con un peso encima y sobre una placa calefactora durante unas horas. Posteriormente, se apagó la placa calefactora, manteniendo el peso sobre las preparaciones, y se dejó durante toda la noche. Finalmente las muestras se visualizaron en microscopio Leica DM6000.

9.1.3 Análisis microscópico de la estructura de la retina en ojo adulto

Este protocolo se realizó siguiendo las instrucciones descritas por Tomlinson y Ready (Tomlinson and Ready, 1987), con ligeras modificaciones. Básicamente consiste en:

- Dormir las moscas y cortar la cabeza. Mediante disección con bisturí, quitamos uno de los ojos. De esta manera facilitamos la entrada del fijador. Transferir la cabeza a un tubo con glutaraldehído 2% y paraformaldehído 2%, en tampón fosfato 0,1 M recién preparado. Dejar a temperatura mientras se van preparando el resto de cabezas.
 - Fijar durante al menos 2h.
 - Transcurrido este tiempo, añadir un volumen equivalente de tetraóxido de osmio (Polysciences) al 2% preparado en tampón fosfato 0,1 M, e incubar en hielo durante 30 min.
 - Eliminar la mezcla de glutaraldehído, paraformaldehído y tetraóxido de osmio, y sustituir por tetraóxido de osmio al 2%. Incubar en hielo durante 2 h.
 - Eliminar la solución de osmio y proceder con la deshidratación del tejido, aplicando una serie de etanol a concentraciones crecientes. Concretamente se realizan lavados de 5 min con etanol al 30%-50%-70% (los tres en hielo) y, a continuación, con etanol al 90%-100%-100% (a temperatura ambiente).
 - Hacer dos lavados con óxido de propileno de 10 min cada uno.
 - Eliminar el óxido de propileno y añadir una mezcla de óxido de propileno y resina (1:1). Incubar a temperatura ambiente toda la noche.
 - Sustituir la mezcla de óxido de propileno y resina por resina, e incubar a temperatura ambiente durante al menos 4 h.
 - Transcurrido este tiempo, colocar las cabezas en los moldes (Polysciences) a los que previamente se les ha añadido resina. Rellenar totalmente los moldes con resina nueva y orientar las cabezas intentando que el ojo quede orientado hacia el lateral del borde, para poder hacer posteriormente cortes tangenciales.
 - Incubar a 70°C en un horno durante toda la noche para que la resina polimerice.
 - Desmoldar y preparar los ojos, eliminando el máximo de resina posible alrededor del ojo con una cuchilla para posteriormente hacer secciones tangenciales semifinas de 1.5 µm en un ultramicrotomo con cuchilla de diamante.
- Los cortes en el ultramicrotomo y el montaje para su visualización al microscopio óptico fueron realizados por el Servicio de microscopía electrónica del CIPF.

9.2 Microscopía de fluorescencia

9.2.1 Inmunofluorescencia en células en cultivo

Las células se cultivaron en placas de 35 mm sobre cubres de vidrio. Tras ser transfectadas con los plásmidos de interés, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a TA, seguido de 3 lavados con PBS. Las células fijadas, tras ser permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 15 min. En algunos casos, tras la fijación con PFA 4%, se procedió a un tratamiento con metanol frío (-20°C) durante 10 min a TA, produciendo una fijación adicional y permeabilizando las células.

Las células fijadas y permeabilizadas se incubaron con tampón de bloqueo (suero de caballo al 5% o superbloqueo (5% de leche desnatada, 10 % de FBS, 0,5 % de BSA en PBS)) durante al menos 1 h a TA, y finalmente con los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los diferentes anticuerpos primarios y sus características se describen en la Tabla M6. Al día siguiente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados con los fluoróforos Alexa Fluor 488, 546 ó 633 (Invitrogen). Los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 h a TA en oscuridad. Tras sucesivos lavados con PBS, las muestras se montaron con Fluoromont-G (Southern Biotech) o en DAPI Fluoromount-G (si se quería visualizar

los núcleos marcados con DAPI) y las imágenes se tomaron en el microscopio Leica TCS SP Confocal System. La detección de proteínas de fusión con GFP se realizó sin anticuerpo, debido a la capacidad de la misma proteína GFP de emitir fluorescencia.

9.2.2 Análisis subcelular de SMYD4 WT y p. K82E mediante microscopía de fluorescencia

Para comparar la localización subcelular entre la proteína SMYD4 WT y la forma mutante p.K82E mediante microscopía de fluorescencia, se siguió el procedimiento empleado por Donlin y colaboradores (Donlin et al., 2012), en el que estudiaron la localización subcelular de proteínas KMTs, incluyendo las proteínas de la familia SMYD. Para ello, se transfectaron las células con las construcciones de SMYD4 WT o p.K82E fusionadas a GFP, se fijaron, se marcaron los núcleos con DAPI y se prepararon las muestras para su visualización al microscopio confocal. Mediante Image J, se substrajo la señal de fluorescencia correspondiente a la localización nuclear, para poder representar el % de localización citoplasmática, calculado como la intensidad media de la señal de GFP presente en el citoplasma dividido por la señal total (señal citoplasma y núcleo) y multiplicado por 100.

9.2.3 Preparación de tejidos *D. melanogaster* para su análisis mediante microscopía de fluorescencia

9.2.3.1 Montaje de tejido muscular de larva

Larvas de mosca fueron diseccionadas para exponer el tejido muscular en pocillos con PBS. Las muestras se fijaron con PFA 4% en PBS en agitación durante 10 min a TA. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBT. Se incubó con faloidina marcada con rodamina (diluido 1:100 en PBT) durante 1 h a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBT (15 min cada) a TA, se incubó con DAPI (diluido 1:1000 en PBT) durante 10 min a TA, se realizaron 3 lavados con PBT y se montaron las muestras en medio Aqua Polymount (Polysciences Inc.).

9.2.3.2 Preparación de tórax de individuos adultos para inmunodetección de criosecciones en microscopio confocal

El protocolo seguido está basado en el empleado por Llamusi y colaboradores (Llamusi et al., 2013), con algunas modificaciones. Moscas anestesiadas fueron diseccionadas bajo la lupa, eliminando cabeza, alas, abdomen y patas. Para la fijación del tórax, se incubó con PFA 4 %, Triton X-100 0,1% toda la noche a 4°C con agitación suave. Pasado ese tiempo, se eliminó el fijador, y se crioprotegió el tejido mediante incubación en sacarosa al 30% en agitación durante 48 h a 4°C. Posteriormente se embebió en OCT y se congeló el bloque a -80°C. Se realizaron secciones de 16 µm del eje antero-posterior con un criostato. Las muestras se colocaron en portaobjetos de tipo superfrost y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para realizar la inmunotinción, primeramente los portaobjetos con los cortes se dejaron atemperar a TA durante 10 min. Se lavaron los cortes 2 veces con PBS para eliminar el OCT, y luego con PBT. Se trató con tampón de bloqueo (BSA 5%, Triton X-100 0,3% en PBS) durante 45 min a TA. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario diluido PBT y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las muestras 3 veces con PBT (5-10 min cada lavado), se añadió el anticuerpo secundario y se incubó durante 2 h a TA. A continuación se realizaron lavados con PBT y se incubó con faloidina marcada con

rodamina (1:100 en PBT) durante 1 h a TA en oscuridad. Pasado ese tiempo, se lavaron 3 veces (10 min cada) con PBT, se incubó con DAPI (1:1000 en PBT durante 10 min), se lavaron con PBS y se montaron con Fluoromount.

9.2.3.3 Preparación de cabezas para inmunodetección de criosecciones en microscopio confocal

Se siguió el protocolo “*cryofixation and immunolabeling of eye sections for confocal microscopy*” descrito en el capítulo de libro elaborado por Misray y Knust (Mishra and Knust, 2013) con algunas modificaciones. Las cabezas de moscas se fijaron con PFA 4 %, Triton X-100 0,1% en PBS durante 30 min a TA en agitación. Se lavaron 3 veces con PBS (15 min cada lavado). Para la criopreservación se realizaron incubaciones en concentraciones crecientes de sacarosa. Primeramente se incubaron con sacarosa al 10 % en PBS durante 2 h en agitación a 4°C. Posteriormente se incubaron en sacarosa al 25 % en PBS durante toda la noche en agitación a 4°C. A continuación se embebieron las cabezas en OCT, varias cabezas por molde, y se congelaron a -80°C. Posteriormente se realizaron cortes de 12 µm con criostato. Las muestras se procesaron para la inmunodetección y su visualización en microscopio confocal como se ha comentado en el punto anterior, con la salvedad de que no se añadió la faloidina.

9.3 Microscopía electrónica

9.3.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM, de sus siglas en inglés)

Para el análisis de la estructura externa de la retina de ojos adultos de *D. melanogaster*, se ha empleado protocolo basado en el método del secado al punto crítico (Wolff, 2000, 2011), para el cual se siguen los siguientes pasos:

- Fijar las moscas en una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 8% en PBS durante 2 h, añadiendo Triton X-100 hasta una concentración final de 0,2% para reducir la tensión superficial y favorecer que las moscas queden completamente sumergidas en el fijador.
- Eliminar el fijador y lavar con agua estéril.
- Deshidratar las moscas mediante incubaciones de 12 h en series crecientes de etanol (una incubación en etanol al 25%, 50% y 75% y dos en etanol absoluto)
- A continuación se procede con el secado al punto crítico y sombreado en una mezcla de oro-paladio, ambos procesados fueron realizados por el Servicio de Microscopía de la Universitat de València.
- Seguidamente, las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido Philips XL-30 ESEM.

9.3.2 Microscopio electrónico de transmisión (TEM, de sus siglas en inglés)

Para llevar a cabo el análisis de la ultraestructura de la retina en ojo adulto mediante TEM, se sigue el mismo procesamiento de las muestras que se ha detallado en el apartado “Análisis microscópico de la estructura de la retina en ojo adulto” anteriormente detallado, pero realizando cortes ultrafinos (80 nm), y tiñiendo con acetato de uranilo por el Servicio de microscopía electrónica del CIPF.

Las muestras de nervio sural de la paciente de la familia fCMT-408 se obtuvieron en el Servicio de Neurología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y se procesaron siguiendo el protocolo habitual (Sevilla et al., 2003) por el Servicio de Patología de ese mismo

hospital. Se prepararon secciones semifinas teñidas con azul de toluidina para su evaluación con un microscopio de luz visible. Para evaluar su ultraestructura, se prepararon y procesaron secciones ultrafinas por el Servicio de microscopía electrónica del CIPF para su análisis. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai Spirit G2.

10. Ensayos funcionales

10.1 Tratamientos celulares

10.1.1 Efecto de la geldanamicina sobre los niveles proteicos de SMYD4

Para comprobar el efecto de la inhibición de HSP90 sobre los niveles proteicos de SMYD4, se empleó la geldanamicina (GA) como inhibidor específico de la HSP90 (García-Carbonero et al., 2013). Para ello se sembraron células SH-SY5Y en pocillos de 35 mm y se trataron con GA 1 μ M durante 2 h, o con GA 0,1 μ M durante 18 h. Como control del tratamiento se usó DMSO, ya que la GA está diluida en ese solvente. Pasado el tiempo de tratamiento, las células se recogieron, se lisaron y se analizaron los niveles de SMYD4 mediante WB.

10.1.2 Efecto de la thapsigarguina sobre la expresión de *GDAP1* y *JPH1*

Se analizó el efecto del estrés del retículo endoplasmático, inducido mediante tratamientos prolongados con thapsigarguina (TG), sobre los niveles de expresión de JPH1 y GDAP1. La TG es un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático (SERCA) (Thastrup et al., 1990, Lytton et al., 1991), que provoca un vaciado de calcio del retículo y un incremento en los niveles intracitosólicos de calcio; todo ello acaba causando la generación de estrés de retículo (Price et al., 1992).

Las células SH-SY5Y se trataron con TG 0,1 μ M durante 2 h y durante 18 h. Como control se trataron las células con DMSO durante los mismos períodos de tiempos. Tras el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y recogidas con un rascador. Las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se congeló inmediatamente el precipitado celular con nitrógeno líquido o hielo seco. Las muestras se procesaron como se ha explicado anteriormente para su análisis mediante qRT-PCR. Cada qRT-PCR se realizó por triplicado (réplica de la técnica), y cada experimento se repitió 3 veces independientes (réplica biológica).

10.2 Ensayos de tipo luciferasa

10.2.1 Estudios de represión transcripcional mediante ensayo luciferasa

Se llevaron a cabo estudios de luciferasa para determinar la posible represión transcripcional debida a SMYD4, y para comprobar el efecto de la mutación SMYD4 p.K82E sobre dicha función. Empleamos un sistema en el que la expresión del gen reportero luciferasa es activada por la proteína de fusión LexA-VP16, que contiene el sitio de unión a DNA de LexA unido al dominio activador de la proteína coactivadora vírica VP16. Se ha empleado este sistema para determinar la represión transcripcional de diversas proteínas (Showalter et al., 2002), pero también proteínas SMYD (Gottlieb et al., 2002). En el sistema transcripcional utilizado, en el plásmido pL8G5-Luc antes de la *ORF* de la luciferasa hay 8 sitios de unión a LexA, donde se unirá el activador transcripcional

VP-16 fusionado a LexA, y 5 sitios de unión a GAL4, donde se unirá la proteína GAL4 o las proteínas de fusión con GAL4 (Gal4-SMYD4 WT o p.K82E). Como controles se emplearon el vector pL8-Luc, que carece de sitios de unión a Gal4, y condiciones en las que no se transfectaba con el activador transcripcional. En la Figura M10 se muestra un esquema con los vectores luciferasa empleados.

Para el experimento, se sembraron células HeLa en pocillos de placas de tipo p24. En cada pocillo se transfectaron con Lipofectamina 2000 las diferentes construcciones: LexA-VP16 (125 ng), pL8G5 (150 ng), GAL4-SMYD4 WT o p.K82E (200 ng), pRL-TK (25 ng), manteniendo constante la cantidad total de plásmido a transfectar (500 ng), usando para ello vector vacío pGAL4 cuando fuera necesario. A las 24h de expresión post-transfección se determinaron los niveles de expresión del reportero luciferasa usando el *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). La señal correspondiente a los niveles de la luciferasa fueron normalizados frente a la señal de renilla, expresada por el vector pRL-TK. Las mediciones se realizaron en placas multipocillos opacas en un luminómetro *Wallac Victor TM Multilabel Counter* (Perkin Elmer)

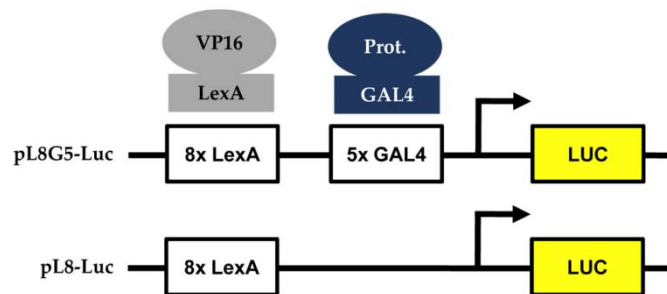


Figura M10. Esquema de los plásmidos reporteros empleados para el ensayo de represión transcripcional.

10.2.2 Análisis de variantes en región 3'-UTR mediante ensayo luciferasa

Para estudiar las consecuencias funcionales de cambios nucleotídicos identificados en la región 3'-UTR del gen *JPH1* sobre los niveles de expresión, se llevaron a cabo ensayos luciferasa siguiendo el procedimiento establecido por Liang y colaboradores (Liang et al., 2011). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos conteniendo 3 copias en tándem de 17 pb que incluyen la variante a estudiar y su entorno (8 pb a cada lado). En el diseño de los oligonucleótidos se introdujeron los sitios de restricción SpeI y MluI para su clonación, y un sitio BamHI para facilitar el rastreo de clones positivos para la inserción durante el proceso de clonación. En el Anexo VIII se listan los oligonucleótidos empleados. Para generar cada construcción, se incubaron los dos oligonucleótidos correspondientes a las dos hebras complementarias permitiendo su hibridación. Se incubaron 3 min a 90°C y después 30 min a 37°C. Las construcciones se clonaron en los sitios SpeI/MluI del sitio de clonación múltiple localizado en la región 3'-UTR del constructo de la luciferasa del vector pMIR. La identificación de clones positivos se realizó mediante cribado por digestión con la enzima BamHI, y se confirmaron mediante secuenciación directa. De cada variante/SNP se generaron 2 construcciones correspondientes a los 2 alelos (el de mayor y el de menor frecuencia). En la Figura M11 se muestra un esquema de las construcciones generadas.

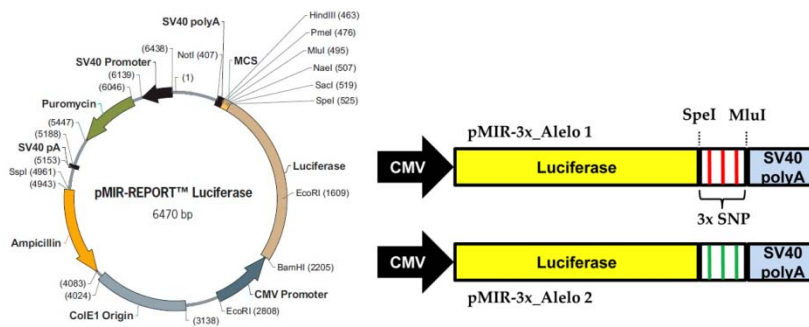


Figura M11. Esquema del vector pMIR y de las construcciones generadas para el estudio funcional de las variantes identificadas en regiones 3'-UTR.

El estudio funcional se realizó mediante ensayo luciferasa. Para ello, se sembraron células SH-SY5Y en pocillos de placas de tipo p24 y se transfectaron mediante Lipofectamina 2000 (Life Technologies) con las construcciones de pMIR (500 ng/pocillo) y con el vector pRL-TK (50 ng/pocillo), que expresa la proteína renila, para normalizar la transfección. Las mediciones de luciferasa se hicieron como se ha indicado en el punto anterior (empleando el kit Promega y el luminómetro). La señal correspondiente a los niveles de la luciferasa fueron normalizados frente a la señal de renila. Los resultados se relativizaron frente a los niveles normalizados del alelo de mayor frecuencia, y se expresaron como media \pm SEM. Cada experimento se repitió al menos 3 veces independientes, y en cada experimento se realizaron 3 réplicas correspondientes a diferentes transfecciones.

10.3 Minigenes

Para estudiar los posible efectos de variantes nucleotídicas candidatas a alterar el *splicing*, se llevaron a cabo ensayos funcionales mediante minigenes, siguiendo un procedimiento análogo al empleado por Aparisi y colaboradores (Aparisi et al., 2013). El fragmento de interés (WT o con la mutación), formado por el exón e intrones adyacentes, es clonado entre los dos exones SA y SD del vector de expresión pSPL3. Posteriormente, se transfecta en células de mamífero y se comprueba el procesamiento del mRNA generado, determinando si la variante estudiada afecta al *splicing*.

A partir del gDNA del paciente ID 854 con el cambio a estudiar en *JPH1*, se amplificó el exón 2 de *JPH1* y parte de los regiones intrónicas flanqueantes usando los oligonucleótidos Ex2-JPH1_EcoRI y Ex2-JPH1_EcoRV. El producto de PCR fue purificado y digerido con EcoRI/EcoRV. El vector pSPL3 fue primeramente digerido con la enzima NheI, generando un extremo 5'-sobresaliente que se posteriormente rellenó usando la enzima Klenow (Roche) para convertirlo en un extremo romo. A continuación el vector se purificó y se digirió con la enzima EcoRI, lo que liberó un fragmento no deseado del vector, y el resto se empleó para clonar el inserto mediante ligación de los extremos EcoRI/EcoRI cohesivos y EcoRV/NheI-rellenado romos. Las construcciones se secuenciaron (oligonucleótidos pSPL3seq F y R) para confirmar las clonaciones del alelo WT y del alelo mutante. En el Anexo IX se recogen los oligonucleótidos empleados para generar las construcciones, así como el resto de oligonucleótidos empleados a lo largo del ensayo. En la Figura M12, se esquematiza la construcción generada para el ensayo.

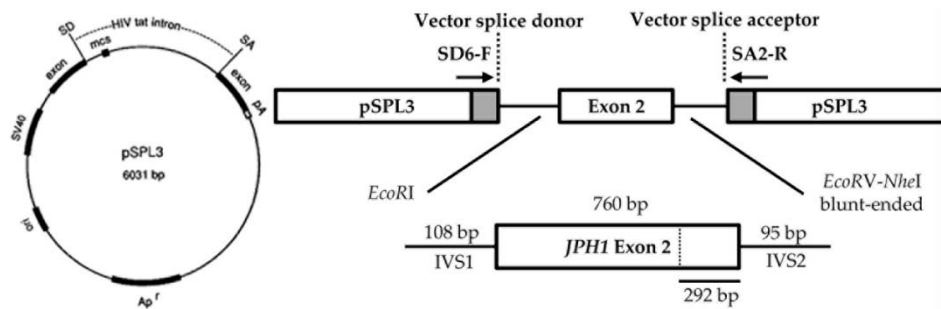


Figura M12. Esquema del vector pSPL3 y de la construcción generada para el ensayo de minigenes.

Para la realización del ensayo de minigenes, se sembraron células HeLa en pocillos de 35 mm, se transfectaron con el vector pSPL3 vacío o con las construcciones generadas (2 μ g de plásmido/pocillo) y tras 24 h de expresión post-transfección, se extrajo el RNA, y se usó de molde para generar cDNA. Usando los oligonucleótidos SD6-F y SA2-R, se amplificaron los diferentes productos del *splicing*. Para su análisis, los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5-2%. Para confirmar los productos obtenidos, se purificaron y secuenciaron mediante secuenciación directa.

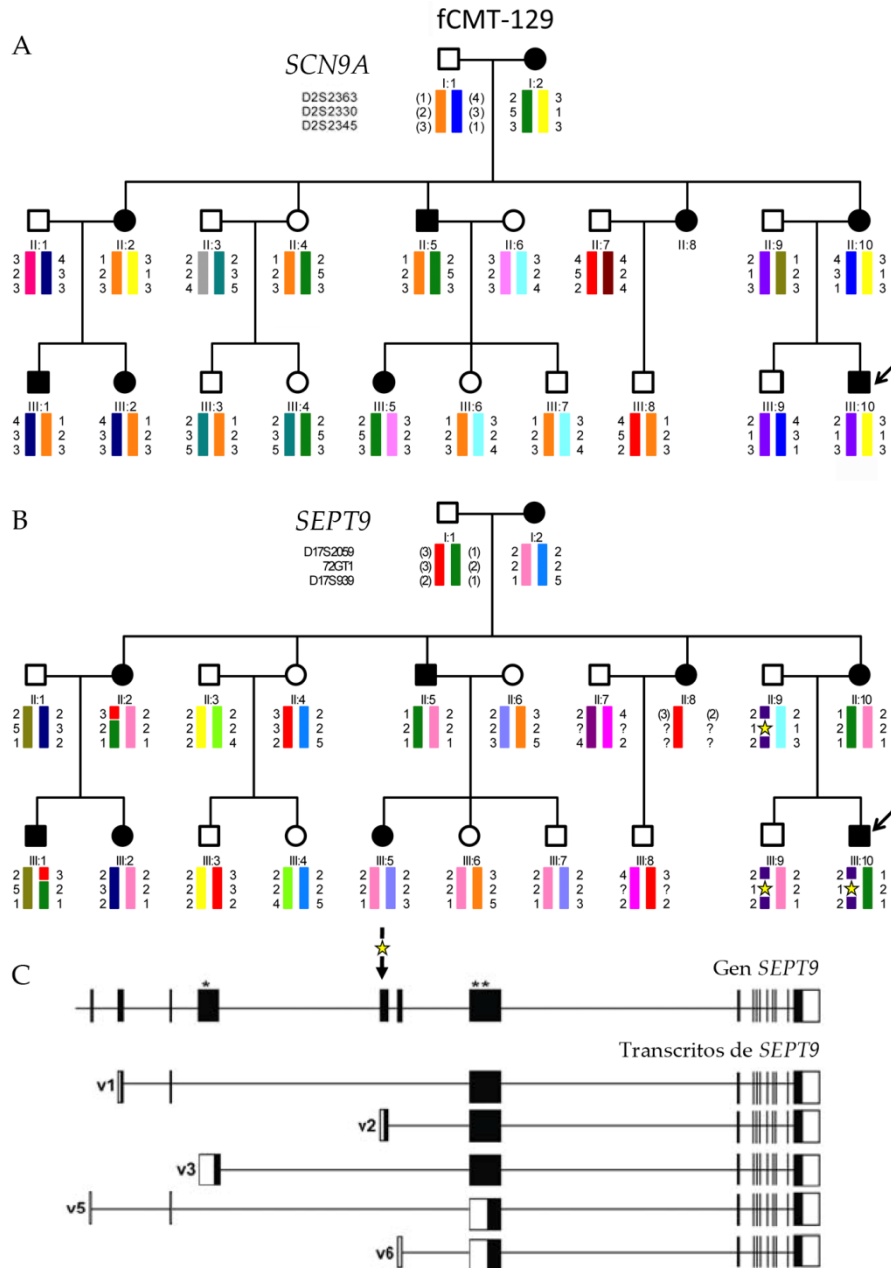
10.4 Medidas de calcio citosólico

Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Dr. D. Pla. Las variaciones en los niveles de calcio citosólico en la células se midieron utilizando la sonda Fura-2 AM (Molecular Probes, Invitrogen), siguiendo lo descrito por Ruiz y colaboradores (Ruiz et al., 1998). La sonda Fura-2 AM permanece en el citosol celular y es capaz de unir calcio de forma reversible. La sonda emite fluorescencia al ser excitada a distintas longitudes de onda (λ) dependiendo de si está libre o unida a calcio. De esta forma se pueden establecer los niveles citosólicos de calcio como el cociente de la fluorescencia emitida a 510 nm al excitar alternativamente a 340 nm (λ de excitación de la sonda unida a calcio) y a 380 nm (λ de excitación de la sonda libre).

Las células se sembraron en cubres de vidrio de 24 mm y se transfectaron con los plásmido de interés. Para marcar las células con la sonda Fura-2 AM, las células se incubaron con tampón HCSS (NaCl 120 mM, MgCl₂ 0,8 mM, HEPES 25 mM y KCl 5,4 mM, pH 7) suplementado con D-Glucosa 30 mM, Fura-2 AM 5 μ M y ácido plurónico 0,06% (p/v) durante 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron durante 30 min con tampón HCSS suplementado con D-Glucosa 30 mM y CaCl₂ 2 mM. Para analizar el SOCE (del inglés, *Store Operated Calcium Entry*), se provocó la salida de calcio del retículo mediante tratamiento con TG 5 mM en medio HCSS libre de calcio y se indujo el SOCE mediante la adición de CaCl₂ 2 mM. Se seleccionaron regiones de interés conteniendo células transfectadas (GFP positivas en el caso de transfecciones únicas, o GFP y mCherry positivas en el caso de las dobles transfecciones). Como controles se usaron células transfectadas con los vectores vacíos. Para comparar los efectos de las diferentes proteínas, todos los valores se normalizaron al ratio basal. Se realizaron al menos 5 experimentos independientes en los que se analizaron en total más de 50 células transfectadas, usando el programa Metafluor de Leica desarrollado por Metamorph (Universal Imaging).

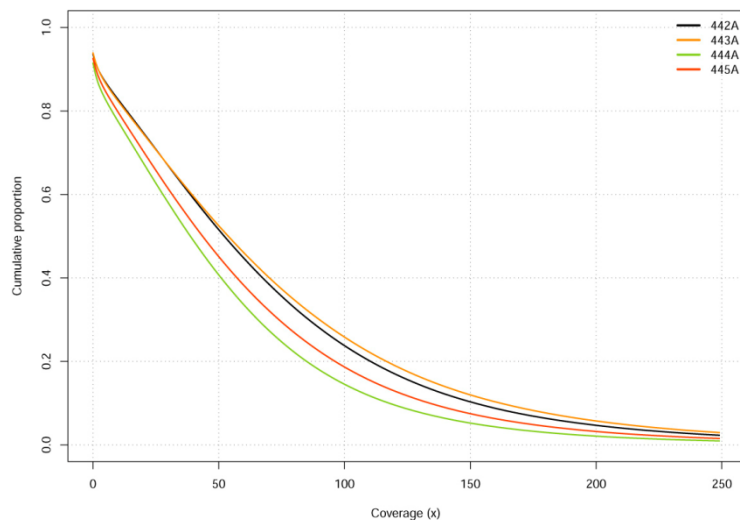
ANEXOS

Anexo 1. Análisis de haplotipo de marcadores microsatélites localizados en el gen *SCN9A* (A) y *SEPT9* (B) en la familia fCMT-129. La estrella (en B y C) señala la mutación novel NM_001113493.1:c.-125C>T identificada en los individuos II:9, III:9 y III:10 en el rastreo mutacional de *SEPT9*. En C se indica la localización de dicha mutación en la región 5'-UTR correspondiente al transcrito v2 (transcrito gamma). Los asteriscos señalan la localización de mutaciones patológicas responsables de HNA (Kuhlenbaumer et al., 2005).



Anexo 3. Datos de cobertura y de alineamiento de las lecturas obtenidos mediante la secuenciación de exoma en la familia fCMT-266

Representación de la cobertura obtenida en las muestras 716 (442A), 718 (443A), 720 (444A) y 722 (445A) de la familia fCMT-266.



Resumen de la estadística de la cobertura en términos del C15 (porcentaje con al menos una cobertura de 15x), así como la media y la mediana obtenida para cada muestra. En la tabla inferior se muestra un resumen del alineamiento de las lecturas obtenido.

	C15	Media	Mediana
Muestra 716 (442A)	79,5645	69,45072047	52
Muestra 718 (443A)	79,2043	73,14991694	53
Muestra 720 (444A)	73,4902	52,70931999	38
Muestra 722 (445A)	75,9245	59,8385211	43

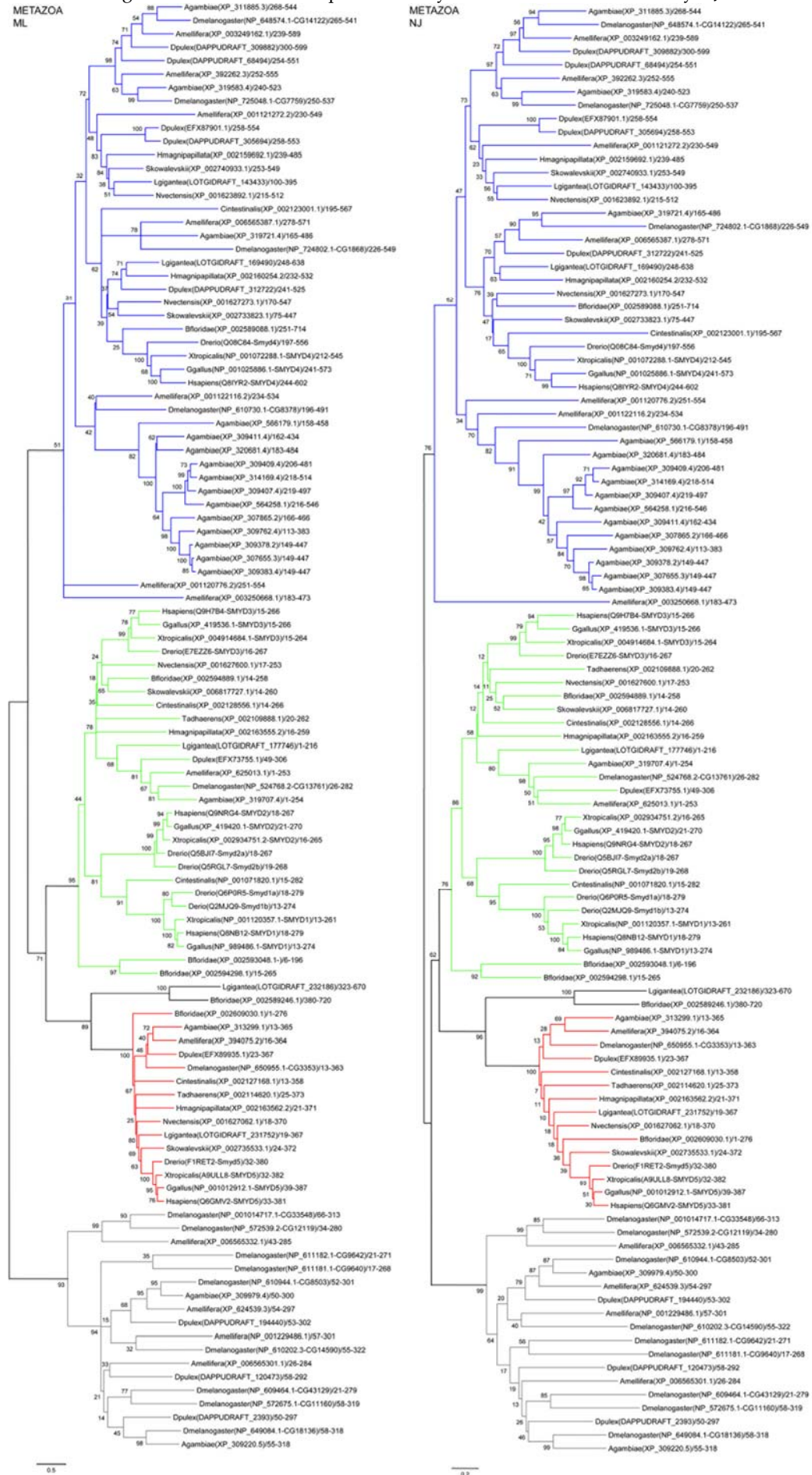
	DNA 716	DNA 718	DNA 720	DNA722
Lecturas alineadas una vez	66551048 (86,2317%)	71840108 (85,402%)	51332410 (85,663%)	57322651 (84,8374%)
Lecturas alineadas múltiples veces	8378693 (10,8565%)	9472509 (11,2607%)	6585451 (10,9897%)	7353560 (10,8833%)
Lecturas no alineadas	716983 (0,929011%)	1085947 (1,29095%)	942980 (1,57364%)	1621941 (2,40047%)
Lecturas ambiguas	1530294 (1,98284%)	1721384 (2,04634%)	1062831 (1,77364%)	1269494 (1,87885%)
Lecturas con alineamiento dividido	37172 (0,0481646%)	39464 (0,046914%)	32230 (0,0537851%)	25154 (0,0372279%)

Anexo 4. Variantes rescatadas mediante análisis exhaustivo de la región chr17:1233635-1874153 (hg19) de los datos de secuenciación de exoma de la familia fCMT-266. En la columna de genotipos se indica la presencia (1) o ausencia (0) del cambio. El símbolo “-” indica que no hay datos de esa región para el individuo indicado, y por tanto esa variante ha sido rescatada por estar en otros individuos estudiados.

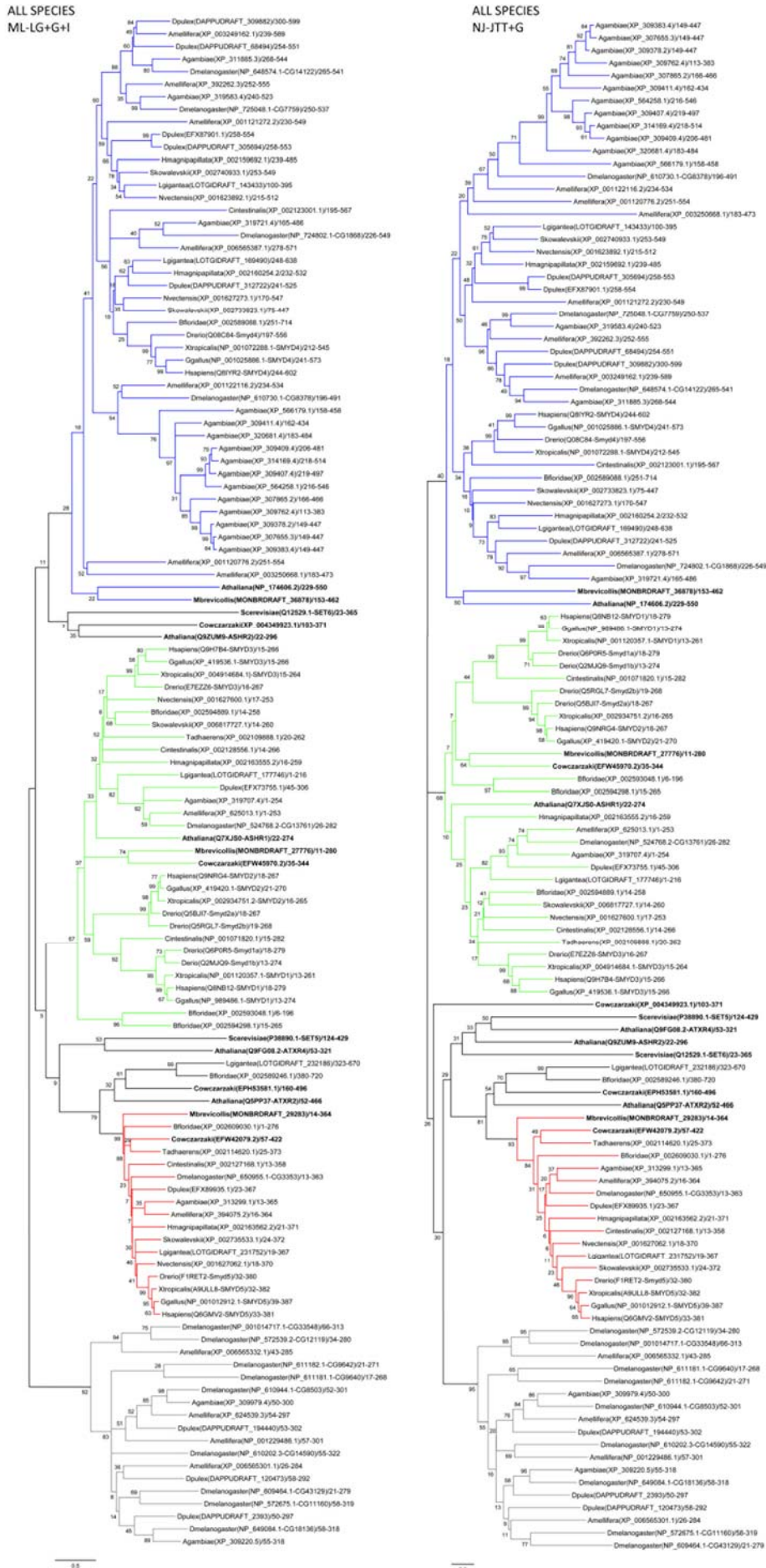
Posición	Cambio	Gen	Efecto	dbSNP/1000g/EVS	BIER	Genotipos
17:1715300-1715300	T/C	<i>SMYD4</i>	SNV no sinónimo	Desconocido	Desconocido	716(0/1), 718(0/1), 720(0/1), 722(0/1)
17:1704296-1704296	C/A	<i>SMYD4</i>	SNV no sinónimo	rs7224496	0,347	716(1/1), 718(0/1), 720(1/1), 722(0/1)
17:1657653-1657653	G/A	<i>SERPINF2</i>	SNV no sinónimo	rs1057335	0,093	716(0/1), 718(1/1), 720(0/1), 722(1/1)
17:1673276-1673276	C/T	<i>SERPINF1</i>	SNV no sinónimo	rs1136287	0,267	716(1/1), 718(0/1), 720(0/1), 722(1/1)
17:1686410-1686410	T/C	<i>SMYD4</i>	SNV no sinónimo	rs9902398	0,387	716(1/1), 718(1/1), 720(1/1), 722(1/1)
17:1412603-1412603	G/T	<i>INPP5K</i>	SNV ganancia STOP	rs20066179	No hay frecuencia asociada	716(-/-), 718(-/-), 720(0/1), 722(0/1)
17:1373518-1373518	T/C	<i>MYO1C</i>	SNV no sinónimo	rs9905106	0,313	716(1/1), 718(1/1), 720(-/-), 722(1/1)
17:1373612-1373612	C/T	<i>MYO1C</i>	SNV no sinónimo	rs8081370	0,193	716(-/-), 718(1/1), 720(1/1), 722(1/1)

Como se puede apreciar, todas las variantes, a excepción de la mutación novel 17:1715300-1715300T>C en *SMYD4*, han sido descritas en bases de datos. Además, todas ellas tienen alta frecuencia en la base de datos de población española, a excepción de la mutación novel en *SMYD4* y la variante en *INPP5K*. (*) La variante en *INPP5K* resultó ser un falso positivo puesto que no se detectó mediante secuenciación Sanger.

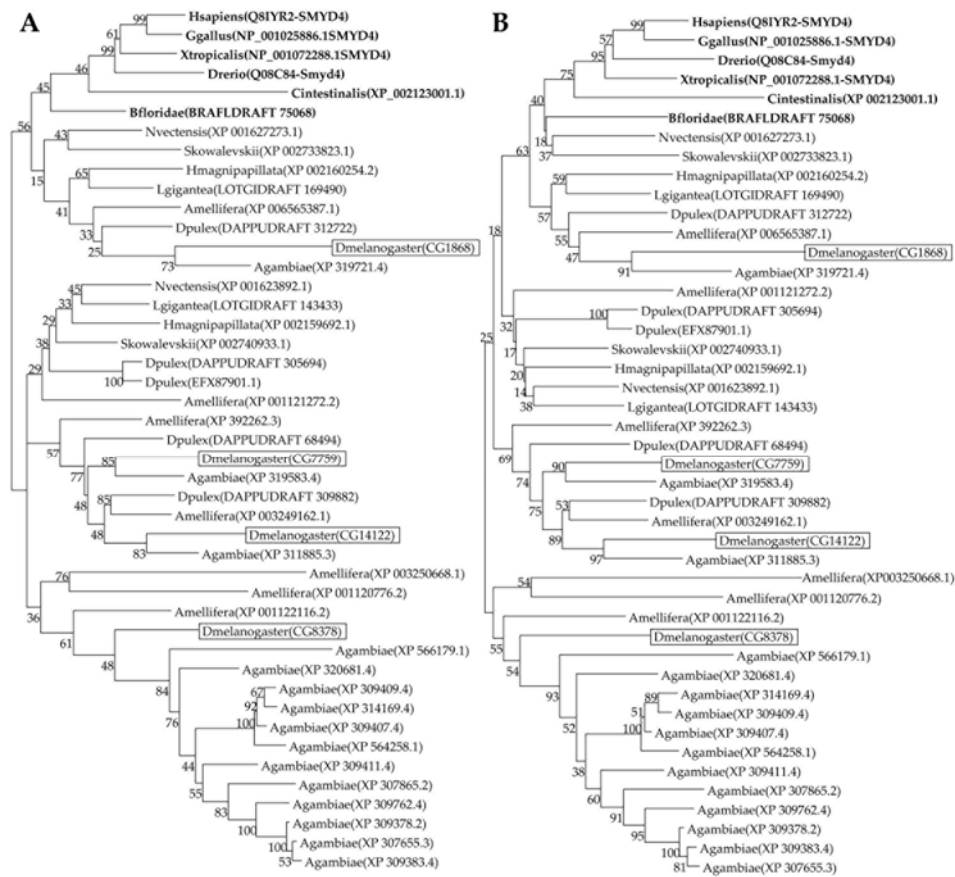
Anexo 5. Análisis filogenético de la familia de proteínas Smyd de animales mediante ML y NJ.



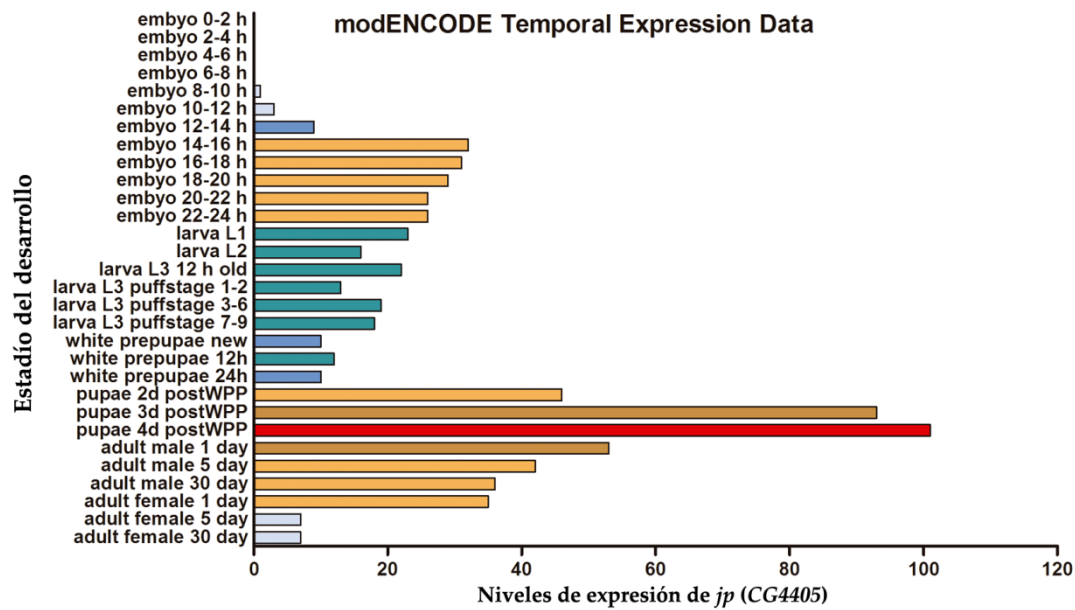
Anexo 6. Como el Anexo 5, pero incluyendo adicionalmente otras secuencias Smyd de especies no animales.



Anexo 7. Análisis filogenético de los miembros del grupo de SMyd4 mediante ML (A) y NJ (B), realizado a partir de regiones conservadas obtenidas mediante GBlocks. Los números sobre las ramas indican el apoyo obtenido mediante *Bootstrap*. Se señalan en recuadros los miembros de SMyd4 de *D. melanogaster* y resaltados en negrita los de cordados.



Anexo 8. Expresión temporal del homólogo de las JPH en *D. melanogaster*. Se muestra el perfil de expresión temporal del gen *Jp* (CG4405) a lo largo del desarrollo obtenido a partir de los datos de expresión contenidos en la base de datos modENCODE disponibles en Flybase (<http://flybase.org/>).

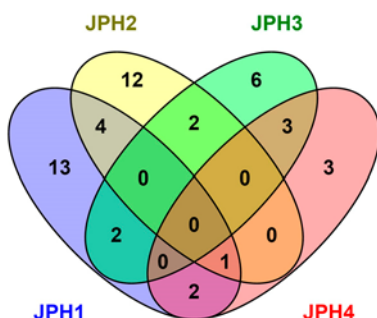


Anexo 9. Longitud de las regiones 3'-UTR de genes *JPH* en especies representativas de mamíferos, vertebrados e invertebrados.

3'-UTR de <i>JPH</i> de mamíferos	<i>H. sapiens</i>	<i>M. mulatta</i>	<i>B. taurus</i>	<i>C. familiaris</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>M. musculus</i>
<i>JPH1</i>	2347 nt	2360 nt	2294 nt	2312 nt	2267 nt	2539 nt
<i>JPH2</i>	1821 nt	1809 nt	1793 nt	1703 nt	1617 nt	1833 nt
<i>JPH3</i>	1495 nt	1489 nt	1402 nt	1445 nt	1358 nt	1604 nt
<i>JPH4</i>	1599 nt	1596 nt	1595 nt	1590 nt	1474 nt	1486 nt
3'-UTR de <i>JPH1</i> de vertebrados	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>X. tropicalis</i>		
<i>JPH1</i>	2347 nt	2539 nt	2368 nt	2187 nt		
3'-UTR de <i>JPH</i> de invertebrados	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>				
<i>Jp</i>	1861 nt	761 nt				

Anexo 10. Identificación de sitios de unión a miRNA conservados en vertebrados en la 3'-UTR de *JPH1* humana mediante TargetScan. En la tabla se muestran aquellos miRNAs que se unen solo a la 3'-UTR en *JPH1* o en común con otras *JPH* humanas. Se resaltan en negrita miRNAs importantes en el sistema nervioso. Se muestra el diagrama de intersección de los sitios de unión a miRNAs conservados en vertebrados de los 4 genes *JPH* en humanos.

<i>JPH1</i>	<i>JPH1, JPH2</i>	<i>JPH1, JPH3</i>	<i>JPH1, JPH4</i>	<i>JPH1, JPH2, JPH4</i>
miR-145	miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907	miR-34ac/34bc-5p/449abc/449c-5p	miR-205/205ab	miR-214/761/3619-5p
miR-21/590-5p	miR-137/137ab	miR-101/101ab	miR-217	
miR-218/218a	miR-27abc/27a-3p			
miR-144	miR-150/5127			
miR-124/124ab/506				
miR-10abc/10a-5p				
miR-141/200a				
miR-146ac/146b-5p				
miR-499-5p				
miR-143/1721/4770				
miR-93/93a/105/106a/291a-3p/294/295/302abcde/372/373/428/519a/520be/520acd-3p/1378/1420ac				
miR-203				
miR-375				



Como prueba de concepto del estudio se muestran los miRNAs predichos que se unen, de entre los cuatro genes *JPH* en humanos, específicamente a la región 3'-UTR de *JPH2*, y que el sitio de unión está conservado a lo largo de vertebrados. Se indica en negrita la identificación de miR-24, el único miRNA validado experimentalmente de unirse a la región 3'-UTR de *JPH2* y que es importante en el desarrollo de ciertas cardiopatías.

JPH2
miR-25/32/92abc/363/363-3p/367
miR-24/24ab/24-3p
miR-96/507/1271
miR-29abcd
miR-133abc
miR-22/22-3p
let-7/98/4458/4500
miR-138/138ab
miR-7/7ab
miR-182
miR-125a-5p/125b-5p/351/670/4319
miR-9/9ab
miR-375

Anexo I. Tabla con los oligonucleótidos empleados para amplificar y secuenciar los genes humanos de interés durante los cribados mutacionales.

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
SEPT9*	SEPT9-1A	CCGGTCGGTGCCTCCAG	GCCGCAGGCACTCAGGTG
SEPT9	SEPT9-2A	CTTCAAGTCACTGGGCGG	CGCAGGCCTCGTCCACAG
SEPT9	SEPT9-3A	TGTTAATCATCCACCCGGAG	CCCAGACCAGAATGAAGGG
SEPT9	SEPT9-1_part1	ACTCATGCGTGTGTGGTAGG	TCCACTTGGAGATGCTTAACTTAG
SEPT9	SEPT9-1_part2	CCCTTAAGCCCAAGGAAATC	TGTTTGTGCTCCAACTGAAG
SEPT9	SEPT9-1_part3	CACTTCGGGCCCTCTCTC	AAATAAAGCCCGAGTCCAG
SEPT9	SEPT9-4A_part1	CCACATCCGCCACATC	CGACATGATGGCTGGTGG
SEPT9	SEPT9-4A_part2	CCTCCCCATTTCATTCAG	ACTCCCGTCTCCCTCAG
SEPT9	SEPT9-5A	GTGATGTGGACAGGCAGC	ACATCCGCTGGCCTCAG
SEPT9	SEPT9-2_part1	AACATGCCGGAGTGTTC	ATGGTGATCTCCGTCTCC
SEPT9	SEPT9-2_part2	ATCTCGTCCAAGCAGGTGG	CAAGATTCTGTGGCAAAGCC
SEPT9	SEPT9-6A	GAGGGGAGAGGAAGAGAC	GGACCATGGAAGGGAGAAG
SEPT9	SEPT9-7A_part1	GCTTCACAAACCTGTGTGG	AACAATGCACACTGGAGCAG
SEPT9	SEPT9-7A_part2	ATGGGCTCAAGTTTCTGGG	CTGTCTTCCCCAAACCCAAC
SEPT9	SEPT9-3	AGGCGCTGTGTGTGAG	AAGACCAAGCCAAAGGC
SEPT9	SEPT9-4	CAGACCCTGTGGTCTCTCC	TGTCAGACTTTTGGTGGAAAAC
SEPT9	SEPT9-5A	GTCAGGTGTGGGGTGTCTG	TCTAGGGCTGACTCTGGGTG
SEPT9	SEPT9-6A	CTGAGTCTGGGAATGCAC	AGTCCAGGGGACAGAGG
SEPT9	SEPT9-7	TGTCGACACCTGCTTGGG	AGGCCTGCAGCGTCTCC
SEPT9	SEPT9-8	ACACCAGTGGGTGGGTAGAG	GCTTAAGTCTCTCAAACCC
SEPT9	SEPT9-9	CCCAGGGGAGGGAATTG	CCACAGGCTCTGGGTCAG
SEPT9	SEPT9-10	CCCTCAGACTCTGCTTTTGG	AGGGGGCACCCACTCTGC
SEPT9	SEPT9-11_part1	ACCCCCACAGGACGCACAT	GCGGCCTCATCTGACT
SEPT9	SEPT9-11_part2	CAGGAAACAAGGAAGGGG	GGGCTTGGAGTGGCTGG
SEPT9	SEPT9-11_part3	CATCACTCAGCCCCTACCC	GCTCACGCCACTCTGACC
SEPT9	SEPT9-11_part4	AGTCTGGTGGAGGAGCTGAG	GACAGAGGGTGGGGGC
SEPT9	SEPT9-11_part5	CAGAGCCCATGGTAACGAAC	TTGGCAAAAACATGGCAAG
SEPT9	SEPT9-11_part6	TGAGTGTGTGTGCATGGAAG	CCGAGGCCCAAAGAACTG
SCN9A**	SCN9A-1	CCTTCTTGGCAGGCAAAT	AAGCCAACAGAACTGACCA
SCN9A	SCN9A-2	AGATGCGTTGATGACATTGG	CCAGAGTCTTTCAAGGTGCAA
SCN9A	SCN9A-3	TTCAAAGAGACAAAATAGTCTACAAGC	CTGGCAGGAAAAGGAAAGG
SCN9A	SCN9A-4	AAGTTATAAGATTTACATGGTGGTTG	ACCCAGAGGTTTGTGTTA
SCN9A	SCN9A-5	GAAGCCCCAACGTAGAAAA	TCTTCTTTCAAAGATCAAAGTCA
SCN9A	SCN9A-6	AGGTTACTTAAGGTCATTGATTTGA	AAAAGAGAGCAATGTTTTAGCA
SCN9A	SCN9A-7	GGACCAGGCCTGAATTTGTA	TGCAAACTGACTGAACATCTTTT
SCN9A	SCN9A-8	TCCCCCTATAGAAGAAACCTTGA	GAGTTTCTCCATTCTCAAATAAA
SCN9A	SCN9A-9	CAGATTGCTCATGCCTGTC	TCTAGCTGGAGAAGGCCAAG
SCN9A	SCN9A-10	TCATTGTGTAAAGAAAACGATCA	AAGACATTTTTCTCTAGCATTCTGC
SCN9A	SCN9A-11	GCCAGTGGGTTTCAGTGGTAT	GCCATGCCTGAGCTATGTAA
SCN9A	SCN9A-12	TTGAACCCAGCAATCTAGGC	TGTGCCTATTTAAGGTTGACCA
SCN9A	SCN9A-13	TTTCAAATATTAGAATGCTGACTGA	TGAAATGACAATGATGACAACTAAAA
SCN9A	SCN9A-14	TGATGAGCACTGACAGGACA	TGCAAAACCAAAGAAATACCC
SCN9A	SCN9A-15	TGCTTTACCCTTTGAACAAAAA	CATCACAATAATTTCCACAGAGA

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
SCN9A	SCN9A-16	CCTGTCTCCCTATTTCTCTACCC	TGCAATGTTAAGAAGAACTTATGACAA
SCN9A	SCN9A-17	TTTTTCATAATACTTTGCATGAGTCTG	CGTTAAGACAAAACCCAGAA
SCN9A	SCN9A-18	TGAGGGAGTATCAGAAAAGCA	AGGTAAAACAACTTGCCATGA
SCN9A	SCN9A-19	CAGCTGGCCCATGTCAATA	TTCACAACACACAGTAAAGAATAAATCC
SCN9A	SCN9A-20	TGTTGAGTTGCTTTTAGTGAGTTT	TCATAATTTCTACATACCCATGTTTTT
SCN9A	SCN9A-21	TGTCTGCATGGCATTCTTT	AAGAATAACTTATATCCTTCGTCCAA
SCN9A	SCN9A-22	CAGACAAAACCTCTGTTTATGGCTATT	TGAGTCCCAAGGGCTTCAT
SCN9A	SCN9A-23	CCTCAACAATGCATATGGCTTC	TTGTTTTCTGTGCAAAAATGAAT
SCN9A	SCN9A-24	CTGTGTTTTGGAGACCCATGTT	TCCAGAAATTAAGATGTGCATT
SCN9A	SCN9A-25	ATTCCTCGACCAGGGGTAAA	FTCAGCATATACTTCCTTGAGCA
SCN9A	SCN9A-26A	TTGAATTCATAAGAAATGAGTTGACA	CAGTCGGGTGGCTTACTGTT
SCN9A	SCN9A-26B	GACCTTTGGCAACAGTATGATT	TTTGAAGGATTTGCAGACA
SCN9A	SCN9A-26C	ACCGGATCCATTGTCTTGA	ACAGGCTGTAAACAATATATCAAAAA
C21ORF37	C21orf37-1	TGTGTGTTTCATTCTCTCACCAC	TGGATTACAGGTGTGAGCCAC
C21ORF37	C21orf37-2	TTGTTACATGAGATGCTGGCTG	TGACCAAGCAACATGGCTCC
C21ORF37	C21orf37-3	TGCAGCCATGCCTAACAGC	TCGGCAACATAGTGAGACC
C21ORF37	C21orf37-4	ATCCAGTACCATAAAATCCAG	TGTTCTAGGAACTATTGGC
CXADR	CXADR-1	CCTGGGACCAGGAGCGAG	GCCCCGTGTGCAATTCTGCC
CXADR	CXADR-2	ATGTGCTGCTTCTGAATGGC	CTCACCCAGACCATAAAGCCTG
CXADR	CXADR-3	CTGTAGCAGCAGGTGTATCC	GCTATCCAACATAGAAGTAC
CXADR	CXADR-4	GTGAATTCGAACCCAGAACC	CTTCAGTGAGCCGTGATTGC
CXADR	CXADR-5	TGGATTGTTAATTTGGAGAGG	GTCCCTAATACACACTTGCTGAC
CXADR	CXADR-6	GCCTACCTTCAGTATCTATAC	AAGAAAGATGCTTTGGGTGG
CXADR	CXADR-7	ACCTAAATACAGGCTCTTATCC	GGCTAGTAACACAATTTAGACC
BTG3	BTG3-1	TCGCGGTGCGAGGGTCTGC	AGCGAGCCTTCGACGTGG
BTG3	BTG3-2	AGGAGGTATATCTTACAGAGC	ATGAAACACCTGTAGGCATGG
BTG3	BTG3-3	ATGCTCCTAGGTTCTCTACC	TAAACCACCAGCTCCTGGC
BTG3	BTG3-4	ATTCTTGGCTGTCTGCAACC	AACTGAGAGTGCTGGTCC
BTG3	BTG3-5	TGTGATGATTCATCTTTGCC	AATCTCAAGTCAGAAACCTTGG
BTG3	BTG3-6	ATGTGATCTCAGTGTGTGGG	TTCTACAGTGTCTCGTATCC
C21ORF91	C21ORF91-1	ATCACAGGAGAACTCGAGG	ACCCAAGTCCGTCTTTCCG
C21ORF91	C21ORF91-2	AGTGCAAGTATGGCGATGC	TTCCAGTCAACACTCATAC
C21ORF91	C21ORF91-3	TAATTCACAGACTATCAGGG	TTCCCAAATCTATGATTCCAC
C21ORF91	C21ORF91-4	TTGTGTTGGCAGTTAAGTGC	AGATAAAGCCAGTGGTGTCC
C21ORF91	C21ORF91-5	AGAACAGAACTGTTTCTTGG	AGACTAGAGTATAATGATCTGC
C21ORF91	C21ORF91-alt	ACGGAAAGACGGACTTGGG	ATGCGCCTCGGAACTCG
CHODL	CHODL-1	ATAAGACGGTGCCTGAGC	TTACACCATGCAAGTTTCC
CHODL	CHODL-2	AATAATTCAGTGGGAGAAGC	TAAATGATTCTGCCTGTCC
CHODL	CHODL-3	ATGTCAGAGTAGGACAGGC	TGGACAGTTTGTCTACAGC
CHODL	CHODL-4	AAGGGAGAACATATCAACTCC	TAGGACCATACTTAGTGAACC
CHODL	CHODL-5	ACTGAAATGTCACTATGTGG	TGCTTAATAAGTCTGTAAGG
CHODL	CHODL-6	TCTGAGATATCTCCCTTGG	ATGTCTCACTCCATTATTAGC
TMPRSS15	PRSS7-1	ATGTAGACAGGTGGTGTGTGC	TACAGAGAAGTACATGAAGGC
TMPRSS15	PRSS7-2/3	TTGGAAGCTTGGAGTGTGG	TTATGCTGTGCCACTTTGC
TMPRSS15	PRSS7-4	AAGTGAACCTTACACAGG	ATGTAAATGTGTCACCTCAGG

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
TMPRSS15	PRSS7-5	TCTAAATGGACACTAATAATGCG	TGAGAACTCAGGCATTAGC
TMPRSS15	PRSS7-6	ATAAGTAAGAACCCCACTGGC	TCCTTCTGTAGTGATCAAAATGG
TMPRSS15	PRSS7-7	TGTATGAGTATTTGAACATGGC	AACTACTGAAAGCAATAAGACG
TMPRSS15	PRSS7-8	TACATCATTGTGTTTCATAACCG	AAGGGAAAACATACCCTCC
TMPRSS15	PRSS7-9	AACTGATAGTTCAGTAGATGG	AATTCATCATAACATTAAGC
TMPRSS15	PRSS7-10	ACTGAAGTATAAGCTGTATAAGG	ACACTGCAGTACAACACATACC
TMPRSS15	PRSS7-11/12	TGAGCTCGAGTCTAGTGTC	TTGGGCAAGTAGAGAAAGTGAC
TMPRSS15	PRSS7-13	AGACAATATTGAATCTCTTGGG	TGGAATTATAGCTGTGAGCC
TMPRSS15	PRSS7-14	ATTGTATTACTGATGATTTCCC	TAGACATGATAGGCGTACC
TMPRSS15	PRSS7-15	AGAGAAATCACCAGTGTGTCC	ATCAGCACAACATCTTGAGC
TMPRSS15	PRSS7-16	AGCCATGTAACATGTAGCC	TGAAATCTGTACACCTTTGC
TMPRSS15	PRSS7-17	AGCTGGTTCACCTTGAGC	ACACTGTAGAGTCCAATGC
TMPRSS15	PRSS7-18	ATCTCATGAACTTATCTCTCC	ATACAAAGGTTATTAACAGTGG
TMPRSS15	PRSS7-19	ACTGAAAGTCTAACTTATGGTC	TAGCATTCAAATCTGACTGGC
TMPRSS15	PRSS7-20/21	TCGGCTTACAATTCAGTCTCC	ATGTCATAAACAGCAGGATTTCC
TMPRSS15	PRSS7-22	AGTGAAACAGAGAGATTAGCAC	TTCTCTCTACTCCCTAATCC
TMPRSS15	PRSS7-23	AAGTGTGCTCTGAAATGCC	AGATGTTGAAAGCATTCACAGG
TMPRSS15	PRSS7-24	ATCCATTTGGCACAATCCAC	TCCAGTGTCTCAGGCTACC
TMPRSS15	PRSS7-25	TCTCTGTCTCCTTACTGAGG	TACGAAACTTAAATTTCCATGC
TMPRSS15	PRSS7-Ait1	TGGAGATAATTGAATCATGGG	TTGAATTCCTGAAACAAGCC
TMPRSS15	PRSS7-Ait2	ACTCCAAAGGATCAGATGC	TGATATGAAGACTGAATGCC
NCAM2	NCAM2-1	AACCCGTGACTTCGAGCTCC	TTCATTCTTCCTGCGCCTCC
NCAM2	NCAM2-2	ATCAGCGTTTGGACCATGTGG	TGAGCCGAGATCACACTACCG
NCAM2	NCAM2-3	AAGATTCTCAGATTTCCAGTC	AAGATACACTCTGGTAAAGC
NCAM2	NCAM2-4	TATAGTATCAATAGAGTCTGG	AAGGGCAGTGAATTTGCC
NCAM2	NCAM2-5	TAACAATTTAGAGCACTCTGG	TTCTTCTGGTATAGAAGAGG
NCAM2	NCAM2-6	TATAAATGGAGATGTGAAGG	TTCCATAAGCCTGATAATGG
NCAM2	NCAM2-7	TAGCCATATAGTCATCAATGC	TAGAATTTCACTCTGATCTTCC
NCAM2	NCAM2-8	TACTATAGTAGACTTAAACACCC	TACAAGTTACTAGGTAATTTGG
NCAM2	NCAM2-9	AATGTTATATGTTTGGTCACC	AATAACTGACTGAATGATTC
NCAM2	NCAM2-10	TTGCAGTGAGCGGAGATTGC	TTCATACACTCATATTAATGAGC
NCAM2	NCAM2-11	TAGTCTGTGGATATTACGG	ATCCCACATGTAAATGAGACC
NCAM2	NCAM2-12	TAGTTCTCATAACACCATAAGC	AACTATTTCACTCTGTATTTCGAG
NCAM2	NCAM2-13	AAGTACGTGGCTTGGAAAGC	ATCAGACCATAAGTAAGAAGG
NCAM2	NCAM2-14	ATGTCAAATGGTAAATCCAGG	ATGACTGTCAGGAATGGAAGG
NCAM2	NCAM2-15	TACTGGCTTCATTGACACAGC	ATACCCTATGGCAAGAGCG
NCAM2	NCAM2-16	TTGAAACCAGGAATAGGCG	TACTCCTTTACCCTACAACGC
NCAM2	NCAM2-17	TTGGAGGAAGGTAGAATTTGGG	ATAAGTGAGCACTCCAAGCC
NCAM2	NCAM2-18	AAGGTACGTCTCCTTAAATACC	ATGTGTACAAGCTATTCCAAGC
NCAM2	NCAM2-A1	ATTGCCTGACCATCATGGC	AACCCAGCACAGGCTTGG
NCAM2	NCAM2-A2	TACTCATGTATGACTGATAGG	ATGAGGTATATCTCCTAATGC
MRPL39	MRPL39-1	TCTCAGCCACTGAATCCCCAG	ACTAAGAAACCCTCCTCCTTCC
MRPL39	MRPL39-2	ACGTATCTGGGCCAGCTCTG	AGGGATTGCCATGGCCACAG
MRPL39	MRPL39-3	AGGACAGTCTGCAGAATCTTG	GGATGCCACTGATAAGTTCTG
MRPL39	MRPL39-4	TTGGTCGAGGTAACGTCATG	ACCTGCAAAGACTACTTCATG

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
MRPL39	MRPL39-5	AGAGCTCTGGCAAGCAGCTG	TACTCTCATTACATCCCTCTG
MRPL39	MRPL39-6	GGTCCAAAACCTCAGTTGTTGC	GAGATCACAGAGGTCTCAGAC
MRPL39	MRPL39-7	TGAGAACAGTTTGGCAGAGTC	GCTTCCATTTACCACCATAAC
MRPL39	MRPL39-8	GTGTTGCGTGACTCTTAAAG	AAACTGGTATAAAATCAAGTCC
MRPL39	MRPL39-9	AGCAGCTATCCCCATGTAGC	CACTGCTTTGACTATTGAGAC
MRPL39	MRPL39-10	AGGTTATCTGATAGCTGTCC	CCCTTCATGTGCTAATGTTG
MRPL39	MRPL39-11	GCCAAC TTGAGAAGCCTAG	TTAGGTAGATGTACATTCCTC
JAM2	JAM2-1	TGGCAGCCAGCTGAGAAG	TTCACAAGAAACCCACGACC
JAM2	JAM2-2	TTTCTTGACTATTGCATCCC	AAGGTAAGGCAGAGAATCC
JAM2	JAM2-3	AAGGCTTCCAATTCATGGG	ATGTCCGATCTCATTGACC
JAM2	JAM2-4	AGGCGTGAGCCATCATGC	TGCTGGCATGTTTATGGACC
JAM2	JAM2-5	AATCACACCTCTTTACCTGG	TTCGTGGTACAAGTGCTGC
JAM2	JAM2-6	AAACTCCTGAAGTCATGGC	ATTTCTGCTCCTTGCTCC
JAM2	JAM2-7	TAATGACTGCATCTGTCCG	TTTGCCACCACTGCACTCC
JAM2	JAM2-8	TTAGAAGGTATAAACGTCAGC	TACAGCAATGCAAGAACAGC
JAM2	JAM2-9	TACATTTACGTGCACAAGGC	AAGCTAACATCTACTTAGCTC
JAM2	JAM2-10	AACAGAGCAAGATTCATCTC	TTGCAAATGTCGGACAAAGC
JAM2	JAM2-altD	TAGGCAAAGCTTCAGAGTACC	AAGCAGCTGGAAGTGCAGG
ATP5J	ATP5J-1	AAGGCAACGGAGGCTCACG	TAGTAAAGGTGAGAGGCAGCC
ATP5J	ATP5J-2	AAGGGAACGTGTGGTCAGG	ATGAGCTCAGTGAAGGTC
ATP5J	ATP5J-3	ATCTGTTGGAATGTGGTGG	AACACTGTCATTCAGTTCTC
ATP5J	ATP5J-4	AATGCATGGCTCATAGAAAGTG	TCCAGTTCATCCAAGGTCTCC
ATP5J	ATP5J-Alt1	AGGCTACTTAGGCAGAACG	TGACATGATCAGAAAGACTGG
ATP5J	ATP5J-Alt4	TACCCACTTTATAGTATCGCTG	TTCCACAGGTGGCTTTGTTCCG
GABPA	GABPA-1a	TACACGTTCTGCCTAAGTAGC	TTAGGCGAAGAAAAGATGGCG
GABPA	GABPA-1b	TCTAGGTGAGACAGAAGCC	AACGGAAATGGGAGTCACAG
GABPA	GABPA-2	ATTAGAGACATGAGCCACC	AACCACATTAAGTCAGAGG
GABPA	GABPA-3	ATGGCATAACAGATTTTGAGG	ATGCAGACTAAAATGTTGC
GABPA	GABPA-4	AAGTTCTGTTTGGTACATCC	AAGTAATGTAGACAACCATCG
GABPA	GABPA-5	AATGATGTTTATAGGTAGGG	TAGTGTCTTCTATGTCAAGC
GABPA	GABPA-6	TTGATACAGTTCCAGCTGAGG	TTGGATTCTAATGTTAGCCTGG
GABPA	GABPA-7	AGTTTCAGTTCAGTGTTTTGG	ATAAAGTACTTGTGTGCGAGC
GABPA	GABPA-8	TTGAAATTGTGGATTGAGGC	TGGATTGTGCCATTGTTTCC
GABPA	GABPA-9	ATGGCTGAGATTTAAACCACG	ACTAACACTCAATTCATCTATGC
GABPA	GABPA-10	ATTGCTATTGTGGCGGATGC	ATGCATCAGACTGTACAGCC
APP	APP-1	TTTCTAGAGCCTCAGCGTCC	AAGACTTGGGTTAAGGTCTTGG
APP	APP-2	AAAGGAGTGTGAAGACCG	TATGGTGAATCATTAGGAACC
APP	APP-3	TGTACCTTACAGTGGAGGC	ACAGTACAACACAGAGTGGC
APP	APP-4	TAACATTTCAAAGGTAGTAGGG	TTACGGATAGTAGCACTGGG
APP	APP-5	AGTACCAAAGTGTAAACCATGC	TAACAGCAGACTCTGATGGG
APP	APP-6	TGCAGACCCACTGAGCTGG	TGCCAAGCAGCATATACAAGG
APP	APP-7	ACAGTGCATGCTCTGAGAGG	TACTGCGGAGACTCTGAGC
APP	APP-8	TGGACTCGTCATTTACGC	AACATCTCAAGCTGTCTGGC
APP	APP-9	TGCTGCACAGTGTCTCATGG	AGCATGTTACCGGAGGATGC
APP	APP-10	AAATGACTGTCTAGTTCTCGG	AAGAACAGCTGAAGTTCATGG

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
APP	APP-11	TCAATGTTGGAATGACTATGC	TTGTATGGCTTCCAGTTCCC
APP	APP-12	ACAGTACGTTACATGACCG	TGGGATCCTGTCACCAACC
APP	APP-13	TATCTACCTGCAGTGTGG	TAAGGCTAGTAAGCTAGTTCC
APP	APP-14	AAAGCAGTTGAAGCTTGCC	TTGGCAGTTTACATGCTTTGC
APP	APP-15	TTGGGAGCCACGACTTACC	AGTAAGTACAATTGAGAGAGGC
APP	APP-16	AGCAGAAGCCTTACTTTCAGG	ATGGTAATCCTATAGGCAAGC
APP	APP-17	TAACCTCATCCAAATGTCCC	AACCCAAGCATCATGGAAGC
APP	APP-18	TGGGTGTTCTGCAATCTTGG	TACTTGTGTTACAGCACAGC
APP	APP-Alt	TACCCAAGACAGAGTTCCG	ACTGCACTGCATGGATGGC
CYYR	CYYR1-1D	TTCACTGTCACTCTTTGTGCG	AAGCGTCTGCAAAGGTCC
CYYR	CYYR1-2D	TACAGCTTAGAGTCTAATGGG	AAGACATAACTGGACAACCTGG
CYYR	CYYR1-3D	ACACTTGTCTATAATCATGG	TTGACCATCTAGAATGTTTCC
CYYR	CYYR1-4D	TTGCAGCCACAATTTATGTCC	TTGGAGCAATTTCTTCTGTC
CYYR	CYYR1-AltD	AATGTGTCCCTTCTGACAGC	TTGTAGTGAGTACATTCAGG
ADAMTS1	ADAMTS1-1a	TTTAGCACCAACGGAGCCG	TCCGGCACCAGTACTCC
ADAMTS1	ADAMTS1-1b	AAGCTGGGCAGCGACATGG	TTATGATCCTGCCTGCCAGC
ADAMTS1	ADAMTS1-2	TTGCTTTGACTGGTTAGGC	TTGGTACAACGTAGACTCC
ADAMTS1	ADAMTS1-3	AATGTAGATGTCCAAAGC	ATATAACCTACAGACTCTCC
ADAMTS1	ADAMTS1-4	TTACAGGTGTGAGCCACC	TTGGGAGCTACTCAACCG
ADAMTS1	ADAMTS1-5	TTCTGAAATGGGATCTACCC	TTCTGTCTAGAGGACACGG
ADAMTS1	ADAMTS1-6/7	ATCCGTGTCTCTAGCAGG	AACTCAAAGCAGGCAGTTGC
ADAMTS1	ADAMTS1-8	ATGCATAATGTGTAGAGGG	TTCCCAGACCTGTGAAAGG
ADAMTS1	ADAMTS1-9	TAAATGGGCCTTTCAACAGG	TACACCTCACTGGTTACTGG
ADAMTS1	ADAMTS1-Alt	TTTGTGCGGGTTGCAACG	AAGTCCTAAACTGGGCTGC
ADAMTS5	ADAMTS5-1a	TTGACTCAATCCTGCAAGC	TGTAGACGTGCAGGATCC
ADAMTS5	ADAMTS5-1b	AGCCACTGCTTCTATCGGG	ACATCCACAGCTGCAGGAGG
ADAMTS5	ADAMTS5-2	TTCCAGAGAGGAACAGGTG	AATTCCCAGTGGTACATCTG
ADAMTS5	ADAMTS5-3	AAGTGAACCTCATCTACAATTAGG	ACACAACCTATTGTCTTAGAGGG
ADAMTS5	ADAMTS5-4	TACACTACAGATTCATGGGTG	AAGCCTTCTGAGAACAGTGC
ADAMTS5	ADAMTS5-5	TTCTAGTGCTGGAGTTGGG	ATATTGGTGGAACTGTGCAG
ADAMTS5	ADAMTS5-6	TTGGTGAGTAAAGAGACTGTG	AACTGTTTACGTCTGGCGTC
ADAMTS5	ADAMTS5-7	AATGGACTGTCCATACCAATC	AGACCTCCTCATAAGATAGC
ADAMTS5	ADAMTS5-8	AACTGTGTGTTAAGAGAAGAC	TTGGACTCCTGTTGACAATG
hsa-mir-99A	hsa-mir-99A	ATATGCATCCTTAGAACTCAGC	TGTTGAGAATTGAAGCCTGCC
hsa-let-7c	hsa-let-7c	TGACCTATGCTGGAAACCC	AAGATACTCATGACACATTACC
hsa-mir-125b-2	hsa-mir-125b-2	TCGTGATTACTCAGCTCATCC	AATACAAACGCTATTTTCAGTGC
AP000745.1	AP000745.1	ACAGAAGAGATGCCACAGTTGG	TGTCTTCCCAGTCCAGTCAAC
hsa-mir-548x	hsa-mir-548x	ACTACCTCTATGACTGGTGC	ATATTGCATCAACATTTCTTGCC
AP001537.1	AP001537.1	TTTAACTGATTTGGATGAAGCCC	TCTATGAATGAAGAACCCATGG
AP001137.1	AP001137.1	TGATTAATGGACATTTGGGCTGG	TCACCTCCTGAGAGCAGAGCG
hsa-mir-6130	hsa-mir-6130	TCTTAGCATGAAATCATCCAGG	TGCTCAACATCATAATCATTAGG
hsa-mir-155	hsa-mir-155	TTTACTATATGCTGTCACTCC	TTGAACATCCCAGTGACCAG
AP001340.1	AP001340.1	AGGGCTGCTCTATAGTCTTGC	TCTTCTGTTTAAATTCAGTAAGGC
hsa-mir-4759	hsa-mir-4759	ACATCTACTATTTAACTCTACC	AATAGAGGACTGAGTTGATTGC
SMYD4	SMYD4_E1	TCAGTTGGCCGACCATGG	ACGAATCGGGTCACTACTGC

Gen	Nombre oligonucleótidos	Secuencia oligonucleótido directo (5'-3')	Secuencia oligonucleótido reverso (5'-3')
SMYD4	SMYD4_E2	TGGGATTACAGGTGTGAGC	AGACATGGTGGCTCACGC
SMYD4	SMYD4_E3	TGAGGGCAATGGTTAGAGC	TATACCACTGTACTCCAGCC
SMYD4	SMYD4_E4	ACAGTCTTCAGTACTAGAGCC	TGGAAGAAGCAGAGATGAAGG
SMYD4	SMYD4_E5a	AGCATGTGGTTGTAATTGTTCC	ATTCTGTCTGTGGTAGAGC
SMYD4	SMYD4_E5b	ATGTTTGAAGCACACTTTGGCC	TCTCAAACACCTGCTCCATCG
SMYD4	SMYD4_E6	TGGAGCCATGACTCACACGG	AGACAGGTGAAGTCACATGCC
SMYD4	SMYD4_E7	TCCAGACCCTCTGCTAAGC	TCCTCCTAAACACTGATCACC
SMYD4	SMYD4_E8	TTAGAATTGCCGCCATTGCC	TCCCATCAGTACTGAGTATCC
SMYD4	SMYD4_E9	ATTGGAACAGACATTGTGCG	ACCCTCAGTTTACAGAGCG
SMYD4	SMYD4_E10	TGAGCCTTCACGTCTGCG	AGGCTACAGTGCAGTGGC
SMYD4	SMYD4_E11	TTCACGGTGTGTGAGTAGGC	ACCTTAGCCTCCCAAAGTGC
JPH1	JPH1-1	AACCTGGGCTGTCTCTCG	TGGCGGGTTTCCGGACACG
JPH1	JPH1-2a	TGGGTCAGATTTGACCTTGG	ATGTAGGTTTCCGTGGTGG
JPH1	JPH1-2b	TTCCATCTCGAGCAAGCG	ATTTAGCGATGTCCTGCG
JPH1	JPH1-3	AAGGGCTAAGGCAATTCATGG	ACTGCTGGGATTCAGGAAGC
JPH1	JPH1-4a	AATGCAATTATCAGGGAAGCC	TAGCCGTGATACTGAGAATGC
JPH1	JPH1-4b	AAGGAGTGTGGCTGATGAGC	ATCAAGATGCACAGTCAACC
JPH1	JPH1-5	TCTACACCTTTCCGAACTGC	TTGAATCACATTCAGGCATAGC
JPH1	JPH1_E6a	TTTGGCTATGCCTGAATGTG	CCGCAGGTGGTAGATGACTATAC
JPH1	JPH1_E6b	AGCAGCATCACTCACCAGTC	CAGGAAAGGCAGAAAAGTGC
JPH1	JPH1_E6c	TGCTATTAATAAACTGCTCTGCTC	ACTGAGAGTGACGCAGGAAC
JPH1	JPH1_E6d	GACCAATATGGAATAAAGAAGAAGG	CCACCAAAGTATTCACATAACTC
GDAP1	GDAP1-E1	GCCCTTCATAACCAGGGTCTC	GCCCAGTCCGCGCCACCCTCCG
GDAP1	GDAP1-E2	GGCTGCTTAGCGGTGTCCAGGG	GGGAACACATAGTTGTGTTG
GDAP1	GDAP1-E3	GCTTTTGAAGTGAACAACTCATG	GACCATGAGACATGCTAGGTC
GDAP1	GDAP1-E4	CAGGGTAAGCCCAAGGCAGAG	GTAGAACATTTACTCCGTGCAG
GDAP1	GDAP1-E5	GGCTGAACTCTGTAAGAAATTTG	GACCTAAGAATGTTCCCATG
GDAP1	GDAP1-E6	GAGACCACTGATACCAGCTGG	CAGAGAGCCACGGGCAATCAC
MFN2	MFN2-3	TGATTCTCCCAAAGCATTCGG	TCCCTGGGAGCAGAGATATACC
MFN2	MFN2-4	ATCTGGAGCTCAGCCTGTGCG	GCCTGGAACGTTCTGTGACC
MFN2	MFN2-5	GGCAACATGCACTGAATAGG	GTCACAACGGAGGACTTGCT
MFN2	MFN2-6	TAGCAGATGGGCAGCATTC	GCCTTCCAGTTTGGACCTCC
MFN2	MFN2-7/8	GTCCCAGGTCTGTTCTCAG	ACTAGATCCAGGGGTGCAGG
MFN2	MFN2-9	GCCACCTACACTCACTCTGG	CCTCAGCACGAGACAAAATG
MFN2	MFN2-10/11	TGCTGCCAAGTTGTTTCTGG	TTGTCTCGGCAGCTCTCTCC
MFN2	MFN2-12	CTGGCATCCCCTCTGTCTCC	TCTGTATTCTGAAACAGGGCC
MFN2	MFN2-13/14	TGCTGCAGGAGTGAACCTTTGG	GCCTCCGCATCTGATCTTTGG
MFN2	MFN2-15	GTAGAGCCCTGTCTCCAAGG	AGGCAGGGTACAGACTGACC
MFN2	MFN2-16	CCCAGACTAGGGCAACACTG	AGCAGGAACCTAGCCCTCAG
MFN2	MFN2-17	AGATGGCCCTGGTAGTGATG	GCCTAAAGGAAGTCCCCTGC
MFN2	MFN2-18	CTACTGTGGGTGGCTAAGC	CCTGGAGCCCTAACCTTTGG
MFN2	MFN2-19	CTGGCGGGTAGTCTAATAC	GGCTCAAATGGTACGAGAC

(*) Oligonucleótidos para amplificar y secuenciar *SEPT9* de acuerdo a Kuhlenbäumer y colaboradores (Kuhlenbaumer et al., 2005); (**) Oligonucleótidos para amplificar y secuenciar *SCN9A* de acuerdo a Cox y colaboradores (Cox et al., 2006).

Anexo II. Ortólogos de *GDAP1/GDAP1L1* y *JPH1/JPH2* en los organismos vertebrados seleccionadosGenes ortólogos de *JPH1* y *GDAP1* seleccionados

Organismo	Cromosoma (scaffold)	Símbolo	ID	Símbolo	ID
<i>H.sapiens</i>	8	<i>JPH1</i>	56704	<i>GDAP1</i>	54332
<i>M.mulatta</i>	8	<i>JPH1</i>	697014	<i>GDAP1</i>	697136
<i>M.musculus</i>	1	<i>Jph1</i>	57339	<i>gdap1</i>	14545
<i>M.domestica</i>	3	<i>JPH1</i>	100020412	<i>GDAP1</i>	100020374
<i>G.gallus</i>	2	<i>JPH1</i>	420190	<i>GDAP1</i>	420191
<i>A.carolinensis</i>	4	<i>Jph1</i>	100561435	<i>LOC100551932</i>	100551932
<i>X.tropicalis</i>	(NW004668239.1)	<i>Jph1</i>	100145273	<i>gdap1</i>	100490264
<i>T.rubripes</i>	(NW004072370.1)	<i>LOC101065857</i>	101065857	<i>LOC101066080</i>	101066080
<i>D.rerio</i>	24	<i>jph1a</i>	100147894	<i>gdap1</i>	553702
	2	<i>jph1b</i>	556485		

Genes ortólogos de *JPH2* y *GDAP1L1* seleccionados

Organismo	Cromosoma (scaffold)	Símbolo	ID	Símbolo	ID
<i>H.sapiens</i>	20	<i>JPH2</i>	57158	<i>GDAP1L1</i>	78997
<i>M.mulatta</i>	10	<i>JPH2</i>	694158	<i>GDAP1L1</i>	693773
<i>M.musculus</i>	2	<i>Jph2</i>	59091	<i>Gdap1l1</i>	228858
<i>M.domestica</i>	1	<i>JPH2</i>	100023726	<i>GDAP1L1</i>	100023767
<i>G.gallus</i>	20	<i>JPH2</i>	770867	<i>GDAP1L1</i>	419201
<i>A.carolinensis</i>	4	<i>LOC100562750</i>	100562750	<i>gdap1l1</i>	100557423
<i>X.tropicalis</i>	(NW004668245.1)	<i>jph2</i>	100493044	<i>gdap1l1</i>	779687
<i>T.rubripes</i>	(NW004072399.1)	<i>LOC101080241</i>	101080241	<i>LOC101061231</i>	101061231
<i>D.rerio</i>	23	<i>jph2</i>	553333	<i>gdap1l1</i>	562163

Anexo III. Soluciones y tampones de interés empleados a lo largo del trabajo.

-Soluciones empleadas en las hibridaciones *in situ* de embriones de *D. melanogaster*.

Tampón carbonato 2X:

Na₂CO₃ 120 mM, NaHCO₃ 80 mM, pH 10,2.

PBT:

BSA 0,1 %, Triton X-100 0,2% en PBS

Solución de hibridación:

50 % de formamida, SSC 5x (a partir de SSC 20x comercial), solución Denharts 5x (a partir de Denharts 50x comercial), 500 µg/mL de RNA de levadura y Tween al 0,1%.

Solución de detección (tampón para la fosfatasa alcalina)

NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris pH 9.5 100 mM, levamisol 1mM. El levamisol solo es necesario en los lavados previos al desarrollo del color y durante la reacción de desarrollo del color.

-Soluciones empleadas en las hibridaciones *in situ* de cortes de embrión de ratón.

PBT

Tween al 0,1 % en PBS

Solución de acetilación

0,25% de anhídrido acético en 0,1 M trietanolamina pH 8.0

Solución de hibridación

50 % de formamida, 10 % de dextrán sulfato, 0,2% de tRNA,), solución Denharts 1x (a partir de Denharts 50x comercial), solución de sales 1x (a partir del stock preparado 10x de solución de sales).

Stock solución de sales 10x

NaCl 2M, Tris 0,1 M, NaH₂PO₄ 50 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, EDTA 50 mM, pH 7,5

MABT

Ácido maleico 0,1 M, NaOH 0,2M, NaCl 0,2M, Tween 0,01%, pH 7,4

Solución de bloqueo

10 % de bloqueo comercial (Roche), 10 % suero de oveja, preparado en MABT.

B1

Tris 0,1 M pH 9.5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM.

TE

Tris 1 M pH 7.5, EDTA 0,5 M pH 8.

-Medios empleados en la preparación de cutículas de individuos adultos de *D. melanogaster* a para su visualización al microscopio

Medio SH

Mezcla de glicerol:etanol en relación 1:3.

Medio de Hoyer

50 mL de agua, 30 g de goma arábica (cristales, no polvo), 200 g de hidrato de cloral y 20 g de glicerol.

Anexo IV. Tabla de oligonucleótidos empleados para generar las construcciones de interés durante los procesos de clonación, subclonación y/o mutagénesis dirigida.

Nombre oligonucleótido	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
SMYD4_pEGFP_XhoI_D	ggaaCTCGAGctATGGATCTGCCTGTGGATGAATG
SMYD4_pEGFPN1_BamHI_R	gcgcGGATCCAATGCAGGCCCTACAGG
SMYD4_K82E_D	AACAAAAAATTTTCAGGAGGAAGATTACACAGGAGC
SMYD4_K82E_R	CAGCTCCTGTGTAATCTTCCTCCTGAAATTTTTTG
SMYD4_EcoRI_D	ggaaGAATTCggATGGATCTGCCTGTGGATGAATG
SMYD4_XhoI_R	gcgcCTCGAGaCTACAATGCAGGCCCTACAGG
Mm_Smyd4_EcoRI_D	ggaaGAATTCggATGGATCTACCGGTGGATGAATG
Mm_Smyd4_XhoI_R	gcgcCTCGAGaCTACACCAAGGGCCCCACAG
GAL4_SMYD4_EcoRI_D	GGAATTCATGGATCTGCCTGTGGATG
GAL4_SMYD4_XbaI_R	CGTCTAGACTACAATGCAGGCCCTACAG
JPH1_pEGFP_HindIII_D	ggaaAAGCTTcgATGACGGGCGGAAGGTTTCG
JPH1_pEGFPN1_SalI_R	atatCGTCGACTGAGTTAGAAAGTGAACAAAAAGAATGGCC
JPH1_pECFPC1_SalI_R	atatCGTCGACTGTCAAGTTAGAAAGTGAACAAAAAGAATGGCC
JPH1_R213P_D	CGGCCTCTTCCCGAGGGGCTCCC
JPH1_R213P_R	GGGAGCCCCTCGGGAAGAGGCCG
D624H-JHP1-D	AAGAATCCAGCAAGCAACCATTTCATGCCCTGCTTTGG
D624H-JHP1-R	TTCCAAAGCAGGGCATGAATGGTTGCTTGCTGGATTC
mCherry-BamHI-D	aagagGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mCherry-EcoRI-R	aagagGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

Anexo V. Tabla de oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica mediante RT-PCR y/o qRT-PCR. Se indica frente a qué organismo (humanos, Hs; ratón, Mm; mosca, Dm) se ha diseñado el oligonucleótido específico.

Nombre	Organismo	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
JPH1-D(qPCR)	Hs	GACATCGCGAGAGCTGTG
JPH1-R(qPCR)	Hs	TTCCTGAAATCTCTGTTGACG
STIM1-D(qPCR)	Hs	TCTGCATGACCTTCAGGAAA
STIM1-R(qPCR)	Hs	GATCTCATCGCGCAGCTT
ORAI1-D(qPCR)	Hs	GGACCTCGGCTCTGCTCT
ORAI1-R(qPCR)	Hs	CGGTGGGTAGTCGTGGTC
GDAP1-D(qPCR)	Hs	TGCAAAGAAGAAATGAAGAAACC
GDAP1-R(qPCR)	Hs	ATGTGACAGCGAGTGAGACC
qRT-PCR_GADPH-D	Hs	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC
qRT-PCR_GADPH-R	Hs	ACGACCAAATCCGTTGACTC
SMYD4 RTPCR_1D	Mm	TTCTTCAACCTGAGGATGAG
SMYD4 RTPCR_1R	Mm	TCTTTAAGACATGCTTCATAC
SMYD4 RTPCR_2R	Mm	ACTGATGGTCTGTCTTGCC
Mm_RT-PCR_E1D	Mm	TTCACCTCCCGAAGTCTGTGC
Mm_RT-PCR_E10R	Mm	ACAGTGCACCAACAGGATCC
qRTPCR_mjph1-D	Mm	CAATTGAAGGTGCACAAAGG
qRTPCR_mjph1-R	Mm	AGCATCAGCTTTTGCTCTGG
qRTPCR_mjph2-D	Mm	GCTGGCTCCAGACTTCTACC
qRTPCR_mjph2-R	Mm	GCAAGCTCTCAGAGTTCTCCA
qRTPCR_mjph3-D	Mm	ACGGAGCCAAATACGAAGG
qRTPCR_mjph3-R	Mm	ATTGGCCCTGATACGTTCCCT
qRTPCR_mjph4_v2D	Mm	TGCCTGACAGAAGAGGTTGA
qRTPCR_mjph4_v2R	Mm	AGGCTGAGGTCCAGCAAG
GAPDH-h.m.r/d	Mm	CATTGACCTCAACTACATGG
GAPDH-h.m.r/r	Mm	CAAAGTTGTCATGGATGACC
Jp-CG4405-qRT_D	Dm	GGCAAATCCCTTGCTGTATT
Jp-CG4405-qRT_R	Dm	AACGCCACCTTGAAAATCA
qRT-PCR_DmGapdh-D	Dm	GATCGGAATTAACGGATTGG
qRT-PCR_DmGapdh-R	Dm	ACATCGATGAAGGGATCGTT

Anexo VI. Tabla de oligonucleótidos empleados para amplificar y clonar las regiones génicas de los genes de interés usadas para la síntesis de sondas para la hibridación in situ en embriones de *D. melanogaster*.

Nombre	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
CG14122-D	TTGCGTGGACGTGCGTGATGC
CG14122-R	TGTCCTTGTGAGGCAGTGCAGC
CG1868-D	AACCTTCAAGTCATTGGCATCC
CG1868-R	TGCTCGCTAGCCAGATAATCC
CG7759-D	TGCAAGAGCGATGAGGAGCG
CG7759-R	AATCCTTGAGATGCTGTTGGC
CG8378-D	TGCAGGACTGGAACTAATCG
CG8378-R	ATAGTCGTCACCGTATTGCG
Wg-CG4889_D	TCCAAGCGGAGATGCGACAGG
Wg-CG4889_R	TAGTTAACTAGCCAGCTAAGTGC

Anexo VII. Tabla de oligonucleótidos empleados para amplificar y sintetizar las sondas para detectar la expresión de *Smyd4* mediante hibridación in situ en cortes de embrión de ratón.

Nombre	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
Mm-Smyd4_E10_Hyb-D	AGTGCCTGAAGCTCTGAGTGCC
Mm-Smyd4_3UTR-SP6_Hyb-R	GCGATTTAGGTGACACTATAGTGCCTGCAGATCAGTGACAACC

Anexo VIII. Tabla de oligonucleótidos empleados para generar los constructos clonados en el vector pMIR para realizar los estudios funcionales de las variantes identificada en la región 3'UTR del gen JPH1.

Nombre	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
rs57375187G-F	TTACTAGTGTGGATCCTAAAATGCGTAATGCTTGTTAAAATGCGTAATGCTTGTTAA AATGCGTAATGCTTACGCGTTT
rs57375187G-R	AAACGCGTAAGCATTACGCATTTTAAACAAGCATTACGCATTTTAAACAAGCATTACG CATTTTAGGATCCACACTAGTAA
rs57375187A-F	TTACTAGTGTGGATCCTAAAATGCATAATGCTTGTTAAAATGCATAATGCTTGTTAA AATGCATAATGCTTACGCGTTT
rs57375187A-R	AAACGCGTAAGCATTATGCATTTTAAACAAGCATTATGCATTTTAAACAAGCATTATGC ATTTTAGGATCCACACTAGTAA
rs13277002T-F	TTACTAGTGTGGATCCAAATCTGATGTATAGTCGTAATCTGATGTATAGTCGTAAA TCTGATGTATAGTCACGCGTTT
rs13277002T-R	AAACGCGTGAATAACATCAGATTTACGACTATAACATCAGATTTACGACTATAACATC AGATTTGGATCCACACTAGTAA
rs13277002C-F	TTACTAGTGTGGATCCAAATCTGACGTATAGTCGTAATCTGACGTATAGTCGTAAA TCTGACGTATAGTCACGCGTTT
rs13277002C-R	AAACGCGTGAATAACATCAGATTTACGACTATAACATCAGATTTACGACTATAACATC AGATTTGGATCCACACTAGTAA

Anexo IX. Tabla de oligonucleótidos empleados para el estudio del efecto de variantes nucleotídicas que pudieran afectar al *splicing* mediante ensayo de minigenes.

Nombre	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
Ex2-JPH1_EcoRI	aagagGAATTCAGATTTGACCTTGGGCAG
Ex2-JPH1_EcoRV	aagagGATATCATTAGCGATGTCACCTGGC
pSPL3seq F	CATGCTCCTTGGGATGTTGATG
pSPL3seq R	ACTGTGCGTTACAATTTCTGG
SD6-F	TCTGAGTCACCTGGACAACC
SA2-R	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC

APÉNDICE

A continuación se incluyen las publicaciones y manuscritos en preparación de los trabajos directamente relacionados con la tesis doctoral:

Capítulo I

A novel *locus* for a hereditary recurrent neuropathy on chromosome 21q21. **Calpena E**, Martínez-Rubio D, Arpa J, García-Peñas JJ, Montaner D, Dopazo J, Palau F, Espinós C. *Neuromuscul Disord*. 2014 Aug;24(8):660-5. doi: 10.1016/j.nmd.2014.04.004.

Evolutionary History of the Smyd Gene Family in Metazoans: A Framework to Identify the Orthologs of Human Smyd Genes in *Drosophila* and Other Animal Species. **Calpena E**, Palau F, Espinós C, Galindo MI. *PLoS One*. 2015 Jul 31;10(7):e0134106. doi: 10.1371/journal.pone.0134106.

Manuscritos en preparación:

Mutation in the *SMYD4* gene as a candidate for a hereditary recurrent neuropathy. **Calpena E**, Martínez-Rubio D, Lupo V, Montaner D, Dopazo J, Galindo MI, Palau F, Vílchez JJ, Espinós C. *Manuscrito en preparación*.

Capítulo II

Junctophilin-1 is a modifier gene of *GDAP1*-related Charcot-Marie-Tooth disease. Pla-Martín D*, **Calpena E***, Lupo V, Márquez C, Rivas E, Sivera R, Sevilla T, Palau F#, Espinós C#. *Hum Mol Genet*. 2015 Jan 1;24(1):213-29. doi: 10.1093/hmg/ddu440. (*,# equal contribution).

Manuscritos en preparación

Junctophilin-1 expression levels modify the effects of *GDAP1* mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. **E. Calpena**, V. López, T. Sevilla, F. Palau, M.I. Galindo, C. Espinós. *Manuscrito en preparación*.

Phenotypic spectrum of the *Drosophila Junctophilin* gene. **E. Calpena**, V. López, M. Chakraborty, B. Llamusi, R. Artero, C. Espinós*, M.I. Galindo*. *Manuscrito en preparación*.

A continuación se incluyen otras publicaciones fruto de colaboraciones y aplicando conocimientos y habilidades adquiridas en la presente tesis doctoral:

The *EGR2* gene is involved in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. Sevilla T, Sivera R, Martínez-Rubio D, Lupo V, Chumillas MJ, **Calpena E**, Dopazo J, Vílchez JJ, Palau F, Espinós C. *Eur J Neurol*. 2015 Jul 24. doi: 10.1111/ene.12782.

Complexity of the Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: Clinical and Cellular Characterization of the MPZ p.D90E Mutation. Lupo V, Pascual-Pascual SI, Sancho P, **Calpena E**, Gutiérrez-Molina M, Mateo-Martínez G, Espinós C, Arriola-Pereda G. *J Child Neurol*. 2015 Oct;30(11):1544-8. doi: 10.1177/0883073815571049.

New insights into the genetics of 5-oxoprolinase deficiency and further evidence that it is a benign biochemical condition. **Calpena E**, Deshpande AA, Yap S, Kumar A, Manning NJ, Bachhawat AK, Espinós C. *Eur J Pediatr*. 2015 Mar;174(3):407-11. doi: 10.1007/s00431-014-2397-0.

Clinical, biochemical, molecular and therapeutic aspects of 2 new cases of 2-aminoadipic semialdehyde synthase deficiency. Tondo M, **Calpena E**, Arriola G, Sanz P, Martorell L, Ormazabal A, Castejon E, Palacin M, Ugarte M, Espinos C, Perez B, Perez-Dueñas B, Pérez-Cerda C, Artuch R. *Mol Genet Metab*. 2013 Nov;110(3):231-6. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.06.021. Epub 2013 Jul 6.

Sh3tc2 deficiency affects neuregulin-1/ErbB signaling. Gouttenoire EA, Lupo V, **Calpena E**, Bartesaghi L, Schüpfer F, Médard JJ, Maurer F, Beckmann JS, Senderek J, Palau F, Espinós C, Chrast R. *Glia*. 2013 Jul;61(7):1041-51. doi: 10.1002/glia.22493. Epub 2013 Apr 2.

5-Oxoprolinuria in Heterozygous Patients for 5-Oxoprolinase (*OPLAH*) Missense Changes. **Calpena E**, Casado M, Martínez-Rubio D, Nascimento A, Colomer J, Gargallo E, García-Cazorla A, Palau F, Artuch R, Espinós C. *JIMD Rep*. 2013;7:123-8. doi: 10.1007/8904_2012_166.

Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Espinós C, **Calpena E**, Martínez-Rubio D, Lupo V. *Adv Exp Med Biol*. 2012;724:61-75. doi: 10.1007/978-1-4614-0653-2_5. Review.

BIBLIOGRAFÍA

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97-101.
- Abu-Farha M, Lambert JP, Al-Madhoun AS, Elisma F, Skerjanc IS, Figeys D (2008) The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics* 7:560-572.
- Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F, Tremblay V, Butson J, Figeys D, Couture JF (2011) Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol* 3:301-308.
- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U (1995) Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* 11:274-280.
- Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, De Smet F, Tranchevent LC, De Moor B, Marynen P, Hassan B, Carmeliet P, Moreau Y (2006) Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol* 24:537-544.
- Agrawal PB, Greenleaf RS, Tomczak KK, Lehtokari VL, Wallgren-Pettersson C, Wallefeld W, Laing NG, Darras BT, Maciver SK, Dormitzer PR, Beggs AH (2007) Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am J Hum Genet* 80:162-167.
- Aharoni S, Harlalka G, Offiah A, Shuper A, Crosby AH, McEntagart M (2011) Striking phenotypic variability in familial TRPV4-axonal neuropathy spectrum disorder. *Am J Med Genet A* 155A:3153-3156.
- Akdeli N, Riemann K, Westphal J, Hess J, Siffert W, Bachmann HS (2014) A 3'UTR polymorphism modulates mRNA stability of the oncogene and drug target Polo-like Kinase 1. *Mol Cancer* 13:87.
- Alenius M, Bohm S (1997) Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *J Biol Chem* 272:26083-26086.
- Amlie-Lefond C, Jubelt B (2009) Neurologic manifestations of varicella zoster virus infections. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:430-434.
- Ammar N, Nelis E, Merlini L, Barisic N, Amouri R, Ceuterick C, Martin JJ, Timmerman V, Hentati F, De Jonghe P (2003) Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 13:720-728.
- Andreassi C, Riccio A (2009) To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 19:465-474.
- Antonellis A, Bennett WR, Menhenniott TR, Prasad AB, Lee-Lin SQ, Green ED, Paisley D, Kelsh RN, Pavan WJ, Ward A (2006) Deletion of long-range sequences at Sox10 compromises developmental expression in a mouse model of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Hum Mol Genet* 15:259-271.
- Aparisi MJ, Garcia-Garcia G, Aller E, Sequedo MD, Martinez-Fernandez de la Camara C, Rodrigo R, Armengot M, Cortijo J, Milara J, Diaz LM, Jaijo T, Millan JM (2013) Study of USH1 splicing variants through minigenes and transcript analysis from nasal epithelial cells. *PLoS One* 8:e57506.
- Auer-Grumbach M, Schlotter-Weigel B, Lochmuller H, Strobl-Wildemann G, Auer-Grumbach P, Fischer R, Offenbacher H, Zwick EB, Robl T, Hartl G, Hartung HP, Wagner K, Windpassinger C (2005) Phenotypes of the N88S Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 mutation. *Ann Neurol* 57:415-424.
- Bai X, Bowen JR, Knox TK, Zhou K, Pendziwiat M, Kuhlenbaumer G, Sindelar CV, Spiliotis ET (2013) Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J Cell Biol* 203:895-905.
- Bailey-Wilson JE, Wilson AF (2011) Linkage analysis in the next-generation sequencing era. *Hum Hered* 72:228-236.
- Bakal C (2011) Drosophila RNAi screening in a postgenomic world. *Brief Funct Genomics* 10:197-205.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12:745-755.
- Barneo-Munoz M, Juarez P, Civera-Tregon A, Yndriago L, Pla-Martin D, Zenker J, Cuevas-Martin C, Estela A, Sanchez-Arago M, Forteza-Vila J, Cuezva JM, Chrast R, Palau F (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet* 11:e1005115.
- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 69:3613-3634.
- Bastepe M, Frohlich LF, Linglart A, Abu-Zahra HS, Tojo K, Ward LM, Juppner H (2005) Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nat Genet* 37:25-27.
- Baumer D, Lee S, Nicholson G, Davies JL, Parkinson NJ, Murray LM, Gillingwater TH, Anson O, Davies KE, Talbot K (2009) Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS Genet* 5:e1000773.

- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30:21-22.
- Beavers DL, Landstrom AP, Chiang DY, Wehrens XH (2014) Emerging roles of junctophilin-2 in the heart and implications for cardiac diseases. *Cardiovasc Res* 103:198-205.
- Becam I, Fiuza UM, Arias AM, Milan M (2010) A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila*. *Curr Biol* 20:554-560.
- Beckmann JS, Sharp AJ, Antonarakis SE (2008) CNVs and genetic medicine (excitement and consequences of a rediscovery). *Cytogenet Genome Res* 123:7-16.
- Bellen HJ, Levis RW, He Y, Carlson JW, Evans-Holm M, Bae E, Kim J, Metaxakis A, Savakis C, Schulze KL, Hoskins RA, Spradling AC (2011) The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics* 188:731-743.
- Berciano J, Baets J, Gallardo E, Zimon M, Garcia A, Lopez-Laso E, Combarros O, Infante J, Timmerman V, Jordanova A, De Jonghe P (2011) Reduced penetrance in hereditary motor neuropathy caused by TRPV4 Arg269Cys mutation. *J Neurol* 258:1413-1421.
- Berkholz J, Michalick L, Munz B (2014) The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis. *J Cell Sci* 127:3794-3804.
- Bi J, Wang W, Liu Z, Huang X, Jiang Q, Liu G, Wang Y (2014) Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca(2+)-ATPase SERCA. *Cell Metab* 19:861-871.
- Biasiotta A, Casato M, La Cesa S, Colantuono S, Di Stefano G, Leone C, Carlesimo M, Piroso S, Cruccu G, Truini A (2014) Clinical, neurophysiological, and skin biopsy findings in peripheral neuropathy associated with hepatitis C virus-related cryoglobulinemia. *J Neurol* 261:725-731.
- Bird TD, Ott J, Giblett ER (1982) Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 34:388-394.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, Le Forestier N, Agid Y, Brice A, Bouche P (1997) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 120 (Pt 5):813-823.
- Bolinches-Amoros A (2014) Papel de la mitocondria en la neurodegeneración de las neuropatías periféricas. Valencia: Universitat de València.
- Bombelli F, Stojkovic T, Dubourg O, Echaniz-Laguna A, Tardieu S, Larcher K, Amati-Bonneau P, Latour P, Vignal O, Cazeneuve C, Brice A, Leguern E (2014) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features. *JAMA Neurol* 71:1036-1042.
- Bonasio R, Zhang G, Ye C, Mutti NS, Fang X, Qin N, Donahue G, Yang P, Li Q, Li C, Zhang P, Huang Z, Berger SL, Reinberg D, Wang J, Liebig J (2010) Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science* 329:1068-1071.
- Bonifert T, Karle KN, Tonagel F, Batra M, Wilhelm C, Theurer Y, Schoenfeld C, Kluba T, Kamenisch Y, Carelli V, Wolf J, Gonzalez MA, Speziani F, Schule R, Zuchner S, Schols L, Wissinger B, Synofzik M (2014) Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier. *Brain* 137:2164-2177.
- Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F, Millan JM, Arpa J, Vilchez JJ, Prieto F, Van Broeckhoven C, Palau F (1997) Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 99:746-754.
- Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS, Jones AL (1999) Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:1647-1655.
- Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE (2013) Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14:681-691.
- Brakenhoff RH, Henskens HA, van Rossum MW, Lubsen NH, Schoenmakers JG (1994) Activation of the gamma E-crystallin pseudogene in the human hereditary Coppock-like cataract. *Hum Mol Genet* 3:279-283.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brewer MH, Ma KH, Beecham GW, Gopinath C, Baas F, Choi BO, Reilly MM, Shy ME, Zuchner S, Svaren J, Antonellis A (2014) Haplotype-specific modulation of a SOX10/CREB response element at the Charcot-Marie-Tooth disease type 4C locus SH3TC2. *Hum Mol Genet* 23:5171-5187.
- Brown MA, Foreman K, Harriss J, Das C, Zhu L, Edwards M, Shaaban S, Tucker H (2015) C-terminal domain of SMYD3 serves as a unique HSP90-regulated motif in oncogenesis. *Oncotarget* 6:4005-4019.

- Brown MA, Sims RJ, 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW (2006) Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* 5:26.
- Caldwell JH, Klevanski M, Saar M, Muller UC (2013) Roles of the amyloid precursor protein family in the peripheral nervous system. *Mech Dev* 130:433-446.
- Calpena E, Palau F, Espinos C, Galindo MI (2015) Evolutionary History of the Smyd Gene Family in Metazoans: A Framework to Identify the Orthologs of Human Smyd Genes in *Drosophila* and Other Animal Species. *PLoS One* 10:e0134106.
- Cao X, Pfaff SL, Gage FH (2007) A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev* 21:531-536.
- Cassereau J, Casasnovas C, Gueguen N, Malinge MC, Guillet V, Reynier P, Bonneau D, Amati-Bonneau P, Banchs I, Volpini V, Procaccio V, Chevrollier A (2011) Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a patient with CMT. *Neurology* 76:1524-1526.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540-552.
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, Sanchez-Navarro B, Millan JM, Saifi GM, Lupski JR, Vilchez JJ, Espinos C, Palau F (2005) Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 42:358-365.
- Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Yousfi N, Perichon M, Chaussepied M, Chluba J, Langsley G, Weitzman JB (2012) SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res* 72:810-820.
- Colon-Bolea P, Crespo P (2014) Lysine methylation in cancer: SMYD3-MAP3K2 teaches us new lessons in the Ras-ERK pathway. *Bioessays* 36:1162-1169.
- Collie AM, Landsverk ML, Ruzzo E, Mefford HC, Buysse K, Adkins JR, Knutzen DM, Barnett K, Brown RH, Jr., Parry GJ, Yum SW, Simpson DA, Olney RK, Chinnery PF, Eichler EE, Chance PF, Hannibal MC (2010) Non-recurrent SEPT9 duplications cause hereditary neuralgic amyotrophy. *J Med Genet* 47:601-607.
- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J (1987) Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 75:9-12.
- Cooper DN, Chen JM, Ball EV, Howells K, Mort M, Phillips AD, Chuzhanova N, Krawczak M, Kehrer-Sawatzki H, Stenson PD (2010) Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics. *Hum Mutat* 31:631-655.
- Cooper GM, Shendure J (2011) Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet* 12:628-640.
- Cottingham RW, Jr., Idury RM, Schaffer AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53:252-263.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894-898.
- Crimella C, Tonelli A, Airoidi G, Baschiroto C, D'Angelo MG, Bonato S, Losito L, Trabacca A, Bresolin N, Bassi MT (2010) The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *J Med Genet* 47:712-716.
- Cruz C, Glavic A, Casado M, de Celis JF (2009) A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 183:1005-1026.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marin I, Vilchez JJ, Palau F (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30:22-25.
- Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG (2007) The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* 131:243-257.
- Cutting GR (2010) Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1214:57-69.
- Chan RY, Boudreau-Lariviere C, Angus LM, Mankal FA, Jasmin BJ (1999) An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4627-4632.
- Chance PF (2006) Inherited focal, episodic neuropathies: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and hereditary neuralgic amyotrophy. *Neuromolecular Med* 8:159-174.
- Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Disteche CM, Bird TD (1993) DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72:143-151.

- Chen B, Guo A, Zhang C, Chen R, Zhu Y, Hong J, Kutschke W, Zimmerman K, Weiss RM, Zingman L, Anderson ME, Wehrens XH, Song LS (2013) Critical roles of junctophilin-2 in T-tubule and excitation-contraction coupling maturation during postnatal development. *Cardiovasc Res* 100:54-62.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160:189-200.
- Chen KF, Crowther DC (2012) Functional genomics in *Drosophila* models of human disease. *Brief Funct Genomics* 11:405-415.
- Chen LB, Xu JY, Yang Z, Wang GB (2007) Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration. *World J Gastroenterol* 13:5718-5724.
- Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, Corfas G (2006) Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci* 26:3079-3086.
- Cheng C, Bhardwaj N, Gerstein M (2009) The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics* 10:431.
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JA (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet* 39:715-720.
- Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, Dohmae N, Kogure M, Kang D, Neal DE, Ponder BA, Yamaue H, Nakamura Y, Hamamoto R (2012) RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia* 14:476-486.
- Choi BO, Park MH, Chung KW, Woo HM, Koo H, Chung HK, Choi KG, Park KD, Lee HJ, Hyun YS, Koo SK (2013) Clinical and histopathological study of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with a novel S90W mutation in BSCL2. *Neurogenetics* 14:35-42.
- Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, Harrell TM, McMillin MJ, Wiszniewski W, Gambin T, Coban Akdemir ZH, Doheny K, Scott AF, Avramopoulos D, Chakravarti A, Hoover-Fong J, Mathews D, Witmer PD, Ling H, Hetrick K, Watkins L, Patterson KE, Reinier F, Blue E, Muzny D, Kircher M, Bilguvar K, Lopez-Giraldez F, Sutton VR, Tabor HK, Leal SM, Gunel M, Mane S, Gibbs RA, Boerwinkle E, Hamosh A, Shendure J, Lupski JR, Lifton RP, Valle D, Nickerson DA, Bamshad MJ (2015) The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet* 97:199-215.
- Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2006) Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* 129:2103-2118.
- D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28:655-662.
- Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nurnberg P, Neto JC, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, Seemann P, Mundlos S (2009) Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *Am J Hum Genet* 84:483-492.
- Davila Lopez M, Martinez Guerra JJ, Samuelsson T (2010) Analysis of gene order conservation in eukaryotes identifies transcriptionally and functionally linked genes. *PLoS One* 5:e10654.
- Davis MD, Genebriera J, Sandroni P, Fealey RD (2006a) Thermoregulatory sweat testing in patients with erythromelalgia. *Arch Dermatol* 142:1583-1588.
- Davis MD, Weenig RH, Genebriera J, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Sandroni P (2006b) Histopathologic findings in primary erythromelalgia are nonspecific: special studies show a decrease in small nerve fiber density. *J Am Acad Dermatol* 55:519-522.
- de Almeida Nagata DE, Ting HA, Cavassani KA, Schaller MA, Mukherjee S, Ptaschinski C, Kunkel SL, Lukacs NW (2015) Epigenetic control of Foxp3 by SMYD3 H3K4 histone methyltransferase controls iTreg development and regulates pathogenic T-cell responses during pulmonary viral infection. *Mucosal Immunol* 8:1131-1143.
- De Arras L, Seng A, Lackford B, Keikhaee MR, Bowerman B, Freedman JH, Schwartz DA, Alper S (2013) An evolutionarily conserved innate immunity protein interaction network. *J Biol Chem* 288:1967-1978.
- de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605-610.
- De Celis JF (2003) Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* 25:443-451.
- de Celis JF (2013) Understanding the determinants of notch interactions with its ligands. *Sci Signal* 6:pe19.
- del Alamo D, Rouault H, Schweisguth F (2011) Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling. *Curr Biol* 21:R40-47.
- Del Bo R, Moggio M, Rango M, Bonato S, D'Angelo MG, Ghezzi S, Airoldi G, Bassi MT, Guglieri M, Napoli L, Lamperti C, Corti S, Federico A, Bresolin N, Comi GP (2008) Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. *Neurology* 71:1959-1966.
- Delay C, Calon F, Mathews P, Hebert SS (2011) Alzheimer-specific variants in the 3'UTR of Amyloid precursor protein affect microRNA function. *Mol Neurodegener* 6:70.

- Deleyrolle L, Sabourin JC, Rothhut B, Fujita H, Guichet PO, Teigell M, Ripoll C, Chauvet N, Perrin F, Mamaeva D, Noda T, Mori K, Yoshihara Y, Hugnot JP (2015) OCAM regulates embryonic spinal cord stem cell proliferation by modulating ErbB2 receptor. *PLoS One* 10:e0122337.
- Deuker MM, McMahon M (2014) Cancer biology: Enzyme meets a surprise target. *Nature* 510:225-226.
- Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG (2005) Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* 128:1847-1854.
- Diehl F, Brown MA, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Wietelmann A, Harriss J, Ferrazzi F, Bottger T, Harvey RP, Tucker PW, Engel FB (2010) Cardiac deletion of Smyd2 is dispensable for mouse heart development. *PLoS One* 5:e9748.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblaue S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151-156.
- Dong SW, Zhang H, Wang BL, Sun P, Wang YG, Zhang P (2014) Effect of the downregulation of SMYD3 expression by RNAi on RIZ1 expression and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 32:1064-1070.
- Donlin LT, Andresen C, Just S, Rudensky E, Pappas CT, Kruger M, Jacobs EY, Unger A, Zieseniss A, Dobenecker MW, Voelkel T, Chait BT, Gregorio CC, Rottbauer W, Tarakhovskiy A, Linke WA (2012) Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes Dev* 26:114-119.
- Drenth JP, Finley WH, Breedveld GJ, Testers L, Michiels JJ, Guillet G, Taieb A, Kirby RL, Heutink P (2001) The primary erythromelalgia-susceptibility gene is located on chromosome 2q31-32. *Am J Hum Genet* 68:1277-1282.
- Drenth JP, te Morsche RH, Guillet G, Taieb A, Kirby RL, Jansen JB (2005) SCN9A mutations define primary erythromelalgia as a neuropathic disorder of voltage gated sodium channels. *J Invest Dermatol* 124:1333-1338.
- Drenth JP, Te Morsche RH, Mansour S, Mortimer PS (2008) Primary erythromelalgia as a sodium channelopathy: screening for SCN9A mutations: exclusion of a causal role of SCN10A and SCN11A. *Arch Dermatol* 144:320-324.
- Drenth JP, Waxman SG (2007) Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. *J Clin Invest* 117:3603-3609.
- Drew AP, Zhu D, Kidambi A, Ly C, Tey S, Brewer MH, Ahmad-Annuar A, Nicholson GA, Kennerson ML (2015) Improved inherited peripheral neuropathy genetic diagnosis by whole-exome sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 3:143-154.
- Du SJ, Tan X, Zhang J (2014) SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function. *Anat Rec (Hoboken)* 297:1650-1662.
- Duclert A, Savatier N, Schaeffer L, Changeux JP (1996) Identification of an element crucial for the sub-synaptic expression of the acetylcholine receptor epsilon-subunit gene. *J Biol Chem* 271:17433-17438.
- Duchen MR (2012) Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflugers Arch* 464:111-121.
- Dusl M, Senderek J, Muller JS, Vogel JG, Pertl A, Stucka R, Lochmuller H, David R, Abicht A (2015) A 3'-UTR mutation creates a microRNA target site in the GFPT1 gene of patients with congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 24:3418-3426.
- Dyck PJ (1975) Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory, and autonomic neurons. In: *Peripheral neuropathy* (Dyck P.J., T. P. K., Lambert E.H., ed), pp 825-867 Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA (1993) Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral Neuropathy* (Dyck P. J., T. P. K., Griffin J. W., Low P. A., Poduslo J. F., ed), pp 1094-1136 Philadelphia: Saunders Company.
- Eberle CA, Zayas M, Stukalov A, Pichlmair A, Alvisi G, Muller AC, Bennett KL, Bartenschlager R, Superti-Furga G (2014) The lysine methyltransferase SMYD3 interacts with hepatitis C virus NS5A and is a negative regulator of viral particle production. *Virology* 462-463:34-41.
- Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Carlier P, Carlier RY, Sabouraud P, Pereon Y, Chapon F, Thauvin-Robinet C, Laforet P, Eymard B, Latour P, Stojkovic T (2014) Phenotypic spectrum and incidence of TRPV4 mutations in patients with inherited axonal neuropathy. *Neurology* 82:1919-1926.
- Eid JP, Arias AM, Robertson H, Hime GR, Dziadek M (2008) The *Drosophila* STIM1 orthologue, dSTIM, has roles in cell fate specification and tissue patterning. *BMC Dev Biol* 8:104.
- Elnitski L, Burhans R, Riemer C, Hardison R, Miller W (2010) MultiPipMaker: a comparative alignment server for multiple DNA sequences. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 10:Unit10 14.

- Estela A, Pla-Martin D, Sanchez-Piris M, Sesaki H, Palau F (2011) Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* *fis1* gene-defective cells. *J Biol Chem* 286:36777-36786.
- Evangelista T, Bansagi B, Pyle A, Griffin H, Douroudis K, Polvikoski T, Antoniadis T, Bushby K, Straub V, Chinnery PF, Lochmuller H, Horvath R (2015) Phenotypic variability of TRPV4 related neuropathies. *Neuromuscul Disord* 25:516-521.
- Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Cheng X, Han C, Ahn HS, Persson AK, Hoeijmakers JG, Gerrits MM, Pierro T, Lombardi R, Kapetis D, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2012) Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19444-19449.
- Falk J, Rohde M, Bekhite MM, Neugebauer S, Hemmerich P, Kiehnopf M, Deufel T, Hubner CA, Beetz C (2014) Functional mutation analysis provides evidence for a role of REEP1 in lipid droplet biology. *Hum Mutat* 35:497-504.
- Fan HD, Chen SP, Sun YX, Xu SH, Wu LJ (2015) Seipin mutation at glycosylation sites activates autophagy in transfected cells via abnormal large lipid droplets generation. *Acta Pharmacol Sin* 36:497-506.
- Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ (2010) Gene copy number variation and common human disease. *Clin Genet* 77:201-213.
- Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M (2006) SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52:767-774.
- Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P (2015) Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2174-2181.
- Fiuza UM, Arias AM (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 194:459-474.
- Fortini ME (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 16:633-647.
- Fox RJ, Galetta SL, Mahalingam R, Wellish M, Forghani B, Gilden DH (2001) Acute, chronic, and recurrent varicella zoster virus neuropathy without zoster rash. *Neurology* 57:351-354.
- Friedman AA, Tucker G, Singh R, Yan D, Vinayagam A, Hu Y, Binari R, Hong P, Sun X, Porto M, Pacifico S, Murali T, Finley RL, Jr., Asara JM, Berger B, Perrimon N (2011) Proteomic and functional genomic landscape of receptor tyrosine kinase and ras to extracellular signal-regulated kinase signaling. *Sci Signal* 4:rs10.
- Fujii T, Tsunesumi S, Yamaguchi K, Watanabe S, Furukawa Y (2011) Smyd3 is required for the development of cardiac and skeletal muscle in zebrafish. *PLoS One* 6:e23491.
- Fukuchi M, Tsuda M (2010) Involvement of the 3'-untranslated region of the brain-derived neurotrophic factor gene in activity-dependent mRNA stabilization. *J Neurochem* 115:1222-1233.
- Gabriel JM, Erne B, Pareyson D, Sghirlanzoni A, Taroni F, Steck AJ (1997) Gene dosage effects in hereditary peripheral neuropathy. Expression of peripheral myelin protein 22 in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies nerve biopsies. *Neurology* 49:1635-1640.
- Gambetta K, Al-Ahdab MK, Ilbawi MN, Hassaniya N, Gupta M (2008) Transcription repression and blocks in cell cycle progression in hypoplastic left heart syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2268-2275.
- Garbino A, van Oort RJ, Dixit SS, Landstrom AP, Ackerman MJ, Wehrens XH (2009) Molecular evolution of the junctophilin gene family. *Physiol Genomics* 37:175-186.
- Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L (2013) Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol* 14:e358-369.
- Gavin C, Langan Y, Hutchinson M (1997) Cranial and peripheral neuropathy due to Epstein-Barr virus infection. *Postgrad Med J* 73:419-420.
- Genin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F (2008) Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet* 124:357-368.
- Giambonini-Brugnoli G, Buchstaller J, Sommer L, Suter U, Mantei N (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis* 18:656-668.
- Gibson MC, Schubiger G (2000) Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 103:343-350.
- Golic KG, Lindquist S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59:499-509.
- Golini L, Chouabe C, Berthier C, Cusimano V, Fornaro M, Bonvallet R, Formoso L, Giacomello E, Jacquemond V, Sorrentino V (2011) Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca²⁺ channel dihydropyridine receptors (DHPRs) in skeletal muscle. *J Biol Chem* 286:43717-43725.
- Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, Kousi M, Griffin LB, Francescato L, Ozes B, Karaca E, Jhangiani SN, Bainbridge MN, Lawson KS, Pehlivan D, Okamoto Y, Withers M, Mancias P, Slavotinek A, Reitnauer PJ, Goksungur MT, Shy M, Crawford TO, Koenig M, Willer J, Flores BN, Padiadittrakis I, Us O, Wiszniewski W, Parman Y, Antonellis A, Muzny DM, Katsanis N, Battaloglu E, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR

- (2015) Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy. *Cell Rep* 12:1169-1183.
- Gonzalez M, Falk MJ, Gai X, Postrel R, Schule R, Zuchner S (2015) Innovative Genomic Collaboration Using the GENESIS (GEM.app) Platform. *Hum Mutat* 36:950-956.
- Gonzalez MA, Lebrigio RF, Van Booven D, Ulloa RH, Powell E, Speziani F, Tekin M, Schule R, Zuchner S (2013) GENomes Management Application (GEM.app): a new software tool for large-scale collaborative genome analysis. *Hum Mutat* 34:842-846.
- Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, Yamagishi H, Weihe EK, Harriss JV, Maika SD, Kuziel WA, King HL, Olson EN, Nakagawa O, Srivastava D (2002) Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat Genet* 31:25-32.
- Gouttenoire EA, Lupo V, Calpena E, Bartesaghi L, Schupfer F, Medard JJ, Maurer F, Beckmann JS, Senderek J, Palau F, Espinos C, Chrast R (2013) Sh3tc2 deficiency affects neuregulin-1/ErbB signaling. *Glia* 61:1041-1051.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471:473-479.
- Green EM, Morrison AJ, Gozani O (2012) New marks on the block: Set5 methylates H4 lysines 5, 8 and 12. *Nucleus* 3:335-339.
- Grizot S, Fieschi F, Dagher MC, Pebay-Peyroula E (2001) The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 276:21627-21631.
- Gurniak CB, Chevessier F, Jokwitz M, Jonsson F, Perlas E, Richter H, Matern G, Boyl PP, Chaponnier C, Furst D, Schroder R, Witke W (2014) Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *Eur J Cell Biol* 93:252-266.
- Gusella JF, MacDonald ME (2009) Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Med* 1:80.
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441:646-650.
- Haghnejad L, Emamalizadeh B, Jamshidi J, Bidoki AZ, Ghaedi H, Ahmadi E, Abdollahi S, Shahmohammadibeni N, Taghavi S, Fazeli A, Motallebi M, Zarneh AE, Mohammadihosseinabad S, Abbaszadegan MR, Torkamandi S, Gavenaroudi MA, Pedram N, Shahidi GA, Tafakhori A, Darvish H, Movafagh A (2015) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 is a risk factor for Parkinson's disease in Iranian population. *J Neurol Sci* 355:72-74.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagy R, Nakamura Y (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6:731-740.
- Hamamoto R, Saloura V, Nakamura Y (2015) Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 15:110-124.
- Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y (2006) Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci* 97:113-118.
- Hamamoto R, Toyokawa G, Nakakido M, Ueda K, Nakamura Y (2014) SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation. *Cancer Lett* 351:126-133.
- Hamlin JA, Fang H, Schwob JE (2004) Differential expression of the mammalian homologue of fasciclin II during olfactory development in vivo and in vitro. *J Comp Neurol* 474:438-452.
- Han C, Dib-Hajj SD, Lin Z, Li Y, Eastman EM, Tyrrell L, Cao X, Yang Y, Waxman SG (2009) Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation. *Brain* 132:1711-1722.
- Han MR, Schellenberg GD, Wang LS (2010) Genome-wide association reveals genetic effects on human Abeta42 and tau protein levels in cerebrospinal fluids: a case control study. *BMC Neurol* 10:90.
- Hannibal MC, Ruzzo EK, Miller LR, Betz B, Buchan JG, Knutzen DM, Barnett K, Landsverk ML, Brice A, LeGuern E, Bedford HM, Worrall BB, Lovitt S, Appel SH, Andermann E, Bird TD, Chance PF (2009) SEPT9 gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology* 72:1755-1759.
- Harel T, Lupski JR (2014) Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clin Genet* 86:422-431.

- He C, Xu J, Zhang J, Xie D, Ye H, Xiao Z, Cai M, Xu K, Zeng Y, Li H, Wang J (2012) High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 43:1425-1435.
- Hidalgo C, Donoso P (2008) Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10:1275-1312.
- Hill JA, Diwan A (2013) Ca²⁺ leak in atrial fibrillation: junctophilin-2 stabilizes ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 62:2020-2022.
- Hirata Y, Brotto M, Weisleder N, Chu Y, Lin P, Zhao X, Thornton A, Komazaki S, Takeshima H, Ma J, Pan Z (2006) Uncoupling store-operated Ca²⁺ entry and altered Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilin genes. *Biophys J* 90:4418-4427.
- Hirth F (2010) *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:504-523.
- Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL (2001) A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet* 29:377-378.
- Hori K, Sen A, Kirchhausen T, Artavanis-Tsakonas S (2012) Regulation of ligand-independent Notch signal through intracellular trafficking. *Commun Integr Biol* 5:374-376.
- Hou X, Chen J, Luo Y, Liu F, Xu G, Gao Y (2013) Silencing of STIM1 attenuates hypoxia-induced PSMCs proliferation via inhibition of the SOC/Ca²⁺/NFAT pathway. *Respir Res* 14:2.
- Hu L, Zhu YT, Qi C, Zhu YJ (2009) Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. *Cancer Res* 69:4067-4072.
- Huang J, Han C, Estacion M, Vasylyev D, Hoeijmakers JG, Gerrits MM, Tyrrell L, Lauria G, Faber CG, Dib-Hajj SD, Merkies IS, Waxman SG (2014) Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy. *Brain* 137:1627-1642.
- Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 444:629-632.
- Huber N, Guimaraes S, Schrader M, Suter U, Niemann A (2013) Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep* 14:545-552.
- Hurst LD, Pal C, Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* 5:299-310.
- Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER, Cuccaro ML, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA (2011) A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. *Mol Autism* 2:1.
- Hwa JJ, Hiller MA, Fuller MT, Santel A (2002) Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes fuzzy onions (*fzo*) and *dmfn*. *Mech Dev* 116:213-216.
- Hwang I, Gottlieb PD (1997) The *Bop* gene adjacent to the mouse CD8b gene encodes distinct zinc-finger proteins expressed in CTLs and in muscle. *J Immunol* 158:1165-1174.
- Ichikawa K, Nezu A (2005) Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies in childhood: report of a case and a brief review. *Brain Dev* 27:152-154.
- Ichinohe N, Yoshihara Y, Hashikawa T, Rockland KS (2003) Developmental study of dendritic bundles in layer 1 of the rat granular retrosplenial cortex with special reference to a cell adhesion molecule, OCAM. *Eur J Neurosci* 18:1764-1774.
- Irobi J, Van den Bergh P, Merlini L, Verellen C, Van Maldergem L, Dierick I, Verpoorten N, Jordanova A, Windpassinger C, De Vriendt E, Van Gerwen V, Auer-Grumbach M, Wagner K, Timmerman V, De Jonghe P (2004) The phenotype of motor neuropathies associated with BSCL2 mutations is broader than Silver syndrome and distal HMN type V. *Brain* 127:2124-2130.
- Ito D, Suzuki N (2009) Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain* 132:8-15.
- Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K, Takeshima H (2001) Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* 154:1059-1067.
- Jaworski A, Smith CL, Burden SJ (2007) GA-binding protein is dispensable for neuromuscular synapse formation and synapse-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 27:5040-5046.
- Jetten AM, Suter U (2000) The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64:97-129.
- Jeyaraju DV, Cisbani G, Pellegrini L (2009) Calcium regulation of mitochondria motility and morphology. *Biochim Biophys Acta* 1787:1363-1373.
- Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 24:1365-1377.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275-282.

- Josse R, Dumont J, Fautrel A, Robin MA, Guillouzo A (2012) Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 258:176-187.
- Just S, Meder B, Berger IM, Etard C, Trano N, Patzel E, Hassel D, Marquart S, Dahme T, Vogel B, Fishman MC, Katus HA, Strahle U, Rottbauer W (2011) The myosin-interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization. *J Cell Sci* 124:3127-3136.
- Kaltenbach LS, Romero E, Becklin RR, Chettier R, Bell R, Phansalkar A, Strand A, Torcassi C, Savage J, Hurlburt A, Cha GH, Ukani L, Chepanoske CL, Zhen Y, Sahasrabudhe S, Olson J, Kurschner C, Ellerby LM, Peltier JM, Botas J, Hughes RE (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 3:e82.
- Kasahara A, Cipolat S, Chen Y, Dorn GW, 2nd, Scorrano L (2013) Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling. *Science* 342:734-737.
- Katz B, Minke B (2009) Drosophila photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci* 3:2.
- Kaufman RJ, Malhotra JD (2014) Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1843:2233-2239.
- Kawamura S, Yoshigai E, Kuhara S, Tashiro K (2008) smyd1 and smyd2 are expressed in muscle tissue in *Xenopus laevis*. *Cytotechnology* 57:161-168.
- Kazantsev A, Walker HA, Slepko N, Bear JE, Preisinger E, Steffan JS, Zhu YZ, Gertler FB, Housman DE, Marsh JL, Thompson LM (2002) A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat Genet* 30:367-376.
- Kearney JA (2011) Genetic modifiers of neurological disease. *Curr Opin Genet Dev* 21:349-353.
- Khurana TS, Rosmarin AG, Shang J, Krag TO, Das S, Gammeltoft S (1999) Activation of utrophin promoter by heregulin via the ets-related transcription factor complex GA-binding protein alpha/beta. *Mol Biol Cell* 10:2075-2086.
- Kim S, Kim KT (2014) Therapeutic Approaches for Inhibition of Protein Aggregation in Huntington's Disease. *Exp Neurobiol* 23:36-44.
- Klein CJ (2007) The inherited neuropathies. *Neurol Clin* 25:173-207.
- Klein CJ, Duan X, Shy ME (2013a) Inherited neuropathies: clinical overview and update. *Muscle Nerve* 48:604-622.
- Klein CJ, Shi Y, Fecto F, Donaghy M, Nicholson G, McEntagart ME, Crosby AH, Wu Y, Lou H, McEvoy KM, Siddique T, Deng HX, Dyck PJ (2011) TRPV4 mutations and cytotoxic hypercalcemia in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Neurology* 76:887-894.
- Klein CJ, Wu Y, Kilfoyle DH, Sandroni P, Davis MD, Gavrilova RH, Low PA, Dyck PJ (2013b) Infrequent SCN9A mutations in congenital insensitivity to pain and erythromelalgia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:386-391.
- Ko JK, Choi KH, Zhao X, Komazaki S, Pan Z, Weisleder N, Ma J (2011) A versatile single-plasmid system for tissue-specific and inducible control of gene expression in transgenic mice. *FASEB J* 25:2638-2649.
- Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Nagata H, Nishimura Y, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E (2015) Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer. *Br J Cancer* 112:357-364.
- Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki KI, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J (2009) Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 30:1139-1146.
- Koo HJ, Piao Y, Pak YK (2012) Endoplasmic reticulum stress impairs insulin signaling through mitochondrial damage in SH-SY5Y cells. *Neurosignals* 20:265-280.
- Kostera-Pruszczyk A, Kosinska J, Pollak A, Stawinski P, Walczak A, Wasilewska K, Potulska-Chromik A, Szczudlik P, Kaminska A, Ploski R (2014) Exome sequencing reveals mutations in MFN2 and GDAP1 in severe Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 19:242-245.
- Kotulska K, Larysz-Brysz M, LePecheur M, Marcol W, Lewin-Kowalik J, Paly E, London J (2010) APP overexpression prevents neuropathic pain and motoneuron death after peripheral nerve injury in mice. *Brain Res Bull* 81:378-384.
- Koutsis G, Lynch D, Manone A, Karadima G, Reilly MM, Houlden H, Panas M (2015) Charcot-Marie-Tooth disease type 2C and scapuloperoneal muscular atrophy overlap syndrome in a patient with the R232C TRPV4 mutation. *J Neurol* 262:1972-1975.
- Krebs J, Agellon LB, Michalak M (2015) Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460:114-121.
- Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramirez JD, Zea J, Burley MW, Bedoya G, Bennett DL, Wood JN, Ruiz-Linares A (2010) A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66:671-680.

- Kremneva E, Makkonen MH, Skwarek-Maruszczyńska A, Gateva G, Michelot A, Dominguez R, Lappalainen P (2014) Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Dev Cell* 31:215-226.
- Kuhlenbaumer G, Hannibal MC, Nelis E, Schirmacher A, Verpoorten N, Meuleman J, Watts GD, De Vriendt E, Young P, Stogbauer F, Halfter H, Irobi J, Goossens D, Del-Favero J, Betz BG, Hor H, Kurlemann G, Bird TD, Airaksinen E, Mononen T, Serradell AP, Prats JM, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Timmerman V, Ringelstein EB, Chance PF (2005) Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. *Nat Genet* 37:1044-1046.
- Kuhlenbaumer G, Meuleman J, De Jonghe P, Falck B, Young P, Hunermund G, Van Broeckhoven C, Timmerman V, Stogbauer F (2001) Hereditary Neuralgic Amyotrophy (HNA) is genetically heterogeneous. *J Neurol* 248:861-865.
- Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, Furukawa Y (2007) The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res* 67:10759-10765.
- Kunkel LM, Tantravahi U, Eisenhard M, Latt SA (1982) Regional localization on the human X of DNA segments cloned from flow sorted chromosomes. *Nucleic Acids Res* 10:1557-1578.
- LaMarco K, Thompson CC, Byers BP, Walton EM, McKnight SL (1991) Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science* 253:789-792.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczyk J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chisoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korfi I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Landouere G, Zdebek AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, Inada H, Shi Y, Taye AA, Kong L, Munns CH, Choo SS, Phelps CB, Paudel R, Houlden H, Ludlow CL, Caterina MJ, Gaudet R, Kleta R, Fischbeck KH, Sumner CJ (2010) Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet* 42:170-174.
- Landstrom AP, Beavers DL, Wehrens XH (2014) The junctophilin family of proteins: from bench to bedside. *Trends Mol Med* 20:353-362.
- Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, van Oort RJ, Garbino A, Weisleder N, Ma J, Wehrens XH, Ackerman MJ (2011) Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circ Heart Fail* 4:214-223.
- Landsverk ML, Ruzzo EK, Mefford HC, Buysse K, Buchan JG, Eichler EE, Petty EM, Peterson EA, Knutzen DM, Barnett K, Farlow MR, Caress J, Parry GJ, Quan D, Gardner KL, Hong M, Simmons Z, Bird TD, Chance PF, Hannibal MC (2009) Duplication within the SEPT9 gene associated with a founder effect in North American families with hereditary neuralgic amyotrophy. *Hum Mol Genet* 18:1200-1208.

- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3443-3446.
- Lawlor ER, Thiele CJ (2012) Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res* 18:2768-2779.
- Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM (2005) Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 65:197-204.
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25:1307-1320.
- Lee C, Scherer SW (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* 12:e8.
- Lee JM, Sonnhammer EL (2003) Genomic gene clustering analysis of pathways in eukaryotes. *Genome Res* 13:875-882.
- Leinhart K, Brown M (2011) SET/MYND Lysine Methyltransferases Regulate Gene Transcription and Protein Activity. *Genes (Basel)* 2:210-218.
- Lemke G (2006) Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006:pe11.
- Lenz S, Karsten P, Schulz JB, Voigt A (2013) Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 127:453-460.
- Lewis RS (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446:284-287.
- Li H, Ding X, Lopez JR, Takeshima H, Ma J, Allen PD, Eltit JM (2010) Impaired Orai1-mediated resting Ca²⁺ entry reduces the cytosolic [Ca²⁺] and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in quiescent junctophilin 1 knock-out myotubes. *J Biol Chem* 285:39171-39179.
- Li H, Xu J, Bian YH, Rotllant P, Shen T, Chu W, Zhang J, Schneider M, Du SJ (2011) Smyd1b_tv1, a key regulator of sarcomere assembly, is localized on the M-line of skeletal muscle fibers. *PLoS One* 6:e28524.
- Li H, Zhong Y, Wang Z, Gao J, Xu J, Chu W, Zhang J, Fang S, Du SJ (2013a) Smyd1b is required for skeletal and cardiac muscle function in zebrafish. *Mol Biol Cell* 24:3511-3521.
- Li RC, Tao J, Guo YB, Wu HD, Liu RF, Bai Y, Lv ZZ, Luo GZ, Li LL, Wang M, Yang HQ, Gao W, Han QD, Zhang YY, Wang XJ, Xu M, Wang SQ (2013b) In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res* 112:601-605.
- Liang CL, Hsi E, Chen KC, Pan YR, Wang YS, Juo SH (2011) A functional polymorphism at 3'UTR of the PAX6 gene may confer risk for extreme myopia in the Chinese. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:3500-3505.
- Liang X, Mei Y, Huang X, Shen G, Zhu D, Yu Y, Wang J, Lou Y (2012) Junctophilin 2 knockdown interfere with mitochondrion status in ESC-CMs and cardiogenesis of ES cells. *J Cell Biochem* 113:2884-2894.
- Liu C, Wang C, Wang K, Liu L, Shen Q, Yan K, Sun X, Chen J, Liu J, Ren H, Liu H, Xu Z, Hu S, Xu D, Fan Y (2013) SMYD3 as an oncogenic driver in prostate cancer by stimulation of androgen receptor transcription. *J Natl Cancer Inst* 105:1719-1728.
- Liu C, Zhang F, Li T, Lu M, Wang L, Yue W, Zhang D (2012) MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics* 13:661.
- Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem* 72:1781-1790.
- Lopez Del Amo V, Seco-Cervera M, Garcia-Gimenez JL, Whitworth AJ, Pallardo FV, Galindo MI (2015) Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mol Genet* 24:21-36.
- Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65:1009-1025.
- Luik RM, Wu MM, Buchanan J, Lewis RS (2006) The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 174:815-825.
- Luo XG, Xi T, Guo S, Liu ZP, Wang N, Jiang Y, Zhang TC (2009) Effects of SMYD3 overexpression on transformation, serum dependence, and apoptosis sensitivity in NIH3T3 cells. *IUBMB Life* 61:679-684.
- Luo XG, Zhang CL, Zhao WW, Liu ZP, Liu L, Mu A, Guo S, Wang N, Zhou H, Zhang TC (2014) Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett* 344:129-137.
- Luo XG, Zou JN, Wang SZ, Zhang TC, Xi T (2010) Novobiocin decreases SMYD3 expression and inhibits the migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *IUBMB Life* 62:194-199.
- Lupo V, García-García F, Sancho P, Tello C, García-Romero M, Villarreal L, Alberti A, Sivera R, Dopazo J, Pascual-Pascual SJ, Márquez-Infante C, Casanovas C, Sevilla T, Espinós C (2015) Targeted next generation sequencing shows the complexity of genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary motor neuropathy. *J Mol Diagn.*

- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI (1991) DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66:219-232.
- Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, Rio Deiros D, Chen DC, Nazareth L, Bainbridge M, Dinh H, Jing C, Wheeler DA, McGuire AL, Zhang F, Stankiewicz P, Halperin JJ, Yang C, Gehman C, Guo D, Irikat RK, Tom W, Fantin NJ, Muzny DM, Gibbs RA (2010) Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362:1181-1191.
- Lyon GJ, Wang K (2012) Identifying disease mutations in genomic medicine settings: current challenges and how to accelerate progress. *Genome Med* 4:58.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266:17067-17071.
- Llamusi B, Bargiela A, Fernandez-Costa JM, Garcia-Lopez A, Klima R, Feiguin F, Artero R (2013) Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis Model Mech* 6:184-196.
- Lloyd TE, Taylor JP (2010) Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1184:e1-20.
- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755-765.
- Makino T, McLysaght A (2010) Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9270-9274.
- Mamaeva OA, Kim J, Feng G, McDonald JM (2009) Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates notch-1 signaling in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 106:25-32.
- Mammucari C, Tommasi di Vignano A, Sharov AA, Neilson J, Havrda MC, Roop DR, Botchkarev VA, Crabtree GR, Dotto GP (2005) Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* 8:665-676.
- Manganelli F, Pisciotta C, Nolano M, Capponi S, Geroldi A, Topa A, Bellone E, Suls A, Mandich P, Santoro L (2012) A novel autosomal dominant GDAP1 mutation in an Italian CMT2 family. *J Peripher Nerv Syst* 17:351-355.
- Mangone M, Manoharan AP, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Han T, Mackowiak SD, Mis E, Zegar C, Gutwein MR, Khivansara V, Attie O, Chen K, Salehi-Ashtiani K, Vidal M, Harkins TT, Bouffard P, Suzuki Y, Sugano S, Kohara Y, Rajewsky N, Piano F, Gunsalus KC, Kim JK (2010) The landscape of *C. elegans* 3'UTRs. *Science* 329:432-435.
- Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdeux V (2009) Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4:20.
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marin I (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 21:176-187.
- Martin AC, Willoughby D, Ciruela A, Ayling LJ, Pagano M, Wachten S, Tengholm A, Cooper DM (2009) Capacitative Ca²⁺ entry via Orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8. *Mol Pharmacol* 75:830-842.
- Martyn CN, Hughes RA (1997) Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62:310-318.
- Matts RL, Manjarrez JR (2009) Assays for identification of Hsp90 inhibitors and biochemical methods for discriminating their mechanism of action. *Curr Top Med Chem* 9:1462-1478.
- Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, Jansen PW, Wilkinson AW, Liu S, Barbash O, Van Aller GS, Huddleston M, Dhanak D, Tummino PJ, Kruger RG, Garcia BA, Butte AJ, Vermeulen M, Sage J, Gozani O (2014) SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature* 510:283-287.
- McDade SS, Hall PA, Russell SE (2007) Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease. *Hum Mol Genet* 16:742-752.
- Medjkane S, Cock-Rada A, Weitzman JB (2012) Role of the SMYD3 histone methyltransferase in tumorigenesis: local or global effects? *Cell Cycle* 11:1865.
- Meulemann J, Kuhlenbaumer G, Schirmacher A, Wehnert M, De Jonghe P, De Vriendt E, Young P, Airaksinen E, Pou-Serradell A, Prats JM, Ringelstein B, Stogbauer F, Van Broeckhoven C, Timmerman V (1999) Genetic refinement of the hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) locus at chromosome 17q25. *Eur J Hum Genet* 7:920-927.
- Minamisawa S, Oshikawa J, Takeshima H, Hoshijima M, Wang Y, Chien KR, Ishikawa Y, Matsuoka R (2004) Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 325:852-856.
- Mishra M, Knust E (2013) Analysis of the *Drosophila* compound eye with light and electron microscopy. *Methods Mol Biol* 935:161-182.

- Molnar C, Lopez-Varea A, Hernandez R, de Celis JF (2006) A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 174:1635-1659.
- Moriguchi S, Nishi M, Komazaki S, Sakagami H, Miyazaki T, Masumiya H, Saito SY, Watanabe M, Kondo H, Yawo H, Fukunaga K, Takeshima H (2006) Functional uncoupling between Ca²⁺ release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10811-10816.
- Moriguchi S, Nishi M, Sasaki Y, Takeshima H, Fukunaga K (2015) Aberrant behavioral sensitization by methamphetamine in junctophilin-deficient mice. *Mol Neurobiol* 51:533-542.
- Morou AK, Porichis F, Krambovitis E, Sourvinos G, Spandidos DA, Zafiropoulos A (2011) The HIV-1 gp120/V3 modifies the response of uninfected CD4 T cells to antigen presentation: mapping of the specific transcriptional signature. *J Transl Med* 9:160.
- Mostowy S, Cossart P (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:183-194.
- Muglia M, Vazza G, Patitucci A, Milani M, Pareyson D, Taroni F, Quattrone A, Mostacciolo ML (2007) A novel founder mutation in the MFN2 gene associated with variable Charcot-Marie-Tooth type 2 phenotype in two families from Southern Italy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:1286-1287.
- Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ, Knoblich JA (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458:987-992.
- Murphy RM, Dutka TL, Horvath D, Bell JR, Delbridge LM, Lamb GD (2013) Ca²⁺-dependent proteolysis of junctophilin-1 and junctophilin-2 in skeletal and cardiac muscle. *J Physiol* 591:719-729.
- Murphy SM, Herrmann DN, McDermott MP, Scherer SS, Shy ME, Reilly MM, Pareyson D (2011) Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 16:191-198.
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castleman V, Manji H, Lunn MP, Bull K, Ramdharry G, Davis M, Blake JC, Houlden H, Reilly MM (2012) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:706-710.
- Nagata K, Hama I, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2014) microRNA-124 is down regulated in nerve-injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3. *Neuroscience* 256:426-432.
- Napoli I, Noon LA, Ribeiro S, Kerai AP, Parrinello S, Rosenberg LH, Collins MJ, Harrisingh MC, White JJ, Woodhoo A, Lloyd AC (2012) A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. *Neuron* 73:729-742.
- Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, Belpaire-Dethiou MC, Ceuterick C, Van Gerwen V, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Gabreels-Festen AA, Verellen C, Tan E, Demirci M, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Topaloglu H, Timmerman V (2002) Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 59:1865-1872.
- Newbern J, Birchmeier C (2010) Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin Cell Dev Biol* 21:922-928.
- Ngho GA, Papanicolaou KN, Walsh K (2012) Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 287:20321-20332.
- Nicolai M, Lasbleiz C, Dura JM (2003) Gain-of-function screen identifies a role of the Src64 oncogene in *Drosophila* mushroom body development. *J Neurobiol* 57:291-302.
- Nichols P, Croxen R, Vincent A, Rutter R, Hutchinson M, Newsom-Davis J, Beeson D (1999) Mutation of the acetylcholine receptor epsilon-subunit promoter in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 45:439-443.
- Nielsen J, Gotfryd K, Li S, Kulahin N, Soroka V, Rasmussen KK, Bock E, Berezin V (2009) Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-neural cell adhesion molecule (NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF. *J Neurosci* 29:11360-11376.
- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217-242.
- Niemann A, Huber N, Wagner KM, Somandin C, Horn M, Lebrun-Julien F, Angst B, Pereira JA, Halfter H, Welzl H, Feltri ML, Wrabetz L, Young P, Wessig C, Toyka KV, Suter U (2014) The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 137:668-682.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170:1067-1078.
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U (2009) GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 36:509-520.

- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.
- Nishi M, Hashimoto K, Kuriyama K, Komazaki S, Kano M, Shibata S, Takeshima H (2002) Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem Biophys Res Commun* 292:318-324.
- Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, Takeshima H (2000) Characterization of human junctophilin subtype genes. *Biochem Biophys Res Commun* 273:920-927.
- Nishi M, Sakagami H, Komazaki S, Kondo H, Takeshima H (2003) Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 118:102-110.
- Noack R, Frede S, Albrecht P, Henke N, Pfeiffer A, Knoll K, Dehmel T, Meyer Zu Horste G, Stettner M, Kieseier BC, Summer H, Golz S, Kochanski A, Wiedau-Pazos M, Arnold S, Lewerenz J, Methner A (2012) Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet* 21:150-162.
- Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Sunil Rao J, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillespie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van Meter T, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD (2009) Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet* 41:465-472.
- Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291:2423-2428.
- O'Byrne KJ, Baird AM, Kilmartin L, Leonard J, Sacevich C, Gray SG (2011) Epigenetic regulation of glucose transporters in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)* 3:1550-1565.
- O'Leary DA, Noakes PG, Lavidis NA, Kola I, Hertzog PJ, Risteovski S (2007) Targeting of the ETS factor GABPalpha disrupts neuromuscular junction synaptic function. *Mol Cell Biol* 27:3470-3480.
- Ockeloen CW, Gilhuis HJ, Pfundt R, Kamsteeg EJ, Agrawal PB, Beggs AH, Dara Hama-Amin A, Diekstra A, Knoers NV, Lammens M, van Alfen N (2012) Congenital myopathy caused by a novel missense mutation in the CFL2 gene. *Neuromuscul Disord* 22:632-639.
- Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, Feske S, Rao A (2008) Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9:432-443.
- Ohno K, Anlar B, Engel AG (1999) Congenital myasthenic syndrome caused by a mutation in the Ets-binding site of the promoter region of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene. *Neuromuscul Disord* 9:131-135.
- Ongwijitwat S, Wong-Riley MT (2005) Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene* 360:65-77.
- Ott J, Wang J, Leal SM (2015) Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 16:275-284.
- Palau F, Lofgren A, De Jonghe P, Bort S, Nelis E, Sevilla T, Martin JJ, Vilchez J, Prieto F, Van Broeckhoven C (1993) Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2:2031-2035.
- Palotie A, Widen E, Ripatti S (2013) From genetic discovery to future personalized health research. *N Biotechnol* 30:291-295.
- Pandey UB, Nichols CD (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 63:411-436.
- Pandit A, Vadnal J, Houston S, Freeman E, McDonough J (2009) Impaired regulation of electron transport chain subunit genes by nuclear respiratory factor 2 in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 279:14-20.
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Antonarakis SE (1997) Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics* 43:43-51.
- Papagregoriou G, Erguler K, Dweep H, Voskarides K, Koupepidou P, Athanasiou Y, Pierides A, Gretz N, Felekis KN, Deltas C (2012) A miR-1207-5p binding site polymorphism abolishes regulation of HBEGF and is associated with disease severity in CFHR5 nephropathy. *PLoS One* 7:e31021.
- Pareyson D, Marchesi C (2009) Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 8:654-667.
- Pareyson D, Saveri P, Sagnelli A, Piscosquito G (2015) Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett* 596:66-77.
- Park CY, Pierce SA, von Drehle M, Ivey KN, Morgan JA, Blau HM, Srivastava D (2010) skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20750-20755.

- Patton J, Block S, Coombs C, Martin ME (2006) Identification of functional elements in the murine Gabp alpha/ATP synthase coupling factor 6 bi-directional promoter. *Gene* 369:35-44.
- Patzko A, Shy ME (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11:78-88.
- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Farinas I, Palau F (2008) Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 12:679-689.
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14:1087-1094.
- Pellegrino JE, George RA, Biegel J, Farlow MR, Gardner K, Caress J, Brown MJ, Rebbeck TR, Bird TD, Chance PF (1997) Hereditary neuralgic amyotrophy: evidence for genetic homogeneity and mapping to chromosome 17q25. *Hum Genet* 101:277-283.
- Pellegrino JE, Rebbeck TR, Brown MJ, Bird TD, Chance PF (1996) Mapping of hereditary neuralgic amyotrophy (familial brachial plexus neuropathy) to distal chromosome 17q. *Neurology* 46:1128-1132.
- Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa AJ, Di Virgilio V, Fittipaldi R, Fabini E, Bertucci C, Varchi G, Moyer MP, Caretti G, Del Rio A, Simone C (2015) A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol* 230:2447-2460.
- Petit F, Plessis G, Decamp M, Cuisset JM, Blyth M, Pendlebury M, Andrieux J (2015) 21q21 deletion involving NCAM2: report of 3 cases with neurodevelopmental disorders. *Eur J Med Genet* 58:44-46.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phan D, Rasmussen TL, Nakagawa O, McAnally J, Gottlieb PD, Tucker PW, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2005) BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development* 132:2669-2678.
- Philippakis AA, Azzariti DR, Beltran S, Brookes AJ, Brownstein CA, Brudno M, Brunner HG, Buske OJ, Carey K, Doll C, Dumitriu S, Dyke SO, den Dunnen JT, Firth HV, Gibbs RA, Girdea M, Gonzalez M, Haendel MA, Hamosh A, Holm IA, Huang L, Hurles ME, Hutton B, Krier JB, Misyura A, Mungall CJ, Paschall J, Paten B, Robinson PN, Schiettecatte F, Sobreira NL, Swaminathan GJ, Taschner PE, Terry SF, Washington NL, Zuchner S, Boycott KM, Rehm HL (2015) The Matchmaker Exchange: A Platform for Rare Disease Gene Discovery. *Hum Mutat* 36:915-921.
- Phimister AJ, Lango J, Lee EH, Ernst-Russell MA, Takeshima H, Ma J, Allen PD, Pessah IN (2007) Conformation-dependent stability of junctophilin 1 (JP1) and ryanodine receptor type 1 (RyR1) channel complex is mediated by their hyper-reactive thiols. *J Biol Chem* 282:8667-8677.
- Piao L, Kang D, Suzuki T, Masuda A, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R (2014) The histone methyltransferase SMYD2 methylates PARP1 and promotes poly(ADP-ribosyl)ation activity in cancer cells. *Neoplasia* 16:257-264, 264 e252.
- Pitceathly RD, Murphy SM, Cottenie E, Chalasani A, Sweeney MG, Woodward C, Mudanohwo EE, Hargreaves I, Heales S, Land J, Holton JL, Houlden H, Blake J, Champion M, Flinter F, Robb SA, Page R, Rose M, Palace J, Crowe C, Longman C, Lunn MP, Rahman S, Reilly MM, Hanna MG (2012) Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 79:1145-1154.
- Pla-Martin D (2012) Fisiopatología celular del déficit de GDAP1, relacionado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Valencia: Universitat de València.
- Pla-Martin D, Calpena E, Lupo V, Marquez C, Rivas E, Sivera R, Sevilla T, Palau F, Espinos C (2015) Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 24:213-229.
- Pla-Martin D, Calpena E, Palau F (2014) Mutations in the Charcot-Marie-Tooth disease-associated GDAP1 gene lead to calcium homeostasis dysfunction and endoplasmic reticulum stress. In: European Human Genetics Conference 2014 Milan (Italy).
- Pla-Martin D, Rueda CB, Estela A, Sanchez-Piris M, Gonzalez-Sanchez P, Traba J, de la Fuente S, Scorrano L, Renau-Piqueras J, Alvarez J, Satrustegui J, Palau F (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol Dis* 55:140-151.
- Plant TD, Strotmann R (2007) Trpv4. *Handb Exp Pharmacol* 189-205.
- Plotnikova OV, Kondrashov FA, Vlasov PK, Grigorenko AP, Ginter EK, Rogaev EI (2007) Conversion and compensatory evolution of the gamma-crystallin genes and identification of a cataractogenic mutation that reverses the sequence of the human CRYGD gene to an ancestral state. *Am J Hum Genet* 81:32-43.
- Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR (2013) Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 14:708-721.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16:857-872.

- Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:111-133.
- Price BD, Mannheim-Rodman LA, Calderwood SK (1992) Brefeldin A, thapsigargin, and AIF4- stimulate the accumulation of GRP78 mRNA in a cycloheximide dependent manner, whilst induction by hypoxia is independent of protein synthesis. *J Cell Physiol* 152:545-552.
- Priya A, Johar K, Nair B, Wong-Riley MT (2014) Nuclear respiratory factor 2 regulates the transcription of AMPA receptor subunit GluA2 (Gria2). *Biochim Biophys Acta* 1843:3018-3028.
- Proserpio V, Fittipaldi R, Ryall JG, Sartorelli V, Caretti G (2013) The methyltransferase SMYD3 mediates the recruitment of transcriptional cofactors at the myostatin and c-Met genes and regulates skeletal muscle atrophy. *Genes Dev* 27:1299-1312.
- Putney JW (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 231:10-22.
- Raeymaekers P, Timmerman V, De Jonghe P, Swerts L, Gheuens J, Martin JJ, Muylle L, De Winter G, Vandenberghe A, Van Broeckhoven C (1989) Localization of the mutation in an extended family with Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN I). *Am J Hum Genet* 45:953-958.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA, et al. (1991) Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1:93-97.
- Raturi A, Simmen T (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* 1833:213-224.
- Reilly MM, Murphy SM, Laura M (2011) Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 16:1-14.
- Reilly MM, Shy ME (2009) Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1304-1314.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114-1125.
- Retelska D, Iseli C, Bucher P, Jongeneel CV, Naef F (2006) Similarities and differences of polyadenylation signals in human and fly. *BMC Genomics* 7:176.
- Reymond A, Marigo V, Yaylaoglu MB, Leoni A, Ucla C, Scamuffa N, Caccioppoli C, Dermitzakis ET, Lyle R, Banfi S, Eichele G, Antonarakis SE, Ballabio A (2002) Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse. *Nature* 420:582-586.
- Ristevski S, O'Leary DA, Thornell AP, Owen MJ, Kola I, Hertzog PJ (2004) The ETS transcription factor GABPalph is essential for early embryogenesis. *Mol Cell Biol* 24:5844-5849.
- Rorth P, Szabo K, Bailey A, Laverty T, Rehm J, Rubin GM, Weigmann K, Milan M, Benes V, Ansorge W, Cohen SM (1998) Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125:1049-1057.
- Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol* 9:562-571.
- Rudnicki DD, Yang XW, Margolis RL (2014) HDL2 Mouse. In: *Movement Disorders: Genetics and Models*(LeDoux, M. S., ed), pp 573-583 London, U.K.
- Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, Hernandez M, Villalba M, Cruz F, Cerdan S, Bogonez E, Satrustegui J (1998) Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* 9:1277-1282.
- Saddic LA, West LE, Aslanian A, Yates JR, 3rd, Rubin SM, Gozani O, Sage J (2010) Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem* 285:37733-37740.
- Sakamoto LH, Andrade RV, Felipe MS, Motoyama AB, Pittella Silva F (2014) SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor. *Leuk Res* 38:496-502.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sang TK, Jackson GR (2005) *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx* 2:438-446.
- Sanmaneechai O, Feely S, Scherer SS, Herrmann DN, Burns J, Muntoni F, Li J, Siskind CE, Day JW, Laura M, Sumner CJ, Lloyd TE, Ramchandren S, Shy RR, Grider T, Bacon C, Finkel RS, Yum SW, Moroni I, Piscoquito G, Pareyson D, Reilly MM, Shy ME (2015) Genotype-phenotype characteristics and baseline natural history of heritable neuropathies caused by mutations in the MPZ gene. *Brain*.
- Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME (2011) Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 69:22-33.
- Saporta MA, Shy ME (2013) Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin* 31:597-619.
- Sato C, Zhao G, Ilagan MX (2012) An overview of notch signaling in adult tissue renewal and maintenance. *Curr Alzheimer Res* 9:227-240.
- Satoh N, Rokhsar D, Nishikawa T (2014) Chordate evolution and the three-phylum system. *Proc Biol Sci* 281:20141729.

- Scarpulla RC (2008) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 1147:321-334.
- Scott JN, Parhad IM, Clark AW (1991) Beta-amyloid precursor protein gene is differentially expressed in axotomized sensory and motor systems. *Brain Res Mol Brain Res* 10:315-325.
- Scott M, Hyland PL, McGregor G, Hillan KJ, Russell SE, Hall PA (2005) Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene* 24:4688-4700.
- Schabhuhtl M, Wieland T, Senderek J, Baets J, Timmerman V, De Jonghe P, Reilly MM, Stieglbauer K, Laich E, Windhager R, Erwa W, Trajanoski S, Strom TM, Auer-Grumbach M (2014) Whole-exome sequencing in patients with inherited neuropathies: outcome and challenges. *J Neurol* 261:970-982.
- Schaffer AA, Gupta SK, Shriram K, Cottingham RW, Jr. (1994) Avoiding recomputation in linkage analysis. *Hum Hered* 44:225-237.
- Schenone A, Nobbio L, Mandich P, Bellone E, Abbruzzese M, Aymar F, Mancardi GL, Windebank AJ (1997) Underexpression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology* 48:445-449.
- Seixas AI, Holmes SE, Takeshima H, Pavlovich A, Sachs N, Pruitt JL, Silveira I, Ross CA, Margolis RL, Rudnicki DD (2012) Loss of junctophilin-3 contributes to Huntington disease-like 2 pathogenesis. *Ann Neurol* 71:245-257.
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, Zuchner S, De Jonghe P, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Schroder JM (2003) Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 126:642-649.
- Serrano-Candelas E, Farre D, Aranguren-Ibanez A, Martinez-Hoyer S, Perez-Riba M (2014) The vertebrate RCAN gene family: novel insights into evolution, structure and regulation. *PLoS One* 9:e85539.
- Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, Mayordomo F, Pedrola L, Palau F, Vilchez JJ (2003) Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 126:2023-2033.
- Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, Collado D, Chumillas MJ, Vilchez JJ, Muelas N, Bataller L, Domenech R, Espinos C, Palau F (2008) Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain* 131:3051-3061.
- Shago M, Giguere V (1996) Isolation of a novel retinoic acid-responsive gene by selection of genomic fragments derived from CpG-island-enriched DNA. *Mol Cell Biol* 16:4337-4348.
- Shalaby NA, Parks AL, Morreale EJ, Osswald MC, Pfau KM, Pierce EL, Muskavitch MA (2009) A screen for modifiers of notch signaling uncovers Amun, a protein with a critical role in sensory organ development. *Genetics* 182:1061-1076.
- Sheth S, Francies K, Siskind CE, Feely SM, Lewis RA, Shy ME (2008) Diabetes mellitus exacerbates motor and sensory impairment in CMT1A. *J Peripher Nerv Syst* 13:299-304.
- Shield AJ, Murray TP, Board PG (2006) Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 347:859-866.
- Showalter AD, Smith TP, Bennett GL, Sloop KW, Whitsett JA, Rhodes SJ (2002) Differential conservation of transcriptional domains of mammalian Prophet of Pit-1 proteins revealed by structural studies of the bovine gene and comparative functional analysis of the protein. *Gene* 291:211-221.
- Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, Li J, Lewis RA, Reilly M (2005) Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology* 64:1209-1214.
- Silva FP, Hamamoto R, Kunizaki M, Tsuge M, Nakamura Y, Furukawa Y (2008) Enhanced methyltransferase activity of SMYD3 by the cleavage of its N-terminal region in human cancer cells. *Oncogene* 27:2686-2692.
- Sims RJ, 3rd, Weihe EK, Zhu L, O'Malley S, Harriss JV, Gottlieb PD (2002) m-Bop, a repressor protein essential for cardiogenesis, interacts with skNAC, a heart- and muscle-specific transcription factor. *J Biol Chem* 277:26524-26529.
- Singaravelu K, Nelson C, Bakowski D, de Brito OM, Ng SW, Di Capite J, Powell T, Scorrano L, Parekh AB (2011) Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca²⁺ store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 286:12189-12201.
- Sirinupong N, Brunzelle J, Ye J, Pirzada A, Nico L, Yang Z (2010) Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture. *J Biol Chem* 285:40635-40644.
- Sivera R, Espinos C, Vilchez JJ, Mas F, Martinez-Rubio D, Chumillas MJ, Mayordomo F, Muelas N, Bataller L, Palau F, Sevilla T (2010) Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 15:334-344.
- Sivera R, Sevilla T, Vilchez JJ, Martinez-Rubio D, Chumillas MJ, Vazquez JF, Muelas N, Bataller L, Millan JM, Palau F, Espinos C (2013) Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology* 81:1617-1625.

- Sleigh JN, Barreiro-Iglesias A, Oliver PL, Biba A, Becker T, Davies KE, Becker CG, Talbot K (2014) Chondrolectin affects cell survival and neuronal outgrowth in in vitro and in vivo models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 23:855-869.
- Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC (2009) Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 20:3525-3532.
- Spellmon N, Holcomb J, Trescott L, Sirinupong N, Yang Z (2015) Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins. *Int J Mol Sci* 16:1406-1428.
- Sponziello M, Durante C, Boichard A, Dima M, Puppini C, Verrienti A, Tamburrano G, Di Rocco G, Redler A, Lacroix L, Bidart JM, Schlumberger M, Damante G, Russo D, Filetti S (2014) Epigenetic-related gene expression profile in medullary thyroid cancer revealed the overexpression of the histone methyltransferases EZH2 and SMYD3 in aggressive tumours. *Mol Cell Endocrinol* 392:8-13.
- St Johnston D (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3:176-188.
- St Pierre SE, Galindo MI, Couso JP, Thor S (2002) Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* 129:1273-1281.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413:739-743.
- Stender JD, Pascual G, Liu W, Kaikkonen MU, Do K, Spann NJ, Boutros M, Perrimon N, Rosenfeld MG, Glass CK (2012) Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell* 48:28-38.
- Stogbauer F, Young P, Timmerman V, Spoelders P, Ringelstein EB, Van Broeckhoven C, Kurlemann G (1997) Refinement of the hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) locus to chromosome 17q24-q25. *Hum Genet* 99:685-687.
- Stuppia G, Rizzo F, Riboldi G, Del Bo R, Nizzardo M, Simone C, Comi GP, Bresolin N, Corti S (2015) MFN2-related neuropathies: Clinical features, molecular pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Neurol Sci* 356:7-18.
- Suarez-Calvet M, Rojas-Garcia R, Querol L, Sarmiento LM, Domingo P (2010) Polyradiculoneuropathy associated to human herpesvirus 2 in an HIV-1-infected patient (Elsberg syndrome): case report and literature review. *Sex Transm Dis* 37:123-125.
- Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T, Nagata K (2007) SEPT9 sequence alternations causing hereditary neuralgic amyotrophy are associated with altered interactions with SEPT4/SEPT11 and resistance to Rho/Rhotekin-signaling. *Hum Mutat* 28:1005-1013.
- Suhr ST, Senut MC, Whitelegge JP, Faull KF, Cuizon DB, Gage FH (2001) Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *J Cell Biol* 153:283-294.
- Sun X, Artavanis-Tsakonas S (1996) The intracellular deletions of Delta and Serrate define dominant negative forms of the *Drosophila* Notch ligands. *Development* 122:2465-2474.
- Sun X, Artavanis-Tsakonas S (1997) Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 124:3439-3448.
- Sunyaev SR (2012) Inferring causality and functional significance of human coding DNA variants. *Hum Mol Genet* 21:R10-17.
- Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K (2010) REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes* 3:294.
- Takeshima H, Hoshijima M, Song LS (2015) Ca microdomains organized by junctophilins. *Cell Calcium*.
- Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K (2000) Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell* 6:11-22.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
- Tan X, Rotllant J, Li H, De Deyne P, Du SJ (2006) SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2713-2718.
- Tao F, Schule R, Abreu L, Blanton S, Beecham G, Pareyson D, Reilly M, Shy M, Zuchner S, MacDonald J, Consortium. IN (2015a) Identifying genetic modifiers in CMT1A in a GWAS design. In: 2015 Peripheral Nerve Society Meeting Quebec (Canada).
- Tao F, Schule R, Abreu L, Blanton S, Beecham G, Shy M, Zuchner S, Consortium. IN (2015b) Preparing sequencing-based genetic modifier studies: the phenotypic distribution of CMT1A patients. In: 2015 Peripheral Nerve Society Meeting Quebec (Canada).
- Tazir M, Azzedine H, Assami S, Sindou P, Nouioua S, Zemmouri R, Hamadouche T, Chaouch M, Feingold J, Vallat JM, Leguern E, Grid D (2004) Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* 127:154-163.

- Teare MD, Santibanez Koref MF (2014) Linkage analysis and the study of Mendelian disease in the era of whole exome and genome sequencing. *Brief Funct Genomics* 13:378-383.
- Telford MJ, Budd GE, Philippe H (2015) Phylogenomic Insights into Animal Evolution. *Curr Biol* 25:R876-887.
- Tetreault M, Gonzalez M, Dicaire MJ, Allard P, Gehring K, Leblanc D, Leclerc N, Schondorf R, Mathieu J, Zuchner S, Brais B (2015) Adult-onset painful axonal polyneuropathy caused by a dominant NAGLU mutation. *Brain* 138:1477-1483.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2466-2470.
- Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J (2004) A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* 36:283-287.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.
- Thompson EC, Travers AA (2008) A *Drosophila* Smyd4 homologue is a muscle-specific transcriptional modulator involved in development. *PLoS One* 3:e3008.
- Tian Y, Bi J, Shui G, Liu Z, Xiang Y, Liu Y, Wenk MR, Yang H, Huang X (2011) Tissue-autonomous function of *Drosophila* seipin in preventing ectopic lipid droplet formation. *PLoS Genet* 7:e1001364.
- Timmerman V, Lupski JR, De Jonghe P (2006) Molecular genetics, biology, and therapy for inherited peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 8:1-2.
- Timmerman V, Strickland AV, Zuchner S (2014) Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)* 5:13-32.
- Tomlinson A, Ready DF (1987) Neuronal differentiation in *Drosophila ommatidium*. *Dev Biol* 120:366-376.
- Tort F, Garcia-Silva MT, Ferrer-Cortes X, Navarro-Sastre A, Garcia-Villoria J, Coll MJ, Vidal E, Jimenez-Almazan J, Dopazo J, Briones P, Elpeleg O, Ribes A (2013) Exome sequencing identifies a new mutation in SERAC1 in a patient with 3-methylglutaconic aciduria. *Mol Genet Metab* 110:73-77.
- Tranchevent LC, Barriot R, Yu S, Van Vooren S, Van Loo P, Coessens B, De Moor B, Aerts S, Moreau Y (2008) ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Res* 36:W377-384.
- Ubogu EE (2015) Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific therapeutic intervention. *Acta Neuropathol*.
- van Alfen N (2011) Clinical and pathophysiological concepts of neuralgic amyotrophy. *Nat Rev Neurol* 7:315-322.
- van Alfen N, van Engelen BG, Reinders JW, Kremer H, Gabreels FJ (2000) The natural history of hereditary neuralgic amyotrophy in the Dutch population: two distinct types? *Brain* 123 (Pt 4):718-723.
- van de Hoef DL, Hughes J, Livne-Bar I, Garza D, Konsolaki M, Boulianne GL (2009) Identifying genes that interact with *Drosophila* presenilin and amyloid precursor protein. *Genesis* 47:246-260.
- van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, van Doorn PA (2014) Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* 10:469-482.
- van Ham TJ, Breitling R, Swertz MA, Nollen EA (2009) Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO Mol Med* 1:360-370.
- van Oort RJ, Garbino A, Wang W, Dixit SS, Landstrom AP, Gaur N, De Almeida AC, Skapura DG, Rudy Y, Burns AR, Ackerman MJ, Wehrens XH (2011) Disrupted junctional membrane complexes and hyperactive ryanodine receptors after acute junctophilin knockdown in mice. *Circulation* 123:979-988.
- van Paassen BW, van der Kooij AJ, van Spaendonck-Zwarts KY, Verhamme C, Baas F, de Visser M (2014) PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis* 9:38.
- Vance JE (2014) MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1841:595-609.
- Vance JM, Nicholson GA, Yamaoka LH, Stajich J, Stewart CS, Speer MC, Hung WY, Roses AD, Barker D, Pericak-Vance MA (1989) Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. *Exp Neurol* 104:186-189.
- Veerappan CS, Avramova Z, Moriyama EN (2008) Evolution of SET-domain protein families in the unicellular and multicellular Ascomycota fungi. *BMC Evol Biol* 8:190.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG,

- Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C (2012) CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genet* 8:e1003040.
- Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Pereira A, Menezes FD, Antunes L, Carneiro I, Oliveira J, Henrique R, Jeronimo C (2014) Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 21:51-61.
- Vital A, Latour P, Sole G, Ferrer X, Rouanet M, Tison F, Vital C, Goizet C (2012) A French family with Charcot-Marie-Tooth disease related to simultaneous heterozygous MFN2 and GDAP1 mutations. *Neuromuscul Disord* 22:735-741.
- Voelkel T, Andresen C, Unger A, Just S, Rottbauer W, Linke WA (2013) Lysine methyltransferase Smyd2 regulates Hsp90-mediated protection of the sarcomeric titin springs and cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 1833:812-822.
- Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U (2009) Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 4:e5160.
- Wagner T, Jung M (2012) New lysine methyltransferase drug targets in cancer. *Nat Biotechnol* 30:622-623.
- Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Zuchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM (2008a) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 82:283-289.
- Wang SZ, Luo XG, Shen J, Zou JN, Lu YH, Xi T (2008b) Knockdown of SMYD3 by RNA interference inhibits cervical carcinoma cell growth and invasion in vitro. *BMB Rep* 41:294-299.
- Wang Z, Liu X, Yang BZ, Gelernter J (2013) The role and challenges of exome sequencing in studies of human diseases. *Front Genet* 4:160.
- Wangler MF, Yamamoto S, Bellen HJ (2015) Fruit flies in biomedical research. *Genetics* 199:639-653.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189-1191.
- Watts GD, O'Briant KC, Borreson TE, Windebank AJ, Chance PF (2001) Evidence for genetic heterogeneity in hereditary neuralgic amyotrophy. *Neurology* 56:675-678.
- Watts GD, O'Briant KC, Chance PF (2002) Evidence of a founder effect and refinement of the hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) locus on 17q25 in American families. *Hum Genet* 110:166-172.
- Waxman SG (2011) Neuroscience: Channelopathies have many faces. *Nature* 472:173-174.
- Waxman SG, Dib-Hajj SD (2005) Erythromelalgia: a hereditary pain syndrome enters the molecular era. *Ann Neurol* 57:785-788.
- Weimann M, Grossmann A, Woodsmith J, Ozkan Z, Birth P, Meierhofer D, Benlasfer N, Valovka T, Timmermann B, Wanker EE, Sauer S, Stelzl U (2013) A Y2H-seq approach defines the human protein methyltransferase interactome. *Nat Methods* 10:339-342.

- Willoughby D, Everett KL, Halls ML, Pacheco J, Skroblin P, Vaca L, Klussmann E, Cooper DM (2012) Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling. *Sci Signal* 5:ra29.
- Winther M, Berezin V, Walmod PS (2012) NCAM2/OCAM/RNCAM: cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. *Int J Biochem Cell Biol* 44:441-446.
- Wirth B, Garbes L, Riessland M (2013) How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. *Curr Opin Genet Dev* 23:330-338.
- Wlodarski T, Kutner J, Towpik J, Knizewski L, Rychlewski L, Kudlicki A, Rowicka M, Dziembowski A, Ginalski K (2011) Comprehensive structural and substrate specificity classification of the *Saccharomyces cerevisiae* methyltransferase. *PLoS One* 6:e23168.
- Woldeyesus MT, Britsch S, Riethmacher D, Xu L, Sonnenberg-Riethmacher E, Abou-Rebyeh F, Harvey R, Caroni P, Birchmeier C (1999) Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* 13:2538-2548.
- Wolff T (2000) Histological techniques for the *Drosophila* eye Part II: Adult. In: *Drosophila Protocols* (Sullivan, W. et al., eds), pp 229-243 NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Wolff T (2011) Preparation of *Drosophila* eye specimens for scanning electron microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2011:1383-1385.
- Woods S, Coghlan A, Rivers D, Warnecke T, Jeffries SJ, Kwon T, Rogers A, Hurst LD, Ahringer J (2013) Duplication and retention biases of essential and non-essential genes revealed by systematic knockdown analyses. *PLoS Genet* 9:e1003330.
- Woolums B, Sullivan J, Yang M, Mamah C, Bears B, Le A, Sumner C, Lloyd T (2015) Mechanisms of TRPV4-mediated hereditary axonal neuropathy in *drosophila* and mouse models. In: 2015 Peripheral Nerve Society Meeting Quebec (Canada).
- Wu D, Raafat M, Pak E, Hammond S, Murashov AK (2011) MicroRNA machinery responds to peripheral nerve lesion in an injury-regulated pattern. *Neuroscience* 190:386-397.
- Xu G, Liu G, Xiong S, Liu H, Chen X, Zheng B (2015) The histone methyltransferase Smyd2 is a negative regulator of macrophage activation by suppressing interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production. *J Biol Chem* 290:5414-5423.
- Xu M, Wu HD, Li RC, Zhang HB, Wang M, Tao J, Feng XH, Guo YB, Li SF, Lai ST, Zhou P, Li LL, Yang HQ, Luo GZ, Bai Y, Xi JJ, Gao W, Han QD, Zhang YY, Wang XJ, Meng X, Wang SQ (2012) Mir-24 regulates junctophilin-2 expression in cardiomyocytes. *Circ Res* 111:837-841.
- Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, Yamagishi M, Yamochi T, Tanaka Y, Furukawa Y, Nakamura Y, Watanabe T (2011) SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci* 102:260-266.
- Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, Wiszniewski W, Sandoval H, Haelterman NA, Xiong B, Zhang K, Bayat V, David G, Li T, Chen K, Gala U, Harel T, Pehlivan D, Penney S, Vissers LE, de Ligt J, Jhangiani SN, Xie Y, Tsang SH, Parman Y, Sivaci M, Battaloglu E, Muzny D, Wan YW, Liu Z, Lin-Moore AT, Clark RD, Curry CJ, Link N, Schulze KL, Boerwinkle E, Dobyns WB, Allikmets R, Gibbs RA, Chen R, Lupski JR, Wangler MF, Bellen HJ (2014) A *drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell* 159:200-214.
- Yang L, He J, Chen L, Wang G (2009) Hepatitis B virus X protein upregulates expression of SMYD3 and C-MYC in HepG2 cells. *Med Oncol* 26:445-451.
- Yang Y, Wang Y, Li S, Xu Z, Li H, Ma L, Fan J, Bu D, Liu B, Fan Z, Wu G, Jin J, Ding B, Zhu X, Shen Y (2004) Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J Med Genet* 41:171-174.
- Yao P, Fox PL (2013) Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med* 5:332-343.
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Fujita H, Hayashi H, Kagamiyama H, Mori K (1997) OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17:5830-5842.
- Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Canalis E (2011) Reciprocal regulation of Notch and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) c1 transactivation in osteoblasts. *J Biol Chem* 286:4576-4588.
- Zhang HY, Zheng SJ, Zhao JH, Zhao W, Zheng LF, Zhao D, Li JM, Zhang XF, Chen ZB, Yi XN (2011) MicroRNAs 144, 145, and 214 are down-regulated in primary neurons responding to sciatic nerve transection. *Brain Res* 1383:62-70.
- Zhang L, Ma H (2012) Complex evolutionary history and diverse domain organization of SET proteins suggest divergent regulatory interactions. *New Phytol* 195:248-263.
- Zhang XY, Wen J, Yang W, Wang C, Gao L, Zheng LH, Wang T, Ran K, Li Y, Li X, Xu M, Luo J, Feng S, Ma X, Ma H, Chai Z, Zhou Z, Yao J, Zhang X, Liu JY (2013) Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *Am J Hum Genet* 93:957-966.

- Zhong Z, Ohnmacht J, Reimer MM, Bach I, Becker T, Becker CG (2012) Chondrolectin mediates growth cone interactions of motor axons with an intermediate target. *J Neurosci* 32:4426-4439.
- Zhou MH, Zheng H, Si H, Jin Y, Peng JM, He L, Zhou Y, Munoz-Garay C, Zawieja DC, Kuo L, Peng X, Zhang SL (2014) Stromal interaction molecule 1 (STIM1) and Orai1 mediate histamine-evoked calcium entry and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 289:29446-29456.
- Zimon M, Baets J, Auer-Grumbach M, Berciano J, Garcia A, Lopez-Laso E, Merlini L, Hilton-Jones D, McEntagart M, Crosby AH, Barisic N, Boltshauser E, Shaw CE, Landouze G, Ludlow CL, Gaudet R, Houlden H, Reilly MM, Fischbeck KH, Sumner CJ, Timmerman V, Jordanova A, Jonghe PD (2010) Dominant mutations in the cation channel gene transient receptor potential vanilloid 4 cause an unusual spectrum of neuropathies. *Brain* 133:1798-1809.
- Zimon M, Baets J, Fabrizi GM, Jaakkola E, Kabzinska D, Pilch J, Schindler AB, Cornblath DR, Fischbeck KH, Auer-Grumbach M, Guelly C, Huber N, De Vriendt E, Timmerman V, Suter U, Hausmanowa-Petrusewicz I, Niemann A, Kochanski A, De Jonghe P, Jordanova A (2011) Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology* 77:540-548.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449-451.