



**Universitat de les
Illes Balears**



Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats
Direcció General d'Universitats,
Recerca i Transferència del Coneixement

Invertim en el seu futur



Unió Europea
Fons Social Europeu

TESIS DOCTORAL

2016

TITULO

Identificación de genes candidatos en enfermedades complejas
mediante análisis genético y estudios funcionales de sus mecanismos
de patogenicidad

Subtítulo

Caracterización de la estructura y función de la proteína DISC1
(*Disrupted in Schizophrenia 1*) en la mitocondria

Estefanía Piñero Martos



**Universitat de les
Illes Balears**



Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats
Direcció General d'Universitats,
Recerca i Transferència del Coneixement

Invertim en el seu futur



Unió Europea
Fons Social Europeu

TESIS DOCTORAL

2016

**Programa de doctorado en Biotecnología, Genética y
Biología Celular**

TITULO

**Identificación de genes candidatos en enfermedades complejas mediante
análisis genético y estudios funcionales de sus mecanismos de patogenicidad**

Subtítulo

**Caracterización de la estructura y función de la proteína DISC1 (*Disrupted in
Schizophrenia 1*) en la mitocondria**

Director: Cristòfol Vives Bauzá

Director: Damián Heine Suñer

Ponente: Gabriel Olmos Bonafé

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

Estefanía Piñero Martos



**Universitat de les
Illes Balears**

Dr. Damián Heine Suñer, del Instituto de Investigación de Palma, Hospital Universitario Son Espases;

Dr. Cristòfol Vives Bauzá, del Instituto de Investigación de Palma, Hospital Universitario Son Espases;

DECLARAMOS:

Que la tesis doctoral que lleva por título Identificación de genes candidatos en enfermedades complejas mediante análisis genético y análisis funcional de sus mecanismos de patogenicidad. Caracterización de la estructura y función de la proteína DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) en la mitocondria, presentada por Estefanía Piñero Martos para la obtención del título de doctor, ha estado dirigida bajo nuestra supervisión.

Y para que quede constancia firmamos el documento,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'D' followed by a long, sweeping stroke that curves upwards and to the right.

Damián Heine Suñer

A handwritten signature in black ink, featuring a complex, overlapping pattern of lines that form a roughly circular shape with a long tail extending to the right.

Cristòfol Vives Bauzá

Palma de Mallorca, 30 de abril de 2016

A mis padres, por su amor incondicional y por su esfuerzo
constante para hacer de mí una mejor persona

Agradecimientos:

A la Conselleria de Educación, Cultura y Universidades que con el apoyo del Fondo Social Europeo, me dieron la oportunidad de realizar mi tesis doctoral con la ayuda de una beca predoctoral. Asimismo, agradecer al Hospital Son Espases, al Instituto de Investigación de Palma y a la Unidad de Investigación por permitirme realizar mi período doctoral en sus instalaciones.

A mis directores de tesis, el Dr. Damián Heine Suñer por su confianza y por la oportunidad que me ofreció para continuar en el mundo de la investigación, gracias a su apoyo pude obtener la beca que me permitió realizar mi tesis doctoral; y al Dr. Cristòfol Vives Bauzá por darme una segunda oportunidad, por su tiempo, sus enseñanzas, su paciencia, su honestidad y su afán por hacer de mí una investigadora capaz.

A mi compañero de batallas, el Sr. Bernat Ortega por su superación diaria, por estar siempre presente y por ayudarme siempre en todo y más.

A la Srta. María Font y al Sr. Pep Pol por su estrecha colaboración y su ayuda inestimable en la realización de algunos aspectos fundamentales de esta tesis.

A todas y cada una de las personas que me han acompañado en este camino de la investigación: jefes, compañeros de poyata, compañeros de la UNI, estudiantes y colaboradores. A los que me ofrecieron su tiempo, a los que me enseñaron algo con lo que pude avanzar, con los que compartí fiestas, risas, lloros y enfados, a los que me ofrecieron más de lo que nunca pude esperar, a los que me dieron su amistad y especialmente a los que me entregaron su corazón de manera incondicional.

De una manera especial a mis Divinity: Rebe, Irene, Antonia, Amanda y Cristina. Por su apoyo incondicional, su amor permanente y por hacer que cada día junto a ellas sea un día mágico.

A todas mis amigas de fuera del mundo de la investigación, porque aún sin llegar a comprender mi dedicación casi absoluta, han sabido ser contantes e incansables en su apoyo (Tere, Carmen Dagloria, Mercè, Carmela Sanpedro, Miguel, Ana, Amadeo, todas mis alumnas).

El mayor agradecimiento es para mi familia, imposibles de nombrar a tod@s (padres, hermanos, primos, tíos, abuelos...). Sois lo mejor de mi vida. Siempre motivándome a seguir creciendo, siempre apoyándome en cualquier aspecto de la vida, siempre confiando en mí sin perder la ilusión, siempre presentes en mi corazón.

Y a Dani... mi compañero de la vida, el que me empuja a caminar, el que consigue que haga cosas imposibles, el que siempre cree en mí, el incansable.

Lista de publicaciones derivadas de la tesis:

Flaquer A, Baumbach C, Pinero E, et al. Genome-wide linkage analysis of congenital heart defects using MOD score analysis identifies two novel loci *BMC Genet.* 2013;14:44-2156-14-44.

Genin EC, Plutino M, Bannwarth S, et al. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis *EMBO Mol Med.* 2015;8(1):58-72.

Pinero-Martos E, Ortega-Vila B, Pol-Fuster J, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) associates with Mic60/Mitofilin in the Mitochondria contact site and Cristae Organizing System (MICOS) complex, essential for oxidative phosphorylation. (En revisión por *Human Molecular Genetics*).

Abreviaturas

aa: Aminoácido.

ADN: Ácido desoxiriblonucleico.

ADNmt: Ácido desoxiriblonucleico mitocondrial.

ADP: Difosfato de adenosina.

AMP: Monofosfato de adenosina.

APP: Pentafofosfato de adenosina.

APS: Persulfato de sodio.

AR: Ácido retinoico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BDNF: Factor de crecimiento derivado de cerebro.

BN-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida nativo, no desnaturalizante.

BSA: Suero bovino de albúmina.

CC: Cardiopatía congénita.

CIA: Comunicación interauricular.

CIV: Comunicación interventricular.

CJ: *Cristae junctions* o uniones entre crestas.

CNV: Variación en el número de copia.

CTL: Control, referido a células.

DFT: Demencia frontotemporal.

DISC1: *Disrupted in Schizophrenia 1*.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DND: Desórdenes de neurodesarrollo.

DSR: Depresión severa recurrente.

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético.

EGTA: Ácido etilen glicol tetraacético.

EIM: Espacio intermembrana mitocondrial.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

EMG: Enfermedad mental grave.

FBS: Suero bovino fetal.

FCCP: Carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazono.

GFP: Proteína verde fluorescente.

GWAS: Estudios de asociación genéticos.

IBM: Región de la membrana mitocondrial interna cerca a la membrana externa.

IP: Inmunoprecipitación.

IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*.

KD: *Knock down*. Dismunición.

LM: Lauril- β -D-maltósido.

MC: Membrana de crestas mitocondriales.

ME: Membrana externa mitocondrial.

MI: Membrana interna mitocondrial.

MICOS: *Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System*.

MOI: Multiplicidad de infección.

MTT: Bromuro 3-(4,5-diMeTilTiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio.

MZ: Matriz mitocondrial.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NGS: Secuenciación de última generación.

NMDA: N-metil D-aspartato.

OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PFA: Paraformaldehido.

Pi: Fosfato inorgánico.

PK: Proteinasa K.

PMSF: Fenil metano sulfonilfluorido.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

SDH: Succinato deshidrogenasa.

SDS: Sodium dodecil sulfato.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida con SDS, desnaturalizante.

SNP: Polimorfismo de una sola base.

SZ: Esquizofrenia.

TBST: Tampón salino Tris con Tween.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEA: Trastornos de espectro autista.

TEMED: Tetrametil etileno diamina.

TMRM: Tetrametilrodamina metil éster.

TP: Trastorno bipolar.

WB: Western Blot.

WES: Secuenciación del exoma humano.

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	7
1.1 Enfermedades complejas	7
1.1.1 Cardiopatías congénitas (CC). Fenotipos	10
1.1.2 Enfermedades mentales graves (EMG). Fenotipos	16
1.2 La mitocondria	23
1.2.1 Complejo multiproteico MICOS	25
1.2.2 Sistema de fosforilación oxidativa	25
1.2.3 Otras funciones de la mitocondria	29
1.3 Esquizofrenia y mitocondria	29
1.4 DISC1 (<i>Disrupted in Schizophrenia 1</i>)	30
1.4.1 DISC1. Definición, función e interacciones	30
1.4.2 DISC1 y mitocondria	35
2. Hipótesis	37
3. Objetivos	38
4. Metodología	39
4.1 Técnicas genómicas. CC y EMG	39
4.1.1 SNP-Array. Análisis de las variaciones en el número de copia (CNVs)	39
4.1.1.1 La técnica de SNP-Array	
4.1.1.2 Análisis de datos a partir de la técnica de SNP-Array	
A. Priorización de genes candidatos	
B. Análisis de vías con implicación de genes candidatos	
C. Revisión bibliográfica y comparativa de los genes candidatos	
4.1.2 SNP-Array. Análisis de ligamiento	46
4.1.2.1 Descripción de familias con CC	
4.1.2.2 Análisis de ligamiento	
4.1.3 Secuenciación del exoma humano o WES. Análisis de secuencias	48

4.1.3.1	Secuenciación del exoma humano	
4.1.3.2	Análisis de datos a partir de la técnica de WES	
4.2	Técnicas de biología celular-proteómica	53
4.2.1	Cultivo celular	53
4.2.1.1	Mantenimiento de líneas celulares	
4.2.1.2	Transfección de líneas celulares mediante liposomas	
4.2.2	Estructura y localización de DISC1 en la mitocondria	54
4.2.2.1	Subfraccionamiento celular	
4.2.2.2	Western Blot (WB)	
4.2.2.3	Ensayos de protección de degradación proteica	
4.2.2.4	Rotura de membranas mediante tratamiento con Na ₂ PO ₄	
4.2.2.5	Generación de mitoplastos	
4.2.2.6	BN-PAGE. Análisis de complejos	
4.2.2.7	Análisis de ensamblaje de las subunidades componentes de los complejos multiproteicos	
4.2.2.8	Inmunoprecipitación	
4.2.2.9	Ensayo de ligamiento por proximidad <i>in situ</i> o PLA	
4.2.2.10	Inmunofluorescencia	
4.2.3	Silenciamiento del gen DISC1 mediante shRNA	64
4.2.4	Ensayo de viabilidad celular	66
4.2.5	Análisis de fosforilación oxidativa de la proteína DISC1	67
4.2.5.1	Síntesis de ATP	
4.2.5.2	Respiración celular	
4.2.5.3	TMRM. Potencial de membrana mitocondrial	
4.2.5.4	Medición del contenido de ADNmt	
4.2.5.5	Análisis estadístico de la fosforilación oxidativo	
4.2.6	Estudios de diferenciación de las células SH-SY5Y	70
4.2.6.1	Diferenciación de células de neoblastoma humano	
4.2.6.2	Cuantificación de la diferenciación y neuritogénesis	
4.2.6.3	Análisis estadístico de la neuritogénesis	

5. Resultados	72
5.1 SNP-Array. Análisis de las variaciones en el número de copia (CNVs)	72
5.2 SNP-Array. Análisis de ligamiento	76
5.3 EMG. Secuenciación masiva del exoma humano (WES). Análisis de secuencias	77
5.4 Caracterización de la topología mitocondrial de DISC1	81
5.4.1 La forma mitocondrial de DISC1 se encuentra anclada a la MI orientada al EIM	
5.4.2 Asociación de DISC1 al complejo multiproteico MICOS	
5.4.3 El silenciamiento de DISC1 afecta al ensamblaje del complejo MICOS	
5.4.4 Las células DISC1 KD presentan déficit funcional del sistema OXPHOS	
5.4.5 El silenciamiento de DISC1 afecta a la diferenciación de las células SH-SY5Y	
6. Discusión	98
6.1 Descripción de genes candidatos en enfermedades complejas	98
6.2 Estudios de la estructura y función de DISC1 en la mitocondria	110
7. Conclusiones	117
Bibliografía	118

Resumen

Las enfermedades complejas se caracterizan por presentar herencia poligénica e influencia del ambiente. Las técnicas genómicas de última generación permiten identificar nuevos genes candidatos que contribuyen a la etiología de dichas enfermedades. En esta tesis hemos centrado nuestros análisis en dos enfermedades complejas causadas por defectos en el desarrollo: las cardiopatías congénitas (CC) y las enfermedades mentales graves (EMG). La técnica de SNP-Array ha permitido determinar variaciones en el número de copia (CNVs) en una cohorte de pacientes con CC de causa desconocida y sin antecedentes familiares. Además, se ha realizado un análisis de ligamiento en los casos familiares. Con los genes contenidos en las deleciones y duplicaciones encontradas, se han realizado análisis de priorización, de vías metabólicas y una comparativa bibliográfica, que han permitido identificar los genes IGF1R, PRKCE y THBS2, como candidatos a participar en la fisiopatología de las CC. En cuanto al análisis de ligamiento se han identificado 2 regiones que segregan con la enfermedad, 18q21.2-18q21.3 y 15q26.3. En la región del cromosoma 18 se localiza el gen TCF4 y en la región del cromosoma 15 los genes SELS, SNRPA1 y PCSK6, potenciales candidatos a causar CC. La tecnología de secuenciación del exoma humano (WES), se ha aplicado para identificar mutaciones que segreguen con EMG en dos familias con elevada prevalencia. Tres variantes poco frecuentes contenidas en los genes TRIP12, RNF25 y ARHGAP19, segregan con EMG. Criterios funcionales, de conservación del residuo mutado y de predicción proteica apoyan su potencial patogenicidad. Estudios funcionales serán necesarios para confirmar su implicación en la fisiopatología de las EMG.

Con dicha finalidad, se ha estudiado el gen *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)*, identificado en un amplio linaje escocés segregando con EMG. Los miembros afectados eran portadores de una translocación balanceada (1, 11)(q42.1;q14.3) que genera una forma truncada de la proteína DISC1. DISC1 es de expresión ubicua, aunque está enriquecida en la mitocondria. Nuestro objetivo era identificar su topología y función mitocondrial. Mediante estudios de subcompartimentación mitocondrial, basados en aislamiento de mitoplastos y protección de digestión proteica, identificamos DISC1 en el espacio intermembrana, anclada a la membrana mitocondrial interna. Dicha sublocalización sugería que DISC1 podía formar parte de algún complejo proteico. Estudios de ensamblaje por BN-PAGE seguidos de 2D-WB, identificaron DISC1 en el complejo MICOS (*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*), responsable del mantenimiento de las crestas mitocondriales. Para descifrar la función de DISC1 en MICOS, se generó una línea celular estable deficitaria de DISC1 (SH-SY5Y-DISC1 KD), mediante infección lentiviral con shRNA contra DISC1 humano. El déficit de DISC1 provocó desensamblaje parcial del complejo MICOS, afectando a la expresión de sus subunidades. También afectó al ensamblaje del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Como consecuencia de esta alteración estructural, las células DISC1 KD evidenciaron un marcado déficit bioenergético: dificultad de crecimiento en medio

suplementado con galactosa, disminución en la síntesis de ATP, consumo de oxígeno y potencial de membrana. Curiosamente, dicha carencia bioenergética fue parcialmente revertida al sobreexpresar DISC1 recombinante salvaje en las células DISC1 KD, pero no al sobreexpresar la forma truncada identificada en la familia escocesa. Finalmente, se observó que el déficit bioenergético de las células DISC1 KD afectaba a su capacidad de diferenciación, proyectaban menos neuritas al cultivarlas en medio suplementado con ácido retinoico y factor de crecimiento neuronal.

Esta tesis ha permitido identificar nuevos genes candidatos asociados a CC y EMG, que pueden contribuir a conocer nuevas vías implicadas en la fisiopatología de dichas enfermedades, ayudando a su predicción y mejorando los tratamientos. Por otro lado, los conocimientos aportados sobre la proteína DISC1 han permitido identificar nuevas dianas susceptibles de intervención terapéutica.

Resum

Les malalties complexes es caracteritzen per presentar una herència poligènica i influència de l'ambient. Les tècniques genòmiques de darrera generació permeten identificar nous gens candidats que contribueixen a l'etiologia d'aquestes malalties. En aquesta tesi hem centrat els nostres anàlisi en dues malalties complexes causades per defectes en el desenvolupament, les cardiopaties congènites (CC) i les malalties mentals greus (MMG). La tècnica de SNP-Array ha permès determinar variacions en el nombre de còpies (CNVs) en una cohort de pacients amb CC de causa desconeguda i sense antecedents familiars. A més, s'ha dut a terme un anàlisi de lligament en els casos familiars. Amb els gens continguts en les delecions i duplicacions trobades s'han realitzat anàlisis de prioritització, de vies metabòliques i una comparativa bibliogràfica, que ha permès identificar els gens IGF1R, PRKCE i THBS2 com a candidats a participar en la fisiopatologia de les CC. En referència a l'anàlisi de lligament s'han identificat 2 regions que segreguen amb la malaltia, 18q21.2-18q21.3 i 15q26.3. En la regió del cromosoma 18 es localitza el gen TCF4 i en la regió del cromosoma 15 els gens SELS, SNRPA1 i PCSK6, potencials candidats a causar CC.

La tecnologia de seqüenciació de l'exoma humà (WES) s'ha aplicat per identificar mutacions que segreguen amb MMG en dues famílies amb elevada prevalença. Tres variants rares contingudes en els gens TRIP12, RNF25 i ARHGAP19 segreguen amb MMG. Criteris funcionals, de conservació de residu mutat i de predicció proteica recolzen la seva potencial patogenicitat. Seran necessaris estudis funcionals per confirmar la seva implicació en la fisiopatologia de les MMG.

Amb aquesta finalitat, s'ha estudiat el gen *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)*, identificat en un ampli llinatge escocès segregant amb MMG. Els membres afectes eren portadors d'una translocació balancejada (1, 11)(q42.1;q14.3) que genera una forma truncada de la proteïna DISC1. DISC1 és d'expressió ubiqua encara que es troba enriquida a la mitocòndria. El nostre objectiu era identificar la seva topologia i funció mitocondrial. Mitjançant estudis de subcompartimentació mitocondrial basats en l'aïllament de mitoplastes i protecció de digestió proteica, vàrem identificar DISC1 a l'espai intermembrana, ancorada a la membrana mitocondrial interna. Aquesta sublocalització suggeria que DISC1 podia formar part d'algun complex proteic.

Estudis d'acoblament mitjançant BN-PAGE seguits de 2D-WB, identificaren DISC1 en el complex MICOS (*Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System*), responsable del manteniment de les crestes mitocondrials. Per desxifrar la funció de DISC1 a MICOS es va generar una línia cel·lular estable deficitària de DISC1 (SH-SY5Y-DISC1 KD), mitjançant infecció lentiviral amb shRNA contra DISC1 humà. El dèficit de DISC1 provocà el desacoblament parcial del complex MICOS, afectant a l'expressió de les seves subunitats. També afectà a l'acoblament del sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS). Com a conseqüència d'aquesta alteració estructural, les cèl·lules DISC KD evidenciaren un marcat dèficit bioenergètic: dificultat de creixement en medi

suplementat amb galactosa, disminució en la síntesis d'ATP, consum d'oxigen i potencial de membrana. Curiosament, aquesta carència bioenergètica fou parcialment revertida al sobreexpressar DISC1 recombinant salvatge en les cèl·lules DISC1 KD, però no al sobreexpressar la forma truncada identificada en la família escocesa. Finalment, es va observar que el dèficit bioenergètic de les cèl·lules DISC1 KD afectava a la seva capacitat de diferenciació, projectaven menys neurites cultivant-les en medi suplementat amb àcid retinoic i factor de creixement neuronal.

Aquesta tesi ha permès identificar nous gens candidats associats a CC i MMG, que poden contribuir a conèixer noves vies implicades en la fisiopatologia d'aquestes malalties ajudant a la seva predicció i millorant els tractaments. D'altra banda, els coneixements aportats sobre la proteïna DISC1 han permès identificar noves dianes susceptibles d'intervenció terapèutica.

Abstract

Complex diseases are characterized by polygenic inheritance and environmental factors. Next generation techniques have allowed the identification of new candidate genes involved in the etiology of these diseases. This thesis focused in two development-related complex diseases: congenital heart diseases (CHD) and major mental disorders (MMD). Copy number variations (CNVs) were identified by SNP-Array in a patient cohort with CHD of unknown cause and no family background. Moreover, a linkage analysis was performed in family members. Genes contained in deletions and duplications were analyzed through prioritization analysis, pathway analysis and a literature comparison. These approaches identified genes *IGF1R*, *PRKCE* and *THBS2* as candidate genes to participate in CHD physiopathology. Linkage analysis identified two linkage regions with CHD: 18q21.2-18q21.3 and 15q26.3. *TCF4* is a gene localized within chromosome 18, and genes *SELS*, *SNRPA1* and *PCSK6* in chromosome 15.

Whole exome sequencing (WES) was used to identify rare variants linked to MMD in two families with high prevalence. All three variants affect highly conserved residues and the supposed protein function with the predicted protein secondary change induced by the mutation support their pathogenicity, that will have to be validated by functional analysis.

For the same purpose we studied the role of *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)* in the mitochondria. *DISC1* is a susceptibility gene associated to MMD, identified in a large Scottish family with high prevalence of schizophrenia, bipolar disorder and major depression. A balanced translocation $t(1,11)(q42.1;q14.3)$ segregated with affected family members that disrupted *DISC1*, generating a protein truncated form. *DISC1* is ubiquitous but is enriched in mitochondria. Our goal was to identify *DISC1* topology and function. Through mitochondrial subfractionation, based on mitoplasts isolation and proteinase K digestion, *DISC1* was identified associated to inner mitochondrial membrane facing to the intermembrane space. This sublocalization suggests its implication in a multiprotein complex.

DISC1 was identified in MICOS complex (Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System) through BN-PAGE followed by 2D-WB. MICOS is responsible of mitochondrial cristae maintenance. To learn about *DISC1* function, a stable cell line with depleted *DISC1* was generated (SH-SY5Y-*DISC1* KD) with shRNA lentiviral infection against human *DISC1*. *DISC1* depletion caused partial disassembly of MICOS complex and affected MICOS subunits expression. It also affected oxidative phosphorylation (OXPHOS) assembly complexes. As a consequence of this structural deficiency, *DISC1* KD cells showed high bioenergetics deficiency.

DISC1 KD cells had growth problems in galactose media and also reduced ATP synthesis, diminished oxygen consumption rate and membrane potential. Interestingly, these bioenergetic defects partially reverted by overexpressing recombinant *DISC1* full length in SH-SY5Y *DISC1* KD cells, but not by overexpression of the *DISC1* truncated form

identified in the Scottish family. Furthermore, as a consequence of the bioenergetic failure, DISC1 SH-SY5Y KD cells also evidenced impaired capacity to differentiate into neurons. DISC1 KD cells projected less neurites once cultured in the presence of retinoic acid and brain derived neurotrophic factor.

This thesis has allowed the identification of new candidate genes associated to CHD and MMD. Our newly candidate genes can contribute to elucidate novel pathways involved in the physiopathology of these diseases, contributing to its prevention and treatments. By the other hand, knowing DISC1 mitochondrial structure and function may contribute to develop novel strategies of therapeutical intervention.

1. Introducción

1.1 Enfermedades complejas

En las enfermedades complejas, el modelo más aceptado es el que contempla una herencia multifactorial en la que estarían implicados genes de susceptibilidad con mutaciones poco penetrantes y comunes en la población o polimorfismos de una sola base o SNPs, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*; y mutaciones de penetrancia intermedia o alta y poco frecuentes en la población; interacción génica y factores ambientales desfavorables. La complejidad asociada a estas enfermedades, requiere aproximaciones al estudio de su etiología en las que consideren todos los factores implicados¹ (Fig. 1.1). Se debe considerar que tener cierta predisposición genética no implica la manifestación del fenotipo patológico al 100%². Además, no se puede conocer el origen genético de la enfermedad a partir de caracteres superficiales, ya que dos personas pueden tener un mismo desorden manifestando distintos síntomas³. Algunos ejemplos de enfermedades complejas son: cardiopatías congénitas, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades mentales graves tales como esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (TP) o desórdenes de espectro autista (TEA), diabetes y obesidad, entre muchas otras.

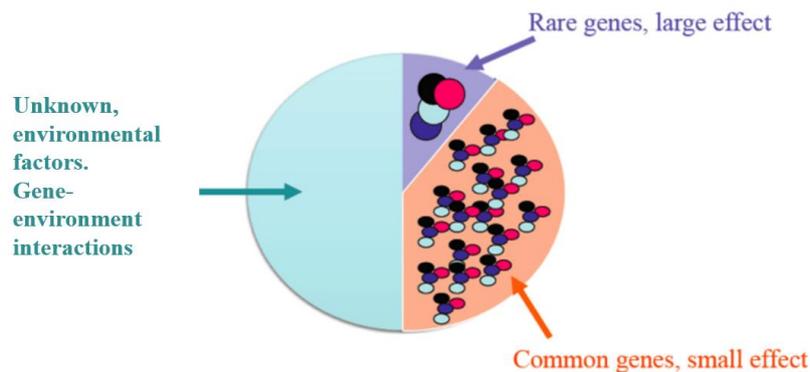


Fig. 1.1. Etiología multifactorial de las enfermedades complejas. Incluyen genes poco comunes con gran efecto; genes comunes con poco efecto, factores ambientales e interacciones gen-ambiente (Imagen extraída de ¹).

Teniendo en cuenta la cantidad de variables que intervienen en la patogénesis de estas enfermedades, los abordajes metodológicos para identificar nuevos genes asociados a enfermedades complejas se basan hoy en día en aproximaciones generales que permiten escanear el genoma completo. El proyecto Genoma Humano y el desarrollo de nuevas tecnologías de cribado masivo del genoma como, la secuenciación masiva o el SNP o CGH-Array, han aportado un gran avance en el estudio de las enfermedades complejas, mejorando las tasas de éxito en cuanto a la identificación de nuevos genes causales⁴.

Algunas de las técnicas genómicas que pueden ser utilizadas para el estudio de genes candidatos en enfermedades complejas son:

- Secuenciación masiva o NGS (por sus siglas en inglés, Next Generation Sequencing): Basada en la obtención del orden de nucleótidos de una secuencia de ADN. Es capaz de generar millones de bases en una sola carrera⁵.

Esta técnica permite determinar la existencia de variantes genéticas o SNPs, y pequeñas deleciones o duplicaciones. Además, permite localizar variantes poco frecuentes contenidas en genes candidatos que pueden ser causales de la enfermedad⁶. Es posible analizar el genoma completo mediante *Whole Genome Sequencing* (WGS) o únicamente las regiones codificantes mediante *Whole Exome Sequencing* (WES).

Actualmente la información obtenida a partir de WES se está utilizando para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de algunos cánceres como el melanoma, el cáncer de ovario o el cáncer de mama entre otros, tanto para aquellos pacientes que contengan mutaciones heredadas, como para los que presentan mutaciones *de novo*.

- SNP-Array: Plataforma física que contiene de cientos a miles de sondas que preceden a secuencias de una sola base con las que se hibridan cadenas de ADN simples fragmentadas. Cada sonda está diseñada para la unión de una secuencia específica de ADN. Esta unión se llevará a cabo por complementariedad. Esta técnica permite conocer el genotipo de una muestra determinada, mediante el análisis simultáneo de variaciones en el número de copia o CNVs, por sus siglas en inglés *Copy Number Variation*, y SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma⁷.

- CGH-Array: Plataforma de base sólida que contiene fragmentos largos de secuencias de oligonucleótidos. El genoma del paciente es comparado con un genoma control o de referencia en miles de localizaciones⁸. Se basa en la hibridación del ADN de un paciente combinado con un ADN control o de referencia a las secuencias de la plataforma. El ADN del paciente y el de referencia están marcados con distintos fluorocromos, verde y rojo, respectivamente, que serán detectados para identificar regiones delecionadas o duplicadas⁹, también llamadas indels.

El CGH-Array no es capaz de detectar reorganizaciones cromosómicas equilibradas como translocaciones e inversiones y tampoco poliploidías como el síndrome de Down (trisomía cromosoma 21)⁸. Este método ofrece alta sensibilidad y especificidad¹⁰ pero presenta baja resolución y bajo rendimiento¹¹. A diferencia del SNP-Array, el CGH-Array sólo permite el análisis de CNVs y no el genotipado mediante SNPs.

Los CNVs consisten en deleciones y duplicaciones de secuencias de ADN de >1000 pares de bases (pb) de longitud⁹. Pueden ocurrir en cualquier cromosoma, cualquier localización y mediante distintos mecanismos¹². Las duplicaciones suelen presentar fenotipos más leves que las deleciones. En cuanto a la importancia de su tamaño, los CNVs de gran tamaño provocan generalmente síndromes, como Prader-Willi o DiGeorge. Suelen contener mayor número de genes y sus efectos son mayoritariamente

patogénicos. Los CNVs de menor tamaño (hasta 10Kb) en cambio, suelen ser loci de susceptibilidad a padecer enfermedades de desarrollo como el autismo o el retraso mental, con un porcentaje del 10-60%¹³. Suelen afectar a pocos genes o ninguno, siendo menor su probabilidad de tener efectos patogénicos.

Así pues, no todos los CNVs son patológicos. Se ha determinado la presencia de una media de hasta 800 CNVs benignos por persona¹⁴.

Curiosamente, los pacientes que padecen enfermedades complejas presentan mayor número de CNVs que la población normal¹⁵.

La gran cantidad de información que se genera con las técnicas genómicas requiere de programas informáticos que permitan filtrar los resultados obtenidos y contextualizarlos, priorizando genes candidatos o buscando posibles interacciones entre ellos en vías metabólicas, de señalización intracelular o de función celular¹⁶.

A partir de los resultados obtenidos mediante las técnicas genómicas es posible llevar a cabo aproximaciones estadísticas que permiten focalizar y enfatizar los resultados obtenidos. Las más utilizadas son:

- GWAS, por sus siglas en inglés, Genome Wide Association Study o estudios de asociación genética: Basado en un modelo poligénico de riesgo de una enfermedad, originado a su vez por el padre de la genética cuantitativa, Falconer DS. El modelo se fundamenta en la idea de que el riesgo subyacente a padecer una enfermedad tiene una distribución continua, asumiendo que únicamente los individuos que sean portadores de estas variantes genéticas superarán el umbral determinado para dicha enfermedad¹⁷. A partir de SNPs, los estudios de asociación realizan comparativas de frecuencias alélicas de cientos de miles de variantes en individuos control y afectados para una patología en cuestión³. Se espera que si existen variantes que predisponen a la enfermedad, las frecuencias sean mayores en los individuos afectados que en los controles sanos. Siguiendo el modelo poligénico, la obtención de una variante que se asocie a la enfermedad únicamente explicará un porcentaje pequeño de ésta.

Para obtener resultados significativos se requiere un gran número de muestras y el coste es elevado. No permiten analizar las variantes de baja frecuencia o poco comunes que podrían explicar algunas de estas enfermedades², aunque es útil para identificar loci implicados, vías implicadas y variaciones compartidas entre desórdenes, como en el caso de enfermedades autoinmunes, en donde los estudios de GWAS han permitido identificar variantes genéticas fuertemente asociadas a enfermedades como la diabetes tipo I, el lupus o la esclerosis múltiple³.

- Genome-Wide Linkage Analysis o Análisis de ligamiento del genoma completo: Basado en la observación de genes que se localizan muy próximos a una determinada región del cromosoma donde se encuentran y a la que permanecen ligados durante la meiosis¹⁸. Es un método estadístico de mapeo genético cuyo objetivo es analizar variantes poco comunes, compartidas entre individuos con parentesco¹⁹.

Los genotipos se pueden generar mediante SNP-Array y no son necesarios tantos individuos como en el GWAS para el análisis, aunque se requieren al menos los análisis conjuntos de parientes de primer grado para evitar generar falsos positivos¹⁹. Otra de las ventajas de esta técnica, es que se pueden identificar regiones específicas del genoma limitando el número de genes a analizar y determinar la asociación estadística de una variante o un gen a la patología de estudio.

Hasta el momento, estas técnicas han implicado una nueva visión en el abordaje de las enfermedades complejas. Han señalado mejoras en el pronóstico y terapia de algunas patologías, disminuyendo la mortalidad y morbilidad. Sin embargo, se necesita un mejor abordaje en el análisis de los datos para que éstos puedan llegar a ser útiles tanto para el clínico como para el paciente²⁰.

Son necesarios modelos cuantitativos y estadísticos que permitan determinar el riesgo real a padecer la enfermedad. De hecho, en cuanto a la interacción genotipo-ambiente existen varios modelos matemáticos en los que se consideran la predisposición genética proveniente de estudios en familias, fenotipo visible o secuencia de ADN; y el ambiente, a partir de estudios epidemiológicos utilizando cuestionarios o medidas directas²¹. El modelo simple, considera portadores vs no portadores de una variante de rasgo dominante, en relación a los expuestos vs no expuestos a un determinado factor ambiental²². El modelo complejo considera 3 o más categorías de exposición, bajo, medio y alto, y/o varias categorías genéticas, considerando 2 alelos, 3 genotipos; o modelos genéticos dominante, co-dominante y recesivo²³. A partir de estos modelos, se consigue determinar el riesgo relativo a padecer alguna de estas enfermedades.

1.1.1 Cardiopatías congénitas. Fenotipos.

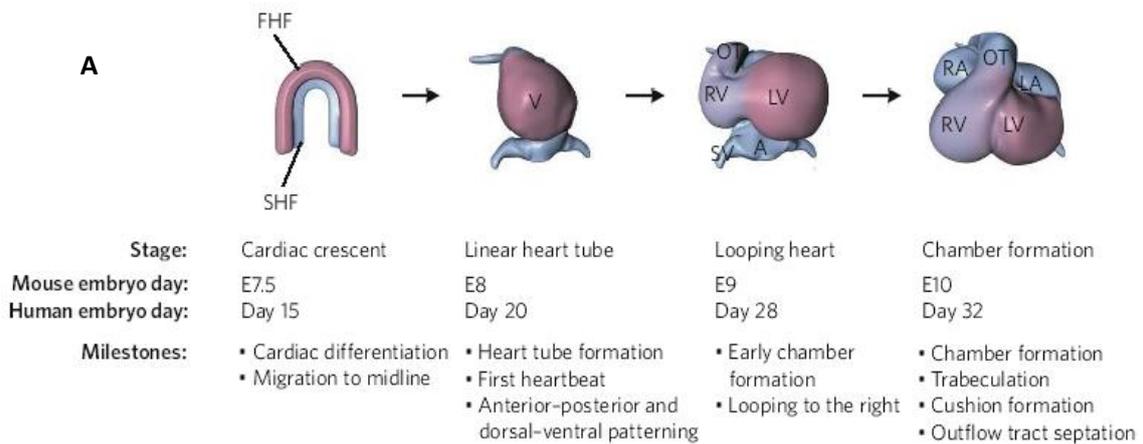
Las cardiopatías congénitas (CC) son enfermedades producidas por un defecto en el desarrollo, que afectan a la anatomía del corazón y que se producen previamente al nacimiento. La incidencia de las CC varía según los autores, oscilando entre 4-50/1000 nacidos vivos y son además, responsables del 10% de los abortos espontáneos, ²⁴.

El corazón, es una estructura asimétrica formada por tres ejes, antero-posterior (A-P), dorsal-ventral (D-V) e izquierdo-derecho (L-R). Es un órgano que empieza a formarse en el estadio 7.5 en ratones y 15 en humanos. Este proceso finaliza en ambos casos en el nacimiento (Fig. 1.2.A)²⁵.

El proceso de desarrollo se inicia cuando los precursores de las células cardíacas se distribuyen lateralmente en el epiblasto adyacente al tubo primitivo. El mesodermo precardiaco migra del tubo primitivo dirección antero-lateral. Se forman dos líneas cardiogénicas a cada lado del tubo primitivo. Estas líneas cardiogénicas albergan las células progenitoras que darán lugar a aurículas y ventrículos, y también a aquellas que darán lugar al tracto de salida y al endocardio. Después de la diferenciación del mesodermo, las dos líneas se fusionan formando un único tubo y se inicia la torsión de

éste para dar lugar a las distintas cámaras que forman el corazón. Se distinguen ejes antero-posterior e izquierdo-derecho asimétricos. La región ventricular primitiva gira hacia su lado central y rota hacia la derecha. Los lados izquierdo y derecho originales vuelven al lado central y dorsal. Posteriores giros implican el cambio de posición de los ventrículos hacia la parte caudal y las aurículas hacia la parte ventral. Una vez se han producido las torsiones que dan lugar a las cámaras, se observa una transformación en la expresión de los genes implicados en el desarrollo cardíaco, responsables de la diferenciación de cada región.

En una segunda fase, la de maduración (Fig. 1.2.B), se originan los septos entre aurículas, ventrículos y tracto de salida. Una nueva torsión de los vasos de salida de los ventrículos junto con la división del tracto de salida permitirá separar el tracto en dos, la aorta, que nace del ventrículo izquierdo y la arteria pulmonar, que nace del ventrículo derecho, finalizando así, la formación del órgano²⁶.



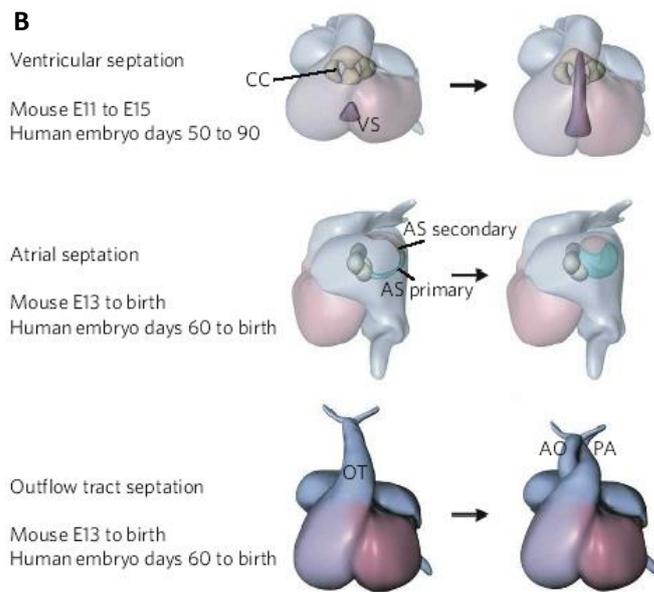


Fig. 1.2. Desarrollo del corazón.

A. Estadios tempranos del desarrollo. Se forman a partir de dos precursores existentes, la primera línea cardiogénica (FHF) y la segunda línea cardiogénica (SHF). Ambas contribuyen a la formación de los ventrículos (LV y RV) en primera instancia, actuando más tarde en el desarrollo del tracto de salida (OT), del seno venoso (SV) y de las aurículas (LA y RA). **B.** Maduración del corazón. Las almohadillas cardíacas (CC) dan lugar a las válvulas aurículo-ventriculares. Se forman también las separaciones entre ventrículos (VS) y entre aurículas (AS). Se conecta la aorta (AO) y la arteria pulmonar (PA) (Imagen extraída de ²⁶).

Las malformaciones producidas durante la embriogénesis del corazón afectan a prácticamente toda su anatomía (Fig. 1.3) y se pueden clasificar dependiendo de si son desórdenes cianóticos, aquellos con afectación a los niveles de oxígeno, o no cianóticos, aquellos sin afectación a los niveles de oxígeno; según la estructura afectada pudiendo referirse a venas, aurículas, ventrículos, septos y grandes vasos; o en base a su fisiopatología, es decir, según las consecuencias que se producen a nivel circulatorio.

Según la clasificación de Hoffman *et al.*, podemos diferenciar entre ²⁷ (Fig. 1.3):

- CC con incrementos en el flujo de sangre pulmonar defectos en los septos sin obstrucción pulmonar y desviación izquierda-derecha.
 - Polo venoso: Drenaje anómalo de la vena pulmonar.
 - Comunicación interauricular (CIA).
 - Comunicación interventricular (CIV).
 - Defectos en los septos aurículo-ventriculares (AV).
 - Tronco arterioso persistente (un solo vaso desde los ventrículos) y ductus arterioso permeable (comunicación entre la arteria aorta y pulmonar) (TAP y DAP).
- CC con descenso en el flujo de sangre pulmonar (defectos en los septos con obstrucción pulmonar y desviación derecha-izquierda).
 - Estenosis pulmonar con CIA: Obstrucción de la válvula pulmonar.

- Tetralogía de Fallot (TOF): caracterizada por 4 defectos que provocan la mezcla de sangre arterial con la venosa. Estenosis pulmonar, CIV, dextraposición de la aorta e hipertrofia ventricular.
- Atresia tricúspide: Ausencia de la válvula tricúspide y atrofia del ventrículo derecho.
- Anomalía de Ebstein: Defectos en la válvula tricúspide que provoca una anomalía en la separación de las dos cámaras derechas.
- Ventrículo único
- CC con obstrucción de la circulación sanguínea y sin defectos en los septos.
 - Estenosis pulmonar
 - Estenosis aórtica
 - Coartación de la aorta: Estrechamiento de la arteria.
- CC incompatibles con la circulación postnatal.
 - CC ductus dependiente: Atresia pulmonar y aórtica, coartación aórtica, atresia del arco aórtico y presencia de ductus arterioso persistente.
 - Transposición de grandes vasos (TGV).
 - Obstrucción de venas pulmonares.
- CC manifiestas en la edad adulta.
 - Válvula aórtica bicúspide: Válvula aórtica con 2 valvas en lugar de 3.
 - Anomalías de las arterias coronarias.
 - Síndrome de Wolff-Parkinson-White: Doble ruta eléctrica al corazón.
 - Transposición de grandes vasos corregida.

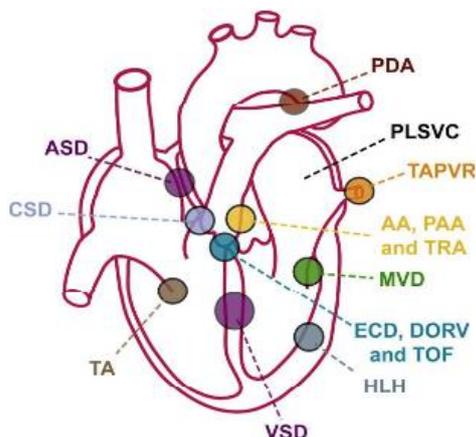


Figura 1.3. Anomalías cardíacas y zonas de afectación. ASD, comunicación interauricular; CSD, defecto del sistema de conducción; AA, atresia aórtica; HLH, hipoplasia cavidades izquierdas; MVD, defecto de la válvula mitral; PAA, atresia arteria pulmonar; PDA, ductus arterioso; TA, atresia tricúspide; TOF, tetralogía de Fallot; TRA, truncus arterioso; VSD, comunicación interventricular; PLVSC, defecto vena cava (Imagen extraída de ³²).

La supervivencia en estos pacientes ha aumentado del 30% al 85% en los últimos 70 años, gracias a la cirugía postnatal²⁸. Hasta el momento es el único tratamiento para solventar estos problemas en el desarrollo cardíaco. A pesar de ello, es muy común que los pacientes sometidos a cirugía presenten una cardiomiopatía en la edad adulta, que hace disminuir su calidad de vida e incluso puede llegar a causar la muerte²⁶. Estudios recientes han demostrado en modelos animales nuevas terapias con células madre que

podrían ser capaces de remodelar el órgano y mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes²⁹.

Está demostrado que existe un componente genético en estas patologías, ya que diversos estudios han confirmado que se produce la recurrencia familiar³⁰. Las CC asociadas a familias pueden presentar distintos patrones de herencia tales como, autosómica dominante, recesiva y ligado al X con alta penetrancia, aunque mayoritariamente presentan una herencia compleja³¹. Además, se manifiestan distintos tipos de CC en una misma familia, haciendo que su estudio sea más complejo por la heterogeneidad fenotípica que presentan³⁰. Se han observado alteraciones en un mismo gen que van asociados a distintos fenotipos y a su vez, un mismo fenotipo que puede ser provocado por alteraciones en distintos genes³²(Fig. 1.4).

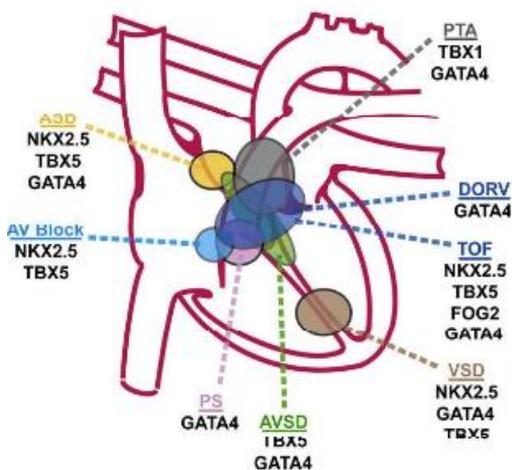


Figura 1.4. Zonas del corazón donde se producen la mayoría de CC. Se señalan factores de transcripción que van asociados a distintos fenotipos. Véase que el mismo gen puede participar en la patogénesis de diversas CC y que una CC puede estar asociada distintos genes (Imagen extraída de ³²).

El desarrollo del corazón es altamente complejo. Se conocen muchos genes que influyen en el correcto desarrollo de su morfogénesis. Todos los genes descritos relacionados con CC están recogidos en una plataforma online (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/chdwiki/index.php/CHD:Genes>)³³ (Tabla 1.1).

Actualmente se han generado hasta 4373 ratones a los que se les ha eliminado un gen específico. De éstos, al menos 267 entre los que se encuentran TBX1, Nkx2.5, TBX5, TBX20, GATA4 y MEF2, entre otros, presentan una morfología cardíaca anormal. Es lógico pensar pues, que son cientos los genes que regulan el desarrollo cardíaco³⁴. Gracias a técnicas como la resonancia magnética, se han podido monitorizar embriones modificados genéticamente, pudiendo confirmar la implicación de genes como Cited2, Pitx2c o Lims1, en el proceso de desarrollo^{34,35}.

Desde el momento en que las células del mesodermo empiezan a migrar para la formación del tubo primitivo que dará lugar al corazón, hasta la formación completa de las cuatro cámaras, intervienen múltiples factores. Un error en cualquiera de ellos puede

acabar provocando defectos en el desarrollo del corazón. Se conocen varios factores de transcripción responsables de la regulación del desarrollo del corazón²⁵. Entre los más citados se encuentran, TBX5, responsable del síndrome de Holt-Oram; Nkx2.5, relacionado con CIA hereditaria, GATA4 que interacciona con Nkx2.5²⁴ y TBX1 presente en la región delecionada del síndrome de DiGeorge y responsable de la presencia de TOF, TAP o coartación aórtica²⁶.

Las CC pueden presentarse aisladas o asociadas a síndromes. Las aneuploidías son la primera causa de CC asociadas a síndromes, tales como, trisomías del cromosoma 8, 9, 13, 18 y 21, síndrome de DiGeorge (del22q11.2), síndrome de Klinefelter, entre otros^{31,36}.

Genes asociados a CC aisladas	Genes asociados a CC sindrómicas y no sindrómicas	Genes asociados a CC sindrómicas
ACTC, ACVR1, ACVR2B, ALDH1A2, ANKRD1, CFC1/CRYPTIC, CITED2, CRELD1, ELN, FOG2/ZFPM2, FOXC1, GATA4, GATA6, GDF1, GJA1, HAND2, HEY2, IRX4, JAG1, LEFTY2, MAP3K7IP2, MYH11, MYH6, MYH7, NKX2-5/NKX2.5, NKX2-6, NODAL, NOTCH1, PDGFRA, TBX1, TBX20, TDGF1, TFAP2B, THRAP2, ZIC3	ATRX, BCOR, BRAF, CBP/CREBBP, CFC1/CRYPTIC, CHD7, COL2A1, CSDE1/NRAS, EHMT1, ELN, EVC, EVC2, FBN1, FLNA, FOXC1, FOXL2, G6PC3, GJA1, GPC3, HOXA1, HRAS, JAG1, KRAS, LBR, MAP2K1/MEK1, MAP2K2/MEK2, MGP, MID1, MLL2, NF1, NOTCH2, NPHP3, NSD1, PTPN11, RAF1, RAI1, RBM10, ROR2, SALL4, SH3PXD2B, SHOC2, SIP1/ZEB2/ZFHX1B, SLC2A10, SOS1, STRA6, TBX1, TBX3, TBX5, TFAP2B	ACTC, ACVR1, ACVR2B, ALDH1A2, ANKRD1, ATRX, BCOR, BRAF, CBP/CREBBP, CFC1/CRYPTIC, CHD7, CITED2, COL2A1, CRELD1, CSDE1/NRAS, EHMT1, ELN, EVC, EVC2, FBN1, FLNA, FOG2/ZFPM2, FOXC1, FOXC1, FOXL2, G6PC3, GATA4, GATA6, GDF1, GJA1, GPC3, HAND2, HEY2, HOXA1, HRAS, IRX4, JAG1, KRAS, LBR, LEFTY2, MAP2K1/MEK1, MAP2K2/MEK2, MAP3K7IP2, MGP, MID1, MLL2, MYH11, MYH6, MYH7, NF1, NKX2-5/NKX2.5, NKX2-6, NODAL, NOTCH1, NOTCH2, NPHP3, NSD1, PDGFRA, PTPN11, RAF1, RAI1, RBM10, ROR2, SALL4, SH3PXD2B, SHOC2, SIP1/ZEB2/ZFHX1B, SLC2A10, SOS1, STRA6, TBX1, TBX20, TBX3, TBX5, TDGF1, TFAP2B, THRAP2, ZIC3

Tabla 1.1. Genes descritos relacionados con el desarrollo de CC. Se diferencian entre genes asociados a CC aisladas, genes asociados tanto a CC sindrómicas como no sindrómicas y genes asociados únicamente a CC sindrómicas.

Los CNVs también pueden contribuir a la manifestación de CC aisladas. Las causas de las CC no son debidas a los CNVs en su conjunto sino a la alteración de la dosis de genes específicos. En el síndrome 22q11.2 se pierden hasta 30 genes y se ha demostrado en modelos murinos que TBX1 es el mayor responsable de la CC que presentan, por su implicación en la proliferación celular en la segunda línea cardiogénica³¹. Aun así, no se puede descartar que otros genes dentro de la alteración puedan contribuir al fenotipo cardíaco. Otros estudios de CNVs han identificado otros genes causales como GATA4 o miembros de la vía de Notch, Jag1 y Notch1, responsables de la diferenciación a cardiomiocitos^{25,31}. Además, la identificación de CNVs junto con estudios de vías de

desarrollo e interacciones genéticas han identificado hasta 2500 genes de la vía Wnt involucrada en la proliferación y diferenciación celular^{31,37}.

Estudios de SNPs en enfermos sindrómicos, también han identificado genes como TBX5 o genes de la vía RAS-MAPK. Al igual que en enfermos que presentan CC aislada también se han identificado los genes Nkx2.5, Nkx2.6, GATA4, GATA5, GATA6, IRX4, TBX20 o ZIC3 en pacientes sindrómicos^{31,37}.

Estudios de GWAS han relacionado genes como PTPN11, que provoca estenosis pulmonar, y GPC5, implicado en vías de desarrollo, como responsables de causar CC³⁷. Estos genes contribuirían al fenotipo siendo un factor de susceptibilidad y riesgo.

Cabe destacar que en los últimos años también se han descrito mutaciones en regiones no codificantes, promotores, microARNs, intrones y regiones reguladoras que pueden jugar un papel importante en la manifestación de las CC³⁷.

Respecto al efecto ambiental, se ha demostrado que existen diversas actuaciones y/o patologías que pueden afectar al correcto desarrollo del corazón, tales como la exposición a solventes orgánicos durante el embarazo, presentar diabetes³⁸, consumo por parte de la madre gestante de vitamina A, tabaco u otras drogas^{39,40} e incluso presentar obesidad o alteraciones en el perfil lipídico^{41,42}.

1.1.2 Enfermedades mentales graves. Fenotipos

Las enfermedades mentales graves (EMG) son producidas por defectos en el neurodesarrollo⁴³ que conducen a alteraciones de las capacidades cognitivas y afectivas, que pueden traducirse en dificultades para razonar, disminución o pérdida de la conexión con la realidad, alteraciones de comportamiento y problemas para adaptarse a la vida cotidiana. Se manifiestan mayormente en la adolescencia o al inicio de la edad adulta aunque en algunos casos se pueden manifestar en edad infantil. Presentan una prevalencia conjunta del 4%. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2014, el suicidio llevado a cabo por enfermos mentales graves se ha convertido en la segunda causa de muerte entre jóvenes de 15-29 años.

El cerebro es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano que junto con el cerebelo y el bulbo raquídeo forman el encéfalo, parte central del sistema nervioso. El cerebro está compuesto por más de 100 billones de células nerviosas que se comunican por trillones de conexiones llamadas sinapsis.

Está formado por distintas áreas (Fig. 1.5 A):

- **Córtex:** Región más externa del cerebro responsable del pensamiento y de los movimientos voluntarios.
- **Tronco encefálico:** Región localizada entre la médula espinal y el resto del cerebro. Lleva a cabo funciones básicas como la respiración o el sueño.
- **Ganglio basal:** Conjunto de estructuras en el centro del cerebro. Coordinan la información procedente de las distintas áreas cerebrales.

- Cerebelo: Región localizada en la base y zona posterior del cerebro, responsable de la coordinación y el equilibrio.

El cerebro se puede dividir también en distintos lóbulos (Fig 1.5 B):

- Lóbulo frontal: Responsable de la resolución de problemas, el juicio y la función motora.
- Lóbulo parietal: Responsable de las sensaciones, la escritura y la posición corporal.
- Lóbulo temporal: Responsable de la memoria y la audición.
- Lóbulo occipital: Responsable del sistema de procesamiento visual.

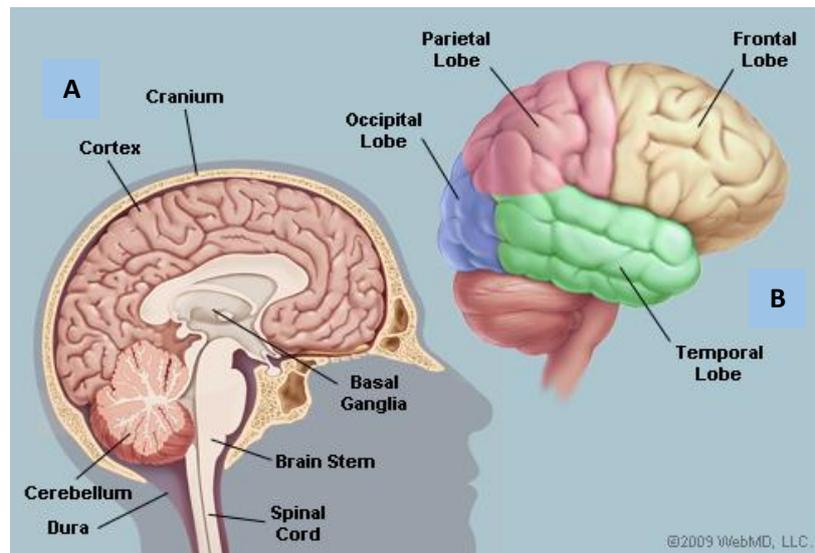


Fig. 1.5. Imagen anatómica del cerebro. A. Corte sagital del cerebro que muestra sus distintas estructuras: cráneo, córtex, ganglio basal, tronco encefálico, cerebelo, médula espinal y duramadre. B. Vista tridimensional del cerebro que muestra los distintos lóbulos que lo componen: frontal, parietal, occipital y temporal. Imagen extraída de <http://www.webmd.com/>.

El desarrollo del cerebro es un proceso muy complejo que empieza en la tercera semana de gestación con la diferenciación de las células neuronales progenitoras y se extiende hasta la adolescencia tardía⁴⁴. La producción de neuronas se inicia en E42 y finaliza a las 18 semanas de gestación⁴⁴. Así como se producen las neuronas, éstas migran a las diferentes áreas cerebrales donde empiezan a crear conexiones entre ellas estableciendo redes neuronales simples. Al final de la etapa prenatal las conexiones mayores están completadas⁴⁴.

En el período postnatal se observan un exceso de conexiones neuronales respecto al adulto que van disminuyendo a lo largo de los años⁴⁵. El tamaño cerebral aumenta hasta 4 veces en el período preescolar alcanzando el 90% del volumen del adulto a los 6 años⁴⁶.

La sintomatología asociada a las EMG refleja defectos a nivel de sistema nervioso central (SNC) que sugieren problemas a nivel anatómico⁴⁷. Mediante técnicas de imagen se ha

comprobado que el tamaño del cerebro es mayor en pacientes que padecen EMG aunque no en todas sus estructuras⁴⁸. Los ventrículos se ven aumentados pero el córtex prefrontal se ve reducido⁴⁹. Además, existe una pérdida de conectividad entre las distintas regiones cerebrales durante el desarrollo y una disminución de la actividad eléctrica que podría explicar los caracteres “neurocomportamentales” de las EMG⁵⁰.

Clasificar este tipo de enfermedades es bastante complejo por su heterogeneidad fenotípica. Los distintos autores discrepan a la hora de definir las. Sin embargo, existe el manual de diagnóstico y estadística en psiquiatría (DSM) que aunque es controvertido, es el mayoritariamente utilizado en clínica. La versión actual es la DSM-V (*American Psychiatric Association*, 2013) y las clasifican en: desórdenes del neurodesarrollo; SZ y otros desórdenes psicóticos; TBP; trastorno depresivo; trastornos de ansiedad; trastorno obsesivo-compulsivo y relacionados; trastornos disociativos; trastornos traumáticos o relacionados con el estrés; trastornos psicósomáticos; trastornos alimentarios; trastornos de eliminación; trastornos del sueño; trastornos neurocognitivos; trastornos sexuales; trastornos de la personalidad; trastornos relacionados con el consumo de sustancias; trastornos disruptivos, del control de impulsos o de conducta; trastornos parafílicos y trastornos del movimiento inducidos por medicación.

Los que presentan una mayor inquietud por su alta prevalencia y su manifestación severa son:

- Trastornos de espectro autista: Con una prevalencia variable entre el 0.7%-1%⁵¹ son aquellos que afectan de una manera moderada a grave las habilidades sociales y la comunicación y aparecen patrones restrictivos o repetitivos del comportamiento⁵². Se caracterizan por manifestarse en edades tempranas.
- Esquizofrenia: Grupo de desórdenes amplio caracterizados por el comportamiento social anómalo con pérdida de la conexión de la realidad o psicosis. Se caracteriza por la presencia de síntomas positivos que provocan una distorsión de las funciones normales, y síntomas negativos que provocan una pérdida de las funciones normales. Los síntomas positivos incluyen ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje desorganizado y comportamiento catatónico. Los síntomas negativos, por otro lado, incluyen la indiferencia emocional, empobrecimiento del pensamiento que se refleja en el lenguaje y falta de voluntad (DSM-V).
La prevalencia de estos trastornos se calcula en un 1% aproximadamente^{53,54}.
- Trastorno bipolar: Se caracteriza por presentar al menos un episodio maníaco manifestando una alteración del estado de ánimo caracterizado por la euforia, durante la vida de un individuo. Éste suele acompañarse de un episodio depresivo manifestando una alteración del estado de ánimo caracterizado por el abatimiento. Se le conoce como un trastorno cíclico de manía-estadonormal-depresión. El valor de prevalencia se estima en un 1.8%⁵⁵.

- Depresión severa recurrente (DSR): La característica esencial es el mantenimiento de un estado deprimido o pérdida de interés por uno mismo y el entorno durante un período consecutivo de al menos 2 semanas. Otros síntomas característicos son los cambios de apetito, del sueño y de la actividad psicomotora; falta de energía, dificultad para pensar con claridad, infravaloración e ideas suicidas (DSM-V). La prevalencia en población general es del 8-12%⁵⁶.

El tratamiento para este tipo de trastornos es complejo ya que la falta de conocimiento de su etiología hace que los fármacos no sean dirigidos a dianas específicas de cada uno de ellos. Así, para la SZ o trastornos maníacos se administran antipsicóticos que suelen actuar como antagonistas de los receptores de dopamina. Existen fármacos de primera generación (clorprozapina, haloperidol, tiodirazina) y de segunda generación (clozapina, risperidona, olanzapina, ziprasidona, quetiapina). Ambos tienen la capacidad de aliviar los síntomas positivos pero los de segunda generación actúan además sobre la serotonina, aliviando también síntomas negativos. Tanto los de primera como los de segunda generación provocan efectos secundarios, aunque los de segunda generación tienen la ventaja de producir menos. Entre los efectos secundarios producidos por los fármacos de primera generación se encuentran principalmente los efectos neurológicos caracterizados por las alteraciones motoras aunque también pueden manifestar somnolencia, convulsiones, efectos dermatológicos, efectos hepáticos, efectos cardiovasculares y efectos sobre la función sexual, entre otros. En cuanto a los fármacos de segunda generación, el efecto secundario principal es la manifestación del síndrome metabólico, caracterizado por obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, hipertensión, hipocolesterolemia HDL e hiperglucemia que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes⁵⁷.

En el caso del trastorno bipolar los antipsicóticos más utilizados son la quetiapina, carbamazepina, olanzapina y lamotrigina en combinación con litio. La efectividad de los antidepresivos es controvertida porque suele provocar la manifestación de la fase maníaca. Es por ello que se suelen administrar combinaciones de fármacos⁵⁸.

Los fármacos actuales presentan buena eficacia en el tratamiento de los síntomas positivos pero no controlan el deterioro cognitivo asociado a la progresión de estas enfermedades. Además, y tal y como se ha comentado, todos los antipsicóticos se asocian a serios efectos secundarios adversos. Esclarecer las bases moleculares de las enfermedades mentales graves es fundamental para identificar nuevas dianas terapéuticas abriendo nuevos campos de estudio hacia la farmacogenómica y consiguiendo así, una medicina personalizada.

Las enfermedades mentales, al igual que las cardiopatías congénitas, son enfermedades complejas que presentan variabilidad genética, penetrancia incompleta, efectos pleiotrópicos y variabilidad fenotípica⁵⁹. Además entre los distintos desórdenes

presentan heterogeneidad, superposición e interdependencia, que dificulta más, si cabe, su estudio⁶⁰.

Los estudios genéticos para identificar genes asociados a EMG se han centrado en GWAS, arrays para identificar CNVs, análisis de vías moleculares, comparación génica en gemelos univitelinos, análisis de ligamiento en familias con elevada prevalencia y comprobación de genes candidatos en modelos animales⁶⁰.

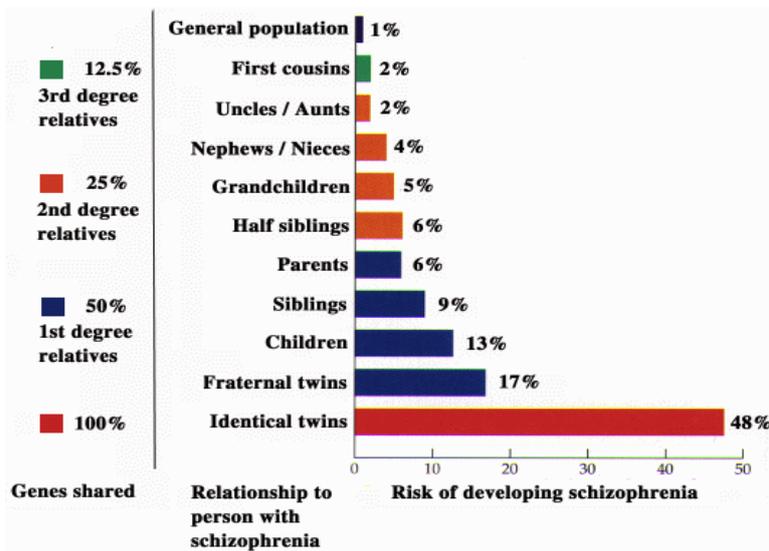


Fig. 1.6. Representación del riesgo de padecer esquizofrenia según el grado de parentesco (Imagen extraída de ⁶²).

Los estudios en familias han demostrado que existe un componente genético importante en estos trastornos y se calcula una heredabilidad del 60-80%⁶¹. Aunque presenten una elevada heredabilidad, el ambiente juega un papel relevante en la manifestación de la enfermedad, ya que, la probabilidad de padecer SZ en el caso de tener un hermano gemelo afecto, con el que se comparten el

100% de los genes, es tan sólo del 48%⁶² (Fig. 1.6). Algunos estudios centrados en identificar CNVs han demostrado la relación de algunos genes con la enfermedad, como el NRXN1 que codifica para la neurexina, proteína que interviene en la adhesión celular durante la sinapsis; asociado tanto a SZ como a TEA⁶¹. Además se ha observado que estos enfermos (SZ y TEA) presentan un mayor número de CNVs que los controles, algunos de ellos afectados de síndromes conocidos como el 22q11.2⁶¹. Los genes contenidos en estas regiones alteradas corresponden a genes implicados en la señalización sináptica, migración neuronal (proceso por el cual las células nerviosas inmaduras se desplazan desde el lugar de producción, la zona ventricular, hasta su localización final), metabolismo de neurotransmisores y mielinización⁵⁹.

Respecto a los estudios de GWAS, se han identificado SNPs comunes asociados tanto a TBP como a SZ y también a TEA y SZ. Entre TEA y SZ han encontrado hasta 28 SNPs comunes relacionados con la regulación de los receptores de glutamato o NMDA, implicados en el desarrollo del SNC, regulación del flujo del calcio y canales de potasio y con procesos de adhesión celular⁶³. La mayoría de SNPs identificados contribuyen a la manifestación de las EMG con un efecto leve y en conjunto podrían explicar hasta el 33% del riesgo genético asociado a la manifestación de EMG^{56,59,64}. Los genes identificados más asociados al riesgo genético a padecer esquizofrenia están recogidos en la tabla 1.2.

Estudios clínicos de vías moleculares han mostrado alteraciones en moléculas de señalización como la neurotrofina, la relina y PTEN; en neurotransmisores como la serotonina y el glutamato; y en proteínas sinápticas como la neurexina, SHANK y neurogilina⁶⁵. Además, en TBP se han observado cambios de expresión en marcadores de integridad celular⁶⁶, de señalización de la vía de GSK3 β ⁶⁷, en factor de crecimiento derivado de cerebro o BDNF⁶⁸ y en el número de receptores de glutamato⁶⁹, además de disfunción mitocondrial⁷⁰ y alteración en astrocitos y oligodendrocitos⁷¹.

El componente ambiental adquiere gran importancia en estos trastornos tanto a nivel pre como postnatal. Infecciones víricas uterinas en la madre gestante, la hipoxia en el feto o el estrés, conllevan una reducción del volumen del hipocampo relacionado con la SZ y el TBP^{72,73}. Durante la edad infantil, el maltrato y el estrés psicosocial juegan un papel importante en su desarrollo⁷⁴ y en cuanto a la adolescencia, las experiencias traumáticas y sobretodo el consumo de drogas como el cannabis, a edades tempranas se ha relacionado significativamente con trastornos psicóticos y otros trastornos relacionados⁷⁵.

Gen	Nombre completo	Localización
MTHFR	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)	1p36.3
RGS4	regulator of G-protein signaling 4	1q23.3
PLXNA2	plexin A2	1q32.2
DISC1	disrupted in schizophrenia 1	1q42.1
TPH1	tryptophan hydroxylase 1	11p15.3-p14
DRD4	dopamine receptor D4	11p15.5
GRIK4	glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	11q22.3
DRD2	dopamine receptor D2	11q23
FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	11q24.2
OPCML	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	11q25
GRIN2B	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B	12p12
DAO	D-amino-acid oxidase	12q24
HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	13q14-q21
DAOA	D-amino acid oxidase activator	13q33.2 13q34
NPAS3	neuronal PAS domain protein 3	14q12-q13
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	14q32.32 14q32.32
CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7	15q14
RPGRIP1L	RPGRIP1-like	16q12.2
HP	haptoglobin	16q22.1
TP53	tumor protein p53	17p13.1
SLC6A4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	17q11.1-q12
APOE	apolipoprotein E	19q13.2
IL1B	interleukin 1, beta	2q14
GAD1	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)	2q31
ZNF804A	zinc finger protein 804A	2q32.1
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	2q33.3-q34
PRODH	proline dehydrogenase (oxidase) 1	22q11.21
COMT	catechol-O-methyltransferase	22q11.21-q11.23 22q11.21
GABRB2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2	5q34
DRD1	dopamine receptor D1	5q35.1
DTNBP1	dystrobrevin binding protein 1	6p22.3
OFCC1	orofacial cleft 1 candidate 1	6p24.3
MUTED	muted homolog (mouse)	6p25.1-p24.3
GRM3	glutamate receptor, metabotropic 3	7q21.1-q21.2
RELN	reelin	7q22
NRG1	neuregulin 1	8p12
PPP3CC	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform	8p21.3
SLC18A1	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1	8p21.3

Tabla 1.2. Genes descritos relacionados con el desarrollo de EMG. Se indica el nombre del gen abreviado, su nombre completo y su localización.

1.2 La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular localizado en el citoplasma de células eucariotas responsable de producir energía para el mantenimiento de la célula a través de la fosforilación oxidativa u OXPHOS, por sus siglas en inglés *Oxidative Phosphorylation*; regular la homeostasis del Ca^{2+} y participar en el proceso de muerte celular o apoptosis.

La mitocondria tiene un tamaño aproximado de entre 0.5-1 micras de diámetro y hasta 7 micras de longitud aunque su morfología es difícil de describir porque es una estructura dinámica que sufre procesos de fusión, por la unión de dos organelas, y fisión por procesos de división de una organela, dependiendo del estado funcional de la célula. Además, el tamaño, el número y el posicionamiento de estas organelas son también dependientes de la célula y de su estado metabólico pudiendo variar en un determinado tejido en presencia de un estímulo fisiológico.

Contiene un genoma propio, una molécula circular cerrada de ADN de doble cadena, a partir del cual sintetiza 13 polipéptidos componentes de los complejos de OXPHOS, 22 ARN de transferencia (ARNt), y 2 ARN ribosomales (ARNr), aunque la mayoría de proteínas son sintetizadas en el núcleo y transportadas hacia la mitocondria⁷⁶. De los 13 polipéptidos, siete forman parte del complejo I (subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6); uno corresponde al complejo III (citocromo b); tres subunidades del complejo IV (COXI; COXII y COXIII) y dos subunidades del complejo V (ATPasa 6 y ATPasa 8). El resto de las subunidades polipeptídicas de estos complejos y el complejo II íntegramente, están codificadas por el ADN nuclear.

La mitocondria está formada por una membrana externa (ME) y una membrana interna (MI), que separan dos espacios intramitocondriales, el espacio intermembrana (EIM) comprendido entre ambas membranas y la matriz (MZ), envuelta por la MI (Fig. 1.7), y que contiene el ADN mitocondrial (ADNmt), el complejo de la piruvato deshidrogenasa, los enzimas del ácido cítrico y de la ruta de la β -oxidación.

La ME y la MI presentan una composición proteica diferente. Están formadas por proteínas sintetizadas en la propia mitocondria, ya que posee un proteoma de unas 5000 proteínas, aunque en su mayoría son sintetizadas en el núcleo e importadas a la mitocondria a través de las proteínas translocasa TOM, localizada en la ME y TIM, localizada en la MI que permiten la entrada de proteínas nucleares en el organelo.

La ME es permeable a pequeñas moléculas (<5kDa) e iones gracias a canales transmembrana compuestos por porinas. La MI, en cambio, contiene una gran cantidad de cardiolipina, haciéndola impermeable a los iones. El transporte de moléculas a la matriz se realiza mediante proteínas de transporte que la hacen selectiva. Gracias a esta permeabilidad selectiva, se separan las enzimas implicadas en rutas que tienen lugar en el citosol como la glucólisis, de las que tienen lugar en la matriz: el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos. Así, se permite la entrada de piruvato proveniente de la oxidación de la glucosa y otros azúcares, y de

ácidos grasos, que se oxidarán hasta Acetil-CoA en el ciclo de Krebs llevado a cabo en la MZ.

El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos oxida los grupos acetilo convirtiéndolos en CO₂ que es eliminado por las células, y generando electrones de alta energía transportados por el NADH y el FADH₂ hasta la cadena transportadora de electrones. Los electrones se transferirán a la cadena transportadora de electrones donde finalmente reducirán el O₂ hasta H₂O. La energía liberada es aprovechada para la transformación de adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) en adenosin trifosfato (ATP) en un proceso que se conoce como fosforilación oxidativa.

Las crestas mitocondriales, donde se localizan los complejos multienzimáticos responsables de la fosforilación oxidativa, son repliegues internos de la MI que permiten aumentar la superficie para la producción de las reacciones químicas que darán lugar a la síntesis de ATP. La MI está dividida a su vez en dos, la membrana que forma parte de las crestas (MC) y la que no forma parte de ellas (IBM), cercana a la ME. Éstas, están unidas a través de unas estructuras tubulares o pequeñas muescas llamadas uniones de crestas o *cristae junctions* (CJs)⁷⁷. Las CJs tienen un diámetro de 12-40nm⁷⁸ y se ha sugerido que actúan como barrera para el movimiento de proteínas y metabolitos entre el espacio de las crestas y el EIM⁷⁹. Además, en las CJs se localiza el complejo multiproteico MICOS, *Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System*, responsable del mantenimiento de la estructura de las crestas mitocondriales⁸⁰.

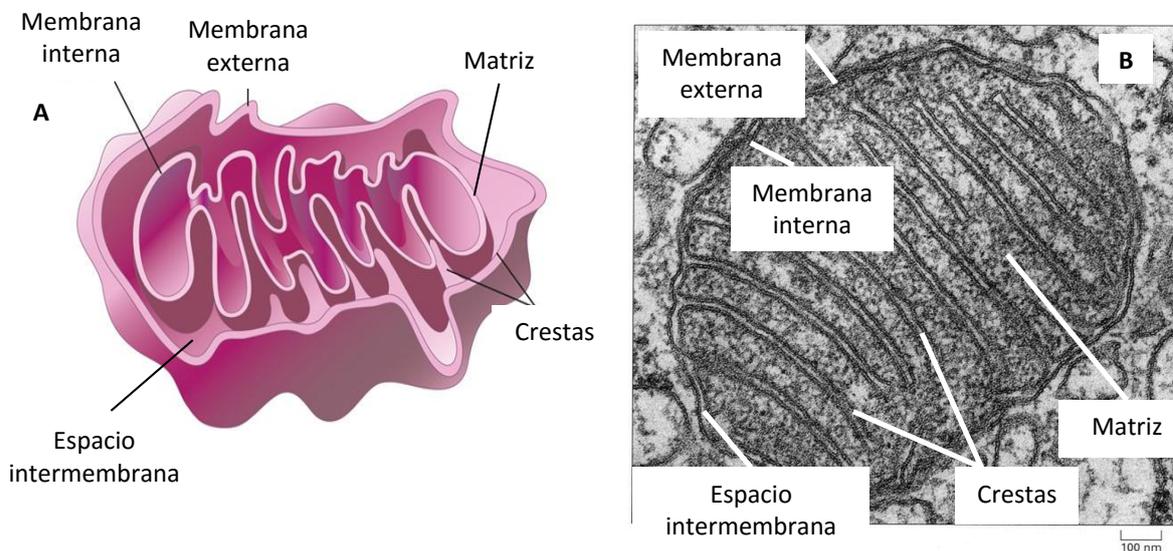


Fig. 1.7. Morfología de la mitocondria. A. Representación esquemática de una mitocondria donde se observan la membrana externa e interna, el espacio intermembrana, las crestas y la matriz. B. Imagen de la ultraestructura de una mitocondria por microscopía electrónica.

1.2.1 Complejo multiproteico MICOS (*Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System*)

El complejo MICOS, también llamado anteriormente, MINOS (*Mitochondrial Inner Membrane Organizing System*), MitOS (*Mitochondrial organizing system*) o complejo de mitofilina; está compuesto por un componente central, Mic60/mitofilina⁸¹ y 6 subunidades, Mic10/MINOS1, Mic12, Mic19/CHCHD3, Mic25/CHCHD6, Mic27/APOOL, Mic26/APOO⁸²⁻⁸⁵, a las que se une una nueva subunidad de reciente descubrimiento, QIL1⁸⁶. Con un peso aproximado de unos 700kDa, se encuentra localizado en las CJs.

MICOS es fundamental para mantener la estructura de la morfología mitocondrial, y más concretamente, para la creación de las crestas mitocondriales, en donde se alojan los complejos OXPHOS. MICOS es necesario para mantener la conexión entre la IBM y la MC. El silenciamiento de las distintas subunidades que forman el complejo provocan una gran alteración de la estructura de la MI. Se pierden la mayoría de las CJs y la MC se compacta separándose de la IBM, provocando que exista menor superficie para alojar a los complejos OXPHOS y, como consecuencia, se reduce la actividad respiratoria, la síntesis de ATP y los nucleoides de ADN mitocondrial^{81,87,88}.

MICOS tiene un doble papel en la mitocondria. Además de su función estructural, el complejo interactúa con múltiples complejos proteicos de la ME, como los complejos SAM y TOM, involucrados en el importe de proteínas a la mitocondria; con la porina VDAC y con la proteína de fusión Ugo1^{87,89-91}. El complejo SAM, por sus siglas en inglés *Sorting and Assembly Machinery complex*, se encarga de clasificar, distribuir y ensamblar las proteínas barril β en la ME⁹². Las proteínas barril β , precursoras de las porinas, se localizan en la ME y están involucradas en la biogénesis mitocondrial. El complejo TOM, por sus siglas en inglés *Translocase of the Outer Membrane Complex*, es responsable de translocar proteínas codificadas en el núcleo, a través de la ME⁹³.

La ausencia de Mic60/mitofilina no sólo provoca un desequilibrio en el importe de proteínas al EIM sino también en el importe de proteínas barril β . Defectos en MICOS provocan un desequilibrio en la biogénesis de las proteínas mitocondriales⁸⁰.

Así pues, MICOS juega un papel relevante en la estructura, dinámica y biogénesis mitocondrial.

1.2.2 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

Las proteínas de membrana y las moléculas que participan de la transferencia de electrones componen lo que se denomina la cadena transportadora de electrones (Fig. 1.8). La fosforilación oxidativa empieza con la entrada de electrones en forma de poder reductor a la cadena respiratoria. Éstos, provienen en su mayoría, de nucleótidos de nicotinamida (NAD⁺ o NADP⁺) o nucleótidos de flavina (FMN o FAD) (aceptores universales de electrones).

Los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria actúan secuencialmente y son capaces de aceptar y ceder electrones. Además del NADH y el FADH₂ existen 3 tipos de moléculas transportadoras, la ubiquinona, los citocromos y las proteínas ferro-sulfuradas. La ubiquinona es pequeña e hidrofóbica y puede difundir a través de la membrana. Los citocromos contienen un grupo hemo que contiene hierro. Existen 3 tipos de citocromos: el a y el b que se unen fuertemente a sus proteínas asociadas mientras que el c se encuentra de forma soluble en el EIM.

En la primera fase de la fosforilación oxidativa, los electrones son transferidos a través de los transportadores, liberando energía que será utilizada para bombear protones desde MZ al EIM, generando un gradiente electroquímico de protones.

En la segunda fase, el flujo de protones desde el EIM hacia la MZ (Fig. 1.7) realizado por la enzima ATP sintasa hará que se impulse la producción de ATP a partir de ADP y P_i. Este flujo de protones genera además un gradiente de pH, con un valor mayor en la MZ y un gradiente de voltaje o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) a través de la MI, manteniéndose negativo en el interior y positivo en el exterior.

La síntesis de ATP se basa en la hipótesis introducida por Peter Mitchell en 1961 en la que dicta que las diferencias transmembrana en la concentración de protones son un reservorio de energía obtenida a partir de las reacciones biológicas de oxidación. En la fosforilación oxidativa existe un flujo de electrones a través de una cadena transportadora en la MI. El flujo de electrones hacia la MZ está acoplado al flujo de protones hacia el EIM.

La transferencia de electrones y la síntesis de ATP están obligatoriamente acopladas.

Los complejos multienzimáticos que forman la cadena respiratoria y la ATP sintasa, y sus reacciones se describen a continuación:

Complejo I o NADH deshidrogenasa. Este complejo cataliza dos procesos simultáneos, la transferencia de 2 electrones obtenidos de la oxidación del NADH a la ubiquinona que se transfieren al complejo III y de 4 protones de la MZ al EIM. Se encuentra anclada a la MI y está compuesto por 42 cadenas polipeptídicas entre las que se encuentra una molécula de flavina mononucleótido (FMN) y 6 grupos ferro-sulfurados (Fe-S) que actúan como transportadores. La unidad mínima estructural de la NADH deshidrogenasa contiene 14 subunidades. 7 de ellas forman un centro activo junto con grupos redox, el resto, son proteínas hidrofóbicas que se repliegan en 54 α -hélices a través de la membrana. El complejo contiene 28 proteínas adicionales con lo que alcanza un peso de 900kDa aprox.

Complejo II o succinato-CoQ reductasa. Es el único enzima del ciclo de Krebs que está ligado a la cara interna de la membrana. Contiene 5 grupos prostéticos y 4 subunidades proteicas diferentes. Contiene un cofactor FAD (flavina adenina dinucleotido) y un centro Fe-S. Es responsable de la oxidación del succinato a fumarato y los electrones

resultantes son transferidos a la ubiquinona. Este proceso se produce en la MZ. La energía liberada en este caso es menor por lo que no se produce traslocación de H⁺.

Este complejo se divide en dos fracciones, una soluble formada por la succinato deshidrogenasa (SDH) y otra que incluye proteínas de anclaje a la membrana.

El complejo III o CoQ-citocromo c reductasa: Acopla la transferencia de electrones procedentes de la oxidación de una molécula de ubiquinol al citocromo c con la traslocación de H⁺ hacia el espacio intermembrana. El citocromo c acepta un electron del complejo III gracias a su grupo hemo y lo desplaza hacia el complejo IV. A diferencia de la ubiquinona que transporta dos electrones, el citocromo c sólo transporta uno.

Este complejo está anclado a la MI formando dímeros. El monómero contiene 11 subunidades con un peso total de 240kDa. El centro funcional contiene 3 subunidades, el citocromo b (2 grupos hemo), una proteína Fe-S y un citocromo c asociado (un grupo hemo) (transportador).

El complejo IV o citocromo c oxidasa es el último eslabón en la cadena de transporte de electrones, transfiriendo 4 electrones al O₂ molecular, el cual es reducido a 2 moléculas de H₂O, mientras se bombean H⁺ al EIM. Contiene dos citocromos a formados por grupos hemo, además de iones de cobre esenciales para la transferencia de electrones al O₂ molecular sin generar compuestos intermediarios.

Se localiza en la MI en forma de dímero. El monómero está formado por 13 subunidades y tiene un peso de 204kDa. El centro funcional es constituido por las 3 subunidades mayores (I, II y III). El resto de subunidades, se disponen alrededor de éste. El complejo contiene además, 2 átomos de hierro, 3 de azufre y uno de magnesio.

El gradiente electroquímico de protones producido por la translocación de protones de los complejos I, III y IV de la MZ al EIM se utiliza como energía protón-motriz para la síntesis de ATP realizada por la enzima ATP sintasa o ATPasa mitocondrial, que genera una vía hidrofílica a través de la MI permitiendo fluir los protones a favor de su gradiente electroquímico. La energía generada es utilizada para la condensación del ADP y el P_i para producir ATP. La ATP sintasa trabaja por catálisis rotatoria. Está compuesta de dos porciones, la F₀ y la F₁. La F₀ humana, está anclada a la membrana y contiene un “rotor” formado por un anillo de 10 subunidades c. Cuando los protones pasan a través de ella, el “rotor” gira, transformando la energía electroquímica generada por el flujo de protones a energía mecánica.

La subunidad F₁ contiene 5 subunidades proyectadas hacia la MZ formando una especie de poliedro con un brazo largo que mantiene su unión a proteínas transmembrana. Tres de las subunidades de F₁ tienen dominios de unión para ADP y P_i para la formación de ATP que se va generando gracias a la transformación de la energía mecánica a energía de enlace químico. La ATPasa es capaz de generar 3 moléculas de ATP por rotación

completa. La ATP sintasa, puede funcionar también en sentido opuesto hidrolizando el ATP.

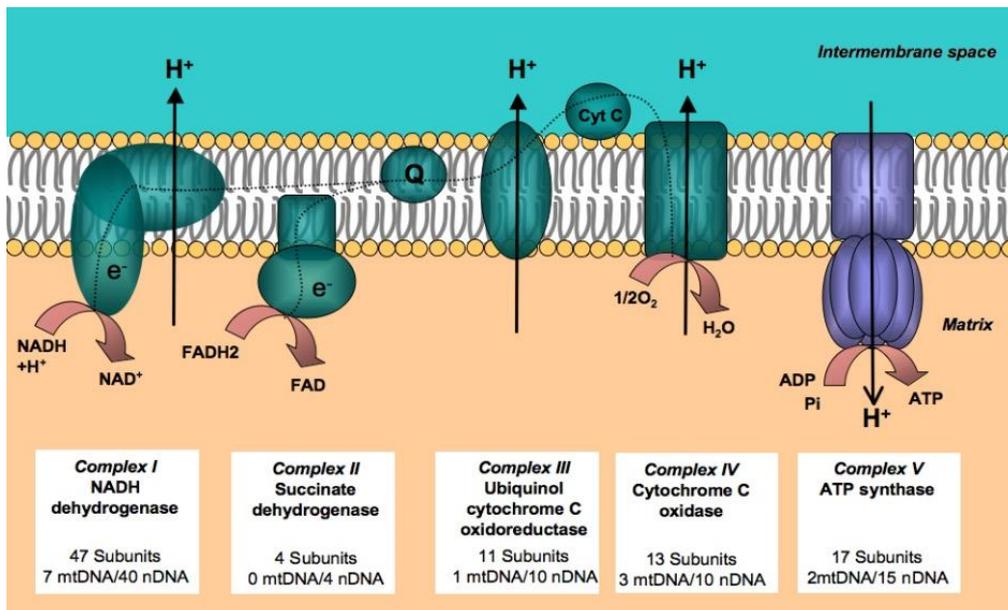


Fig. 1.8. Representación esquemática de la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones (Imagen extraída de <https://quizlet.com/94870786/oxidative-phosphorylation-flash-cards>)

La organización funcional de los complejos de la cadena respiratoria está actualmente en discusión. Existen varios modelos que tratan de explicar su disposición y funcionalidad en el proceso. El modelo fluido define los complejos como entidades independientes en la MI que utilizan la CoQ y el citocromo c como transportadores que difunden libremente a través de la MI. El modelo sólido, en cambio, propone que los complejos se organizan en estructuras más grandes o supercomplejos (respirosoma).

Según Ugalde *et al.*, este último se basaría en un ensamblaje parcial del complejo I, a modo de pre-respirosoma, completando dicho ensamblaje únicamente por la interacción con complejo III y complejo IV. Para la descripción de este modelo se realizaron experimentos con doxiciclina que inhibe reversiblemente los ribosomas. Según este modelo el supercomplejo sería la unidad funcional de la cadena respiratoria⁹⁴.

Por otro lado, Enríquez *et al.*, describen un modelo de plasticidad en el que se combinarían el modelo fluido y el modelo sólido. Los experimentos llevados a cabo para fundamentar este modelo se basaron en el marcaje de proteínas mitocondriales. Observaron un espacio de tiempo entre el marcaje de éstas en los complejos individuales y su incorporación a los supercomplejos, interpretando que tanto complejos independientes como supercomplejos se dan lugar en la MI. Además señalan que los supercomplejos no tendrían necesariamente una función en la cadena respiratoria, podrían tener un rol estructural o funcionar como reservorio⁹⁵.

1.2.3 Otras funciones de la mitocondria

Además de su función energética la mitocondria también tiene un papel fundamental en la homeostasis del Ca^{2+} . La mitocondria forma microdominios con el Ca^{2+} para regular el Ca^{2+} citosólico proveniente tanto de fuentes externas, como del NMDA o del retículo endoplasmático. El Ca^{2+} es capturado por la mitocondria y liberado lentamente para evitar altos niveles en el citoplasma, lo que provocaría estrés, excitotoxicidad y finalmente muerte celular ⁹⁶.

De hecho, otra de las funciones en las que está involucrada la mitocondria es el control de la muerte celular programada o apoptosis. Cuando un agente estresante da la señal de muerte celular, las mitocondrias aumentan la permeabilidad de su membrana gracias a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPC) y liberan el citocromo c al citosol. En el citosol el citocromo c interacciona con monómeros de la proteína Apaf-1, que actúa como activador de la apoptosis, formando el apoptosoma. Éste, proporciona la plataforma para la activación de las caspasas implicadas en la apoptosis. Las caspasas son las responsables de iniciar una cascada de activaciones proteolíticas (Nelson DL. & Cox MM. Principios de Bioquímica. 4ªEd. 2009).

1.3 Esquizofrenia y mitocondria

La fisiopatología de la SZ se ha relacionado con la función mitocondrial, especialmente con defectos en la producción de energía, homeostasis del Ca^{2+} y apoptosis, además de por la implicación del organelo en el neurodesarrollo y la función cerebral. El cerebro es muy dependiente de la energía obtenida a partir de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Cualquier defecto mitocondrial conlleva un gran efecto en el cerebro. Enfermedades mitocondriales como MELAS, causada por mutaciones en el ADNmt y caracterizada por encefalopatía, acidosis láctica y episodios cerebrovasculares; presentan con frecuencia síntomas psicóticos^{97,98}. Mutaciones en el ADNmt podrían estar implicadas en la etiología de la SZ, así pues, estudios de asociación han mostrado que mutaciones y polimorfismos en el ADNmt están relacionados con la enfermedad⁹⁹. Además, la expresión de genes mitocondriales se ve disminuida¹⁰⁰, especialmente de los que codifican para unidades de los complejos de OXPHOS¹⁰¹. De hecho, se ha observado que las subunidades de 24 y 51kDa del complejo I ven disminuida su expresión en el córtex prefrontal¹⁰².

Varios estudios sugieren que los pacientes que padecen SZ presentan anomalías en el metabolismo energético^{103,104}. Además, a partir de resonancia magnética se han observado deficiencias metabólicas que son semejantes a enfermos con patología mitocondrial¹⁰⁵.

Asimismo se ha sugerido en modelos murinos de SZ que el mecanismo de apoptosis también se ve alterado, ya que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, ésta se colapsa y se libera citocromo c, iniciando la señalización de muerte celular¹⁰⁶.

Algunos de estos defectos mitocondriales observados en pacientes esquizofrénicos podrían estar asociados a la medicación ya que se ha observado que los antipsicóticos de segunda generación actúan disminuyendo la actividad del citocromo c oxidasa y desregulando la glucólisis, provocando en algunos casos un aumento en la prevalencia de síndrome metabólico y resistencia a la insulina^{107,108}.

1.4 DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*)

1.4.1 Definición, función e interacciones

El gen DISC1 fue identificado en el año 2000 en un amplio linaje escocés, asociado con elevada prevalencia de SZ, TBP y DSR, que segregaban con una translocación equilibrada (1;11)(q42.1;q14.3) (Figura 1.9). Debido a esta translocación en el punto de rotura del cromosoma 1 se interrumpía la pauta de lectura de dos genes, *Disrupted in Schizophrenia 1* (DISC1) y *Disrupted in Schizophrenia 2* (DISC2)¹⁰⁹ y en el cromosoma 11 el gen DISC1-FP1¹¹⁰, convirtiéndose en potenciales candidatos a jugar un papel relevante en la etiología de la enfermedad.

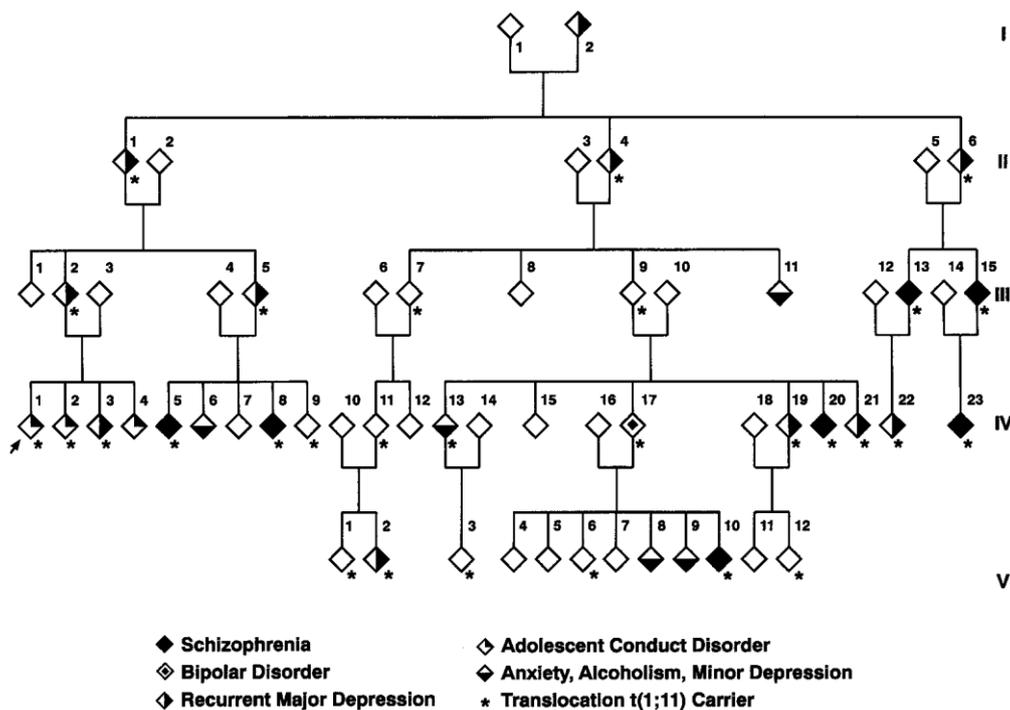


Figura 1.9. Pedigrí de la familia escocesa donde se muestran 58 de los 87 miembros analizados. Se señalan los miembros portadores de la translocación (1;11)(q42.1;q14.3) y sus correspondientes fenotipos (Imagen extraída de ¹¹³).

El gen DISC1 está localizado en la región cromosómica 1q42.2 presentando un tamaño de 300Kb y un total de 13 exones. En los intrones aparecen 8 ESTs, por sus siglas en inglés, *Expressed Sequence Tags*; que se corresponden con variaciones en el *splicing* o *splicing* alternativo¹¹¹. El gen DISC2 se localiza en superposición en el exón 9 de DISC1

transcribiéndose al contrario de éste. La función de DISC2 parece ser reguladora de DISC1 ya que no presenta marcos abiertos de lectura¹⁰⁹ (Fig. 1.10).

La evolución del gen DISC1 ha sido muy rápida, presentando solamente un 50% de homología entre el ratón y el humano. Se han localizado ortólogos entre los vertebrados pero no en invertebrados¹¹².

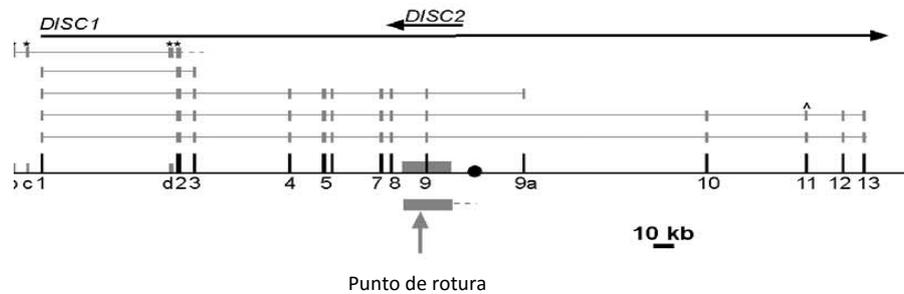


Figura 1.10. Representación de los genes DISC1 y DISC2. Las líneas negras continuas muestran la secuencia y las barras negras verticales los exones. Se marca el punto de rotura producido en la translocación (1;11)(q42.1;q14.3). Además se muestran las cuatro variantes de splicing (L, forma completa, 13 exones; Lv, forma completa, variante b en el exón 11; S, 9 exones; Esv, 4 exones) (Imagen extraída de ¹³³).

Estudios posteriores en la misma familia, mostraron altos valores de significancia en la segregación del gen DISC1 con la enfermedad¹¹³. Y estudios poblacionales independientes en población finlandesa, corroboraron la relación de este locus con la esquizofrenia ¹¹⁴.

Por otro lado, estudios poblacionales han descrito una variante común, identificada con el rs821616 en DISC1, en pacientes de corta edad, en los que mediante resonancia magnética han comprobado que existe una disminución en el volumen de los lóbulos frontales. Estos hallazgos se han observado también en adultos con SZ, convirtiendo el SNP en un factor de riesgo para los portadores¹¹⁵. Mediante GWAS, se han identificado otros SNPs (rs821589, rs1417584, rs11122319, rs821616, rs821639, rs16856322, rs821639, rs9661837, rs2487453, rs9661837, rs4658966, rs2793094, rs12137417) en DISC1 relacionados con la neuroanatomía y la cognición en pacientes con EMG afectando al espesor de la sustancia gris en lóbulos frontales, parietales y temporales^{116,117}. En adultos, la reducción en el volumen de la sustancia gris de los lóbulos frontales podría explicar los síntomas negativos que manifiestan los pacientes con SZ caracterizados por la pérdida cognitiva¹¹⁸. En adolescentes, también se ha observado una disminución del volumen de la sustancia gris pero en los lóbulos temporales¹¹⁹ pudiendo explicar los síntomas positivos caracterizados por una distorsión de las funciones normales¹²⁰.

Estudios de genes candidatos en pacientes con TBP han identificado SNPs y haplotipos de DISC1 asociados con la enfermedad¹²¹. Además, estudios de asociación en familias también han mostrado asociación de DISC1 con TBP¹²². En pacientes con TBP, se han

observado niveles de expresión de DISC1 disminuidos en linfoblastos¹²². En ese sentido, se ha podido establecer una correlación positiva entre la disminución en la expresión de DISC1, la gravedad del fenotipo psicótico y el número de episodios maníacos¹²².

Estudios de CNVs mediante CGH-Array han mostrado una asociación entre DISC1, TEA y retraso mental, ambos no asociados a síndromes, en 2 hermanos que presentan una duplicación de la región 1q42.2, región donde se encuentra DISC1¹²³. El 10% de los TEA no sindrómicos son causados por CNVs¹²⁴.

Finalmente, estudios en modelos murinos han ayudado a determinar factores de riesgo asociados a EMG. El modelo *disc1* KO presenta desórdenes en el sistema motor, hiperactividad, déficit cognitivo, depresión y alteración de las interacciones sociales¹²⁵. Además, existe un modelo murino que presenta una delección espontánea de 25pb en el exón 6, *129DISC1^{Del}*, que genera un codón de STOP en el exón 7 y simula la forma truncada encontrada en la familia escocesa. Estos ratones también presentan desórdenes del comportamiento¹²⁶, además de una alteración en la organización de nuevas neuronas y también de neuronas maduras, con déficit en la plasticidad neuronal, entendido como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades, que puede influir en los procesos de memoria¹²⁷.

Mediante mutagénesis dirigida se han generado dos modelos murinos más de DISC1, ambos portando mutaciones en el exón 2. El primero modelo es portador de la mutación Q31L en *disc1*, caracterizada por evidenciar un fenotipo depresivo, y el segundo modelo es portador de la mutación L100P que provoca un fenotipo esquizofrénico, en ambos casos el fenotipo es revertido con antidepresivos y antipsicóticos, respectivamente¹²⁸. Estas 2 mutaciones se obtuvieron por el tratamiento de ratones con ENU, un agente mutagénico. Realizaron un cribado de mutaciones en el exón 2 porque está contenido en todas las formas conocidas de DISC1¹²⁹ y haplotipos del exón 2 se han relacionado con SZ, desórdenes esquizoafectivos y procesos de memoria de trabajo^{122,130}.

DISC1 codifica para una proteína de 854 aminoácidos (aa). Se predice que contiene una región amino terminal (N-ter aa. 1-347) compuesta por una porción globular y un dominio rico en fenilalanina. La región C-terminal, en cambio, está compuesta por numerosas hélices α intercaladas por bucles con tres dominios "leucine-zipper domains", importantes en la unión proteína-proteína^{131,132} (Fig. 1.11). La proteína está muy poco conservada entre especies, sobretodo la región C-terminal¹³³.

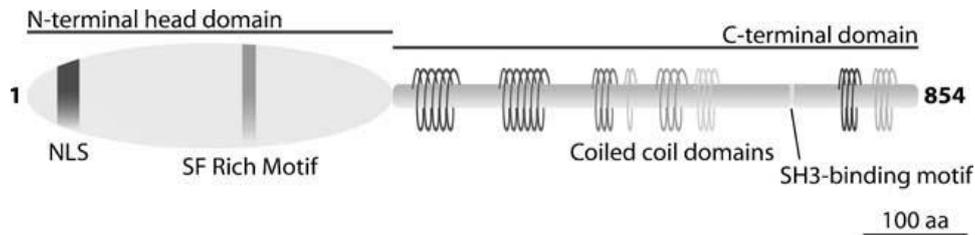


Figura 1.11. Representación de la posible estructura proteica de DISC1. En el dominio N-ter, se localiza la porción globular conservada (NLS) y la región rica en serina/fenilalanina (SF). En el dominio C-ter, se muestran las hélices α predichas y los dominios “leucine-zipper” importantes para la unión de DISC1 con otras proteínas (Imagen extraída de ¹³¹).

Se han encontrado un total de 7 isoformas de la proteína que corresponden con los tamaños de 200kDa, 150kDa, 100kDa, 98kDa, 80kDa, 75kDa y 71kDa, originadas por splicing alternativo¹¹¹. La localización subcelular de DISC1 es multicompartimental, encontrándose en centrosoma, núcleo, citoplasma y mayoritariamente en la mitocondria. Se ha visto que la distribución en los distintos compartimentos corresponden a distintas isoformas, así, la forma de 71kDa se localiza predominantemente en la mitocondria y la forma de 80kDa en el citoplasma, colocalizando con filamentos de actina y proteínas relacionadas¹³⁴.

La translocación (1;11)(q42.1;q14.3) observada en la familia escocesa genera una proteína truncada de DISC1 de 597 aa, producto de la pérdida de los últimos 257 aa de la región C-ter. Por ello, la patología podría implicar compartimentalización anormal de DISC1 y una variación en la distribución (forma completa puntiforme y la forma truncada difusa)¹³⁵. La forma truncada 1-597 en sobreexpresión se acumularía en mitocondria provocando anomalías en su estructura, dando lugar defectos morfológicos y presentando abundantes formas de “anillo”, alterando la dinámica mitocondrial, es decir, los procesos de fusión y fisión¹²⁹. Se ha demostrado que la región N-ter es suficiente para direccionar la proteína hacia núcleo y mitocondria, no así hacia centrosoma donde es imprescindible la región C-ter.

Respecto a su expresión en humanos, se ha visto mediante inmunohistoquímica su presencia en distintos órganos, tales como, riñón, páncreas, corazón, cerebro y placenta, siendo en estos tres últimos donde se localiza mayor expresión, tanto en adulto como en feto. En ratones, presenta su expresión máxima en el estadio 13.5 durante la etapa embrionaria y en el día 35 durante la etapa postnatal¹³⁶.

En el cerebro, donde se expresa en prácticamente toda su anatomía, juega un papel importante en la regulación de la diferenciación y proliferación neuronal. DISC1 se ha relacionado específicamente con la diferenciación de oligodendrocitos, regulando negativamente este proceso, disminuyendo su expresión desde la célula precursora al oligodendrocito¹³⁷. Además se ha visto que tanto la sobreexpresión como la supresión de la forma completa provoca deficiencias en el proceso de neuritogénesis en células

PC12¹³⁸. Y en cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata, la supresión conlleva severos problemas de migración¹³⁸.

Numerosos estudios han descrito interacciones entre DISC1 y otras proteínas ayudando a elucidar su función y etiología de estas enfermedades. Se ha visto que DISC1 se asocia al centrosoma y a las redes de microtúbulos adquiriendo especial importancia en estos procesos^{110,139}. Interviene también en la regulación de las adhesiones célula-célula y célula-matriz mediante la interacción con integrinas y cadherinas facilitando la neuritogénesis¹⁴⁰.

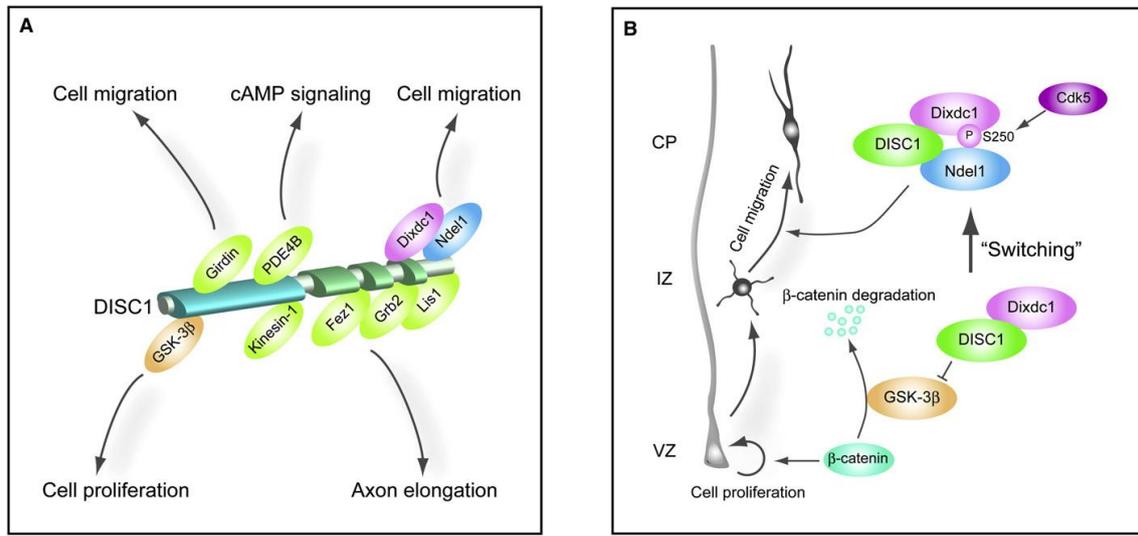


Figura 1.12. Regulación de la neurogénesis mediante DISC1 y relación con las proteínas con las que interactúa. A. Estructura de DISC1 e interacción con distintas proteínas, GSK3β, Girdina, PDE4B, kinesina-1, FEZ1, Grb2, Dixdc1, Lis1 y Ndel1. B. Procesos de proliferación y migración neuronal regulados por DISC1. El complejo Dixdc1/DISC1 inhibe a GSK3β promoviendo la proliferación de células progenitoras. En la célula madura la fosforilación de Dixdc1 por Cdk5 permite la unión de Ndel1 a DISC1 que regula la migración neuronal (Imagen extraída de ¹⁴²).

A nivel centrosómico, DISC1 interactúa también con las proteínas FEZ1 y Ndel1 que participan en la regulación del crecimiento de las dendritas e intervienen en procesos de desarrollo, posicionamiento neuronal y desarrollo de dendritas primarias, respectivamente¹⁴¹ (Fig. 1.12.A). DISC1 regula positivamente la migración neuronal a través del complejo Ndel/Lis1 vía interacción con dineína (proteína motora asociada a microtúbulos) durante el desarrollo del córtex cerebral¹⁴² (Fig. 1.12.A).

DISC1 se ha relacionado igualmente con la sinapsis, estabilizando los niveles de proteínas post-sinápticas mediante la interacción con la proteína TNIK, ambas enriquecidas en compartimentos post-sinápticos¹⁴³.

En el núcleo, la proteína Dixdc1 junto con DISC1 co-regulan la proliferación neuronal a través de la vía de señalización Wnt/β-catenina inhibiendo GSK3β^{142,144} (Fig. 1.12.B).

1.4.2 DISC1 y mitocondria

En cerebros de pacientes con SZ se ha observado una reducción del número de mitocondrias y también en su tamaño¹³⁵. Teniendo en cuenta la importancia de la mitocondria en los procesos de proliferación y diferenciación neuronal es obvio pensar que existe una gran implicación en la etiología de los trastornos mentales severos¹²⁹. Asimismo se ha descrito que DISC1 tiene una implicación importante a nivel mitocondrial regulando negativamente su tráfico en neuronas de hipocampo. Esta regulación negativa se debe a que DISC1 forma agregados perinucleares o agregomas degradados en el proceso de autofagia. Estos agregados insolubles provocan un déficit de la forma soluble comprometiendo la función neuronal, interrumpiendo el tráfico mitocondrial. Se ha observado el mismo efecto al silenciar DISC1 mediante un ARNt¹⁴⁵.

Alteraciones en la expresión de DISC1 tanto en disminución como en sobreexpresión en mitocondria resultan en deficiencias de la actividad mitocondrial tales como, reducción del contenido de ATP, disfunción en la dinámica del Ca²⁺ y reducción de la actividad NADH deshidrogenasa¹⁴⁶.

La interacción de DISC1 con otras proteínas mitocondriales resulta importante para conocer su función. En consecuencia se han encontrado interacciones con Mic60/mitofilina, una proteína integral de membrana que controla la morfología de las crestas mitocondriales¹⁴⁶. Experimentos de inmunoprecipitación han demostrado que DISC1 interacciona también con la proteína Mic25/CHCHD6 implicada en la regulación de Mic60/mitofilina y por tanto, en el mantenimiento de la morfología de las crestas mitocondriales⁸⁸.

También se ha descrito la interacción de DISC1 mitocondrial con la proteína PDE4B. PDE4B presenta un dominio de unión a DISC1 (UCR2). Su función es la de inactivar el AMPc (segundo mensajero involucrado en la activación de proteínas quinasas A (PKA) que fosforilan a otras proteínas implicadas, por ejemplo, en la regulación génica) relacionado con procesos de aprendizaje, memoria y estados de humor. La interacción con DISC1 es dinámica e influenciada por los niveles de AMPc vía PKA. DISC1 se une a la forma defosforilada de PDE4B, liberando una población de PDE4B activa, en respuesta a altos niveles de AMPc¹²⁹ (Fig. 1.12.A).

La proteína TRAK1 (Proteína de unión a la kinesina 1) interacciona con DISC1, con la que colocaliza en neuronas. No se ha podido demostrar que la interacción entre ambas en cerebro sea directa. Así pues, se sugiere que TRAK1 podría influenciar sobre el reclutamiento de DISC1 en la mitocondria y aumentar la asociación de ésta con Miro1 (proteína de la ME de la mitocondria relacionada con el tráfico mitocondrial). Tanto DISC1 como TRAK1 influyen en la motilidad mitocondrial aunque es posible que con funciones distintas¹⁴⁷. Recientemente, se ha descrito que DISC1 interacciona además de con TRAK1 y Miro1, con Miro2, TRAK2 (Proteína de unión a la kinesina 2) y las mitofusinas (proteínas de fusión mitocondrial) y forma complejos con TRAK2/Miro1 y

mitofusina1, mostrando su implicación tanto en el tráfico mitocondrial como en su morfología. Se necesita una correcta interacción DISC1-Miro-TRAK para el correcto transporte mitocondrial, imprescindible en el correcto desarrollo neuronal¹⁴⁸.

2. Hipótesis

Las hipótesis de esta tesis doctoral son:

1. Existen genes causantes de CC no identificados y que se podrán identificar mediante SNP-Array para la detección de deleciones y/o duplicaciones en el genoma de pacientes con CC sin mutación conocida.
2. Existen genes causantes de CC no identificados y que se podrán identificar mediante análisis de ligamiento en familias con alta prevalencia de CC sin causa conocida.
3. Existen genes causantes de EMG no identificados y que se podrán identificar mediante WES para la detección de variantes poco frecuentes en el genoma de familias con EMG sin mutación conocida.
4. El rol patogénico de DISC1 en enfermedades mentales del neurodesarrollo, tales como TEA, SZ o TBP, es mediado por su localización mitocondrial, donde tiene un papel relevante en el mantenimiento de la integridad del orgánulo.
 - 4.1 DISC1 contribuye a la integridad mitocondrial al formar parte de un complejo multiproteico con Mic60/mitofilina.
 - 4.2 DISC1 modula el sistema OXPHOS a través del complejo MICOS, responsable del mantenimiento de las crestas mitocondriales.

3. Objetivos

1. Identificar nuevos genes candidatos a causar CC contenidos en regiones delecionadas y/o duplicadas mediante SNP-Array en pacientes con CC de causa desconocida.
2. Identificar nuevos genes candidatos a causar CC contenidos en regiones que segregan con la enfermedad en familias con alta prevalencia de CC de causa desconocida.
3. Identificar mediante WES variantes poco frecuentes causales de EMG en familias con elevada prevalencia.
4. Caracterizar la topología, procesamiento y asociación proteica de DISC1 en la mitocondria.
5. Determinar la función de DISC1 en la mitocondria, a fin de poder definir potenciales dianas susceptibles de intervención farmacológica.

4. Metodología

4.1 Técnicas genómicas

Se aplicaron técnicas genómicas de cribado masivo con la finalidad de identificar nuevos genes candidatos asociados a CC y EMG.

4.1.1 CC. SNP-Array. Análisis de las variaciones en el número de copia (CNVs)

4.1.1.1 La técnica de SNP-Array

La técnica de SNP-Array se utilizó con el propósito de identificar deleciones y/o duplicaciones que pudieran estar implicadas en la patología y permitir posteriormente realizar análisis de ligamiento en familias.

El análisis de CNVs se realizó a 112 pacientes y a 80 de sus familiares procedentes de distintos hospitales (H. Son Espases, H. Son Llàtzer y H. Pta. Del Hierro) que presentaban una CC de causa desconocida.

A partir de muestras sanguíneas de los pacientes, se extrajo ADN mediante el *Master Pure™ DNA Purification Kit for Blood. Version II* (Epicentre-Illumina). Todas las muestras de ADN (200ng/μl) se enviaron al centro nacional de genotipado (Cegen) para su análisis mediante el SNP-Array *Illumina 660W beadchip*, que contiene 660000 marcadores distribuidos a lo largo de todo el genoma.

La técnica de SNP-Array se basa en la hibridación del ADN a una superficie sólida (Fig. 4.1) que contiene una colección de sondas unidas a beads, que preceden a polimorfismos de una sola base unidos a ésta. Al producirse la hibridación se lleva a cabo la extensión de un solo nucleótido marcado con un fluorocromo que emite una señal de fluorescencia captada por el software (Fig. 4.2). Con la información aportada por esta técnica es posible genotipar una muestra, pudiendo realizar análisis de ligamiento y obtener variaciones en el número de copia.



Figura 4.1. Plataforma sólida o chip donde se lleva a cabo la hibridación con los SNPs. Imagen extraída de: http://support.illumina.com/array/array_kits/human660w-quad_dna_analysis_kit/contents_storage.ilmn

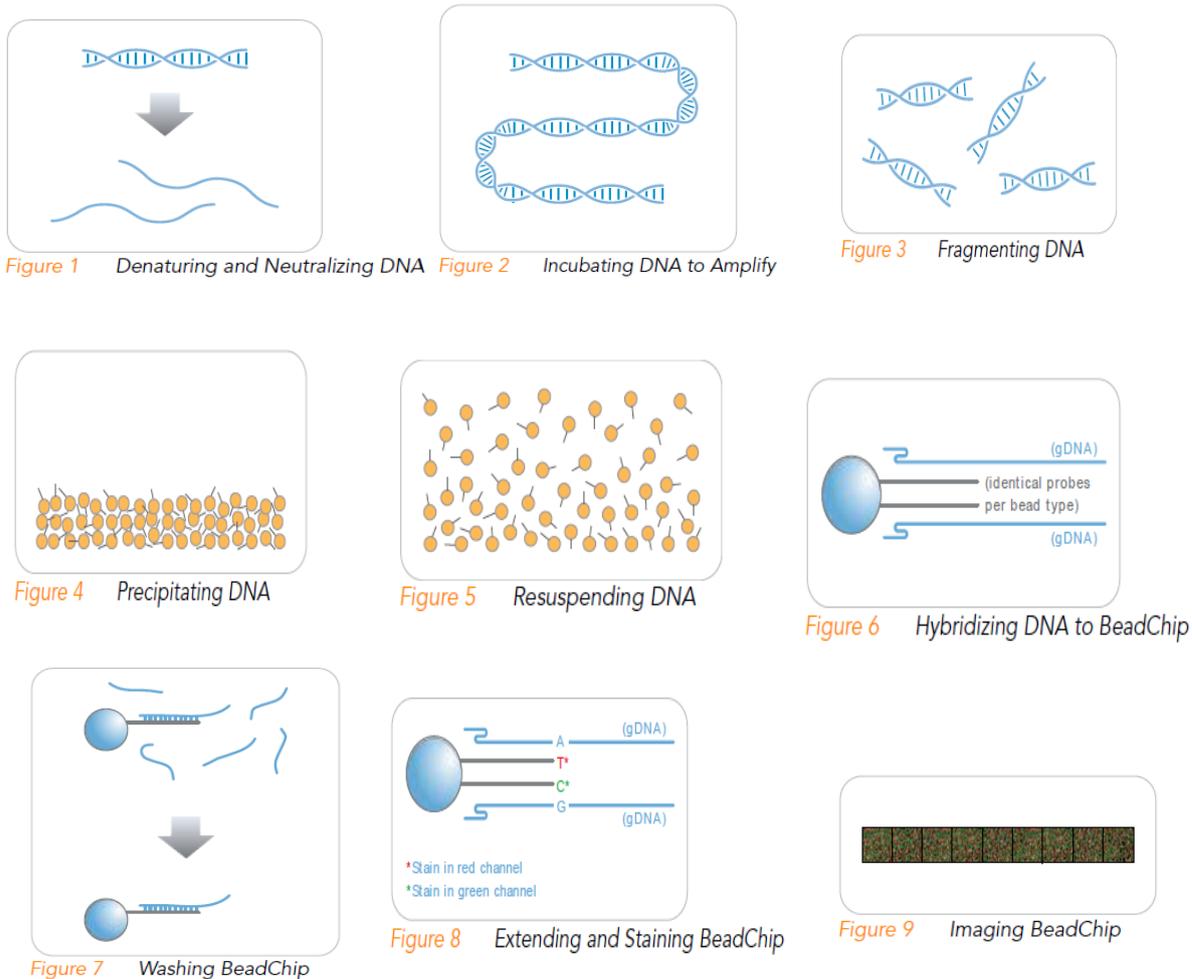


Fig. 4.2. Método usado para SNP-Array por la tecnología de Illumina. Se muestra todo el proceso de genotipado. 1. Desnaturalización y neutralización del ADN. 2. Amplificación del ADN. 3. Fragmentación. 4. Precipitación. 5. Resuspensión del ADN. 6. Hibridación del ADN con el *bead*. 7. Lavado. 8. Extensión y marcaje. 9. Captura. Infinium HD Assay. Ref. WG-901-4002. Illumina.

4.1.1.2 Análisis de datos a partir de la técnica de SNP-Array

El análisis de datos se llevó a cabo con el programa informático *Genome Studio Data Analysis Software* (Illumina) que permite visualizar los resultados obtenidos a partir de la técnica de SNP-Array. Además este programa también indica los genes contenidos en las regiones deletadas o duplicadas (Fig. 4.4).

El software indica los resultados mediante dos parámetros, intensidad de la fluorescencia dependiente de la señal de captura e intensidad de la señal en referencia al genotipo dependiente del ratio de los alelos presentes. Si se considera el ratio de la intensidad de los alelos en relación a la frecuencia del alelo B (BAF), mostrada por puntos, donde cada punto corresponde a un SNP. En situación normal, cuando es heterocigoto (AB), donde están presentes los 2 alelos, la distribución de los puntos se localiza de manera homogénea en el centro del plot (intensidad de un solo alelo B), cuando es homocigoto AA (0 intensidad de alelo B) en la parte superior y cuando es

homocigoto BB (doble intensidad de alelo B) en la parte inferior. Cuando hay presente una deleción, solamente observaremos la seña de un alelo (A o B) por lo que los puntos desaparecerán del centro del plot ubicándose en los extremos superior o inferior. En una duplicación, se mostrará la seña de 3 alelos por lo que se visualizan 4 franjas de puntos correspondientes a las 4 combinaciones posibles: AAA (0 alelos B), AAB (1 alelo B), BBA (2 alelos B), BBB (3 alelos B) (Fig. 4.3).

Si se considera, por otro lado, únicamente la intensidad de seña total de todos los alelos (logR) en términos absolutos, en una situación normal con presencia de los 2 alelos, se mostrará una franja intermedia; en una deleción (1 alelo) una franja en el lado inferior y en una duplicación (3 alelos), una franja superior causada por la mayor intensidad de fluorescencia generada por la presencia de 3 alelos (Fig. 4.3).

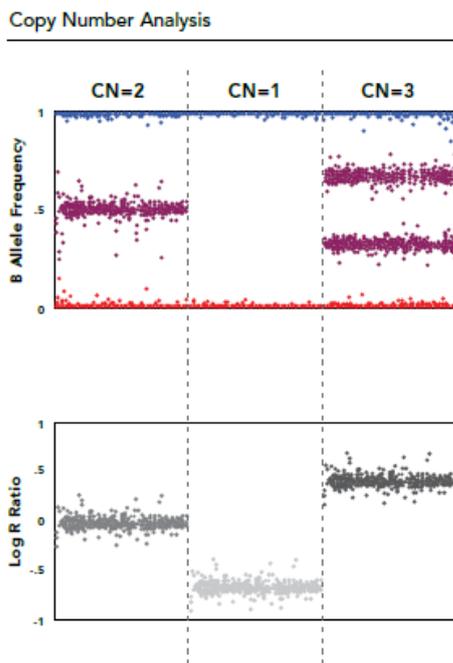


Fig 4.3. Representación gráfica de la visualización de datos mediante Genome Studio Analysis Software. Se observan plots correspondientes a 2 alelos (normal), 1 alelo (deleción) y 3 alelos (duplicación).

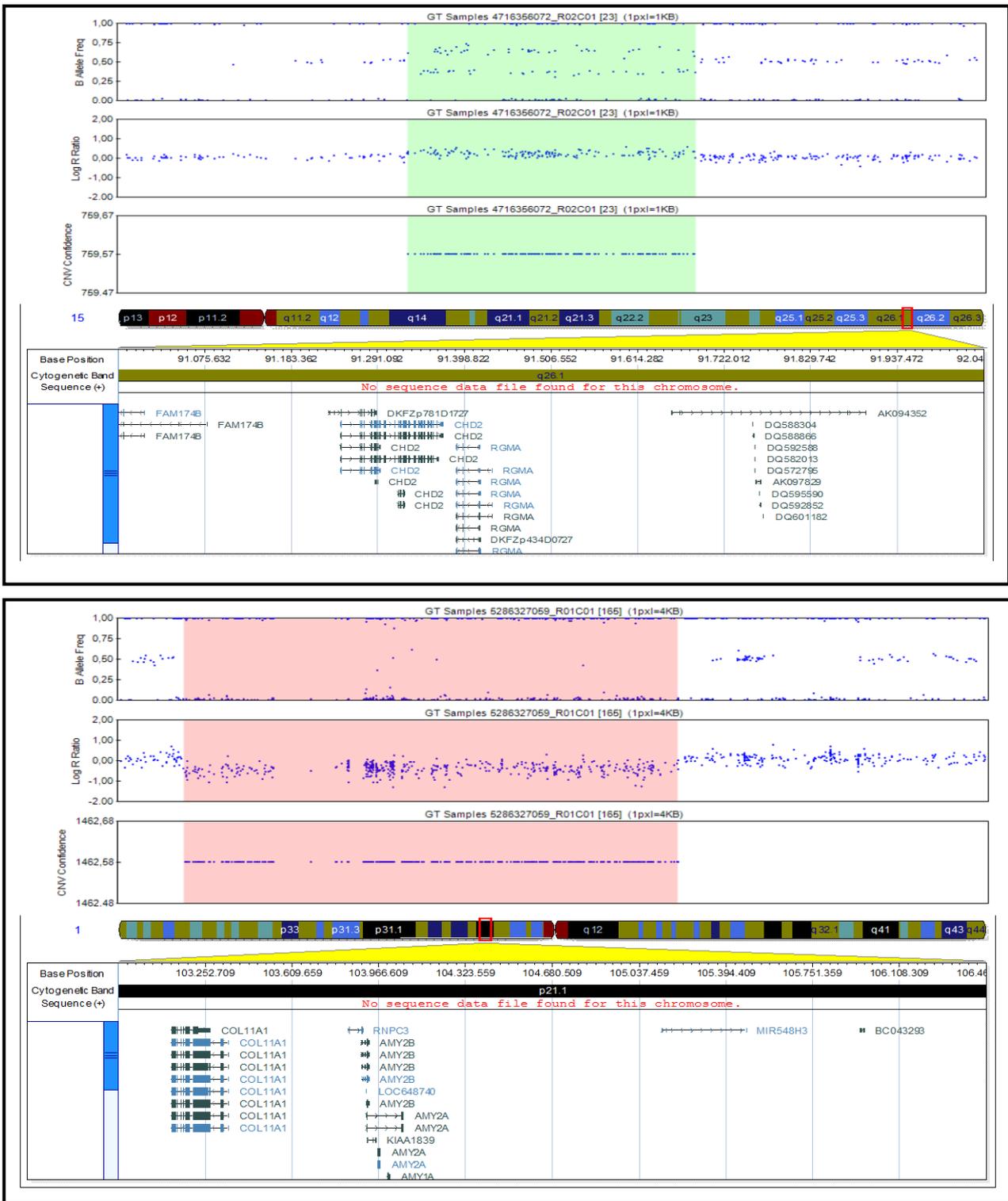


Fig. 4.4. Ejemplos de alteraciones encontradas en los pacientes analizados mediante *Genome Studio Analysis Software* y genes localizados en dichas regiones. Señalado en verde las regiones duplicadas y en rosa las regiones delecionadas.

A. Priorización de genes candidatos

Una vez analizados los CNVs encontrados en los pacientes y los genes que contenían, se utilizó una herramienta informática que nos permitió priorizar aquellos genes que tenían una mayor probabilidad de participar en la etiología de la enfermedad. Para ello, se realizó un análisis de priorización mediante los programas *Toppgene*¹⁴⁹ y *Endeavour*³³. Estos programas son un recurso online para determinar si alguno de los genes candidatos presenta homología estructural o funcional con genes descritos en la literatura asociados a la enfermedad de estudio. Se basa en establecer una correlación entre los genes candidatos y genes de referencia introducidos por el usuario (*training genes*), pudiendo así asignar un orden, en relación a la similitud existente entre ellos (Fig. 4.5).

Test Results [Hide Detail] [Download] [Show Network]																				
Rank (net)	Gene Symbol	Gene ID	GO: Molecular Function		GO: Biological Process		GO: Cellular Component		Human Phenotype		Mouse Phenotype		Pathway		Pubmed		Disease		Average score	Overall P-value
			Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue	Score	pValue		
1	PRKCE	5581	9.991E-1	9.810E-3	1.000E0	1.099E-1	8.427E-1	8.568E-2			9.949E-1	7.194E-2	1.000E0	9.810E-3	1.000E0	4.840E-2	5.437E-1	1.635E-2	9.118E-1	1.081E-3
2	EPAS1	2034	9.992E-1	9.810E-3	1.000E0	1.099E-1	9.057E-1	6.279E-2	1.947E-1	8.437E-2	1.000E0	4.382E-2	9.596E-1	2.485E-2	1.000E0	4.840E-2	0.000E0	5.265E-1	7.599E-1	3.969E-3
3	STRA8	346073	3.833E-1	1.648E-1	1.000E0	1.099E-1	7.085E-2	3.061E-1			8.383E-1	1.086E-1	1.000E0	7.194E-3	1.000E0	4.840E-2			6.739E-1	1.370E-2
4	CRIP1	9419	6.414E-1	9.680E-2	8.184E-1	2.557E-1	8.556E-1	8.044E-2			4.022E-1	1.321E-1	1.000E0	7.194E-3	5.529E-1	2.328E-1			7.559E-1	1.789E-2
5	RHOQ	23433	6.322E-1	9.941E-2	1.000E0	1.099E-1	7.997E-1	1.138E-1			1.000E0	4.709E-2	4.555E-1	7.325E-2	5.585E-1	2.322E-1			7.708E-1	2.386E-2
6	SOC5	9655	9.579E-1	3.270E-2	1.000E0	1.099E-1	7.085E-2	3.061E-1			9.029E-1	1.007E-1	6.866E-1	5.167E-2	6.402E-1	2.119E-1			7.679E-1	2.557E-2
7	CALM2	805			1.000E0	1.184E-1					1.000E0	4.709E-2	1.000E0	6.540E-3	9.523E-1	1.190E-1	0.000E0	5.265E-1	6.586E-1	2.861E-2
8	TTC7A	57217			9.962E-1	1.799E-1			1.000E0	3.336E-2	1.000E0	4.382E-2	1.000E0	7.194E-3	2.065E-1	2.963E-1	0.000E0	5.265E-1	6.905E-1	3.057E-2
9	C7orf73	647087			1.000E0	1.184E-1	1.000E-2	3.185E-1			1.000E0	4.709E-2	1.000E0	7.194E-3	0.000E0	6.481E-1			5.000E-3	3.555E-2
10	ATP6V1E2	90423	1.000E-2	2.747E-1	1.000E0	1.099E-1	9.221E-1	5.494E-2			1.000E0	4.709E-2	4.194E-1	7.390E-2	0.000E0	6.481E-1			5.159E-1	3.772E-2
11	NUP205	23165	4.583E-2	2.603E-1	1.000E0	1.099E-1	8.775E-1	7.521E-2			1.000E0	4.709E-2	8.670E-2	1.033E-1	5.364E-1	2.381E-1	0.000E0	5.265E-1	4.917E-1	4.580E-2
12	PIGF	5281	3.068E-1	1.884E-1	9.954E-1	1.812E-1	6.633E-1	1.655E-1			1.000E0	4.709E-2	0.000E0	5.572E-1	1.000E0	5.036E-2			5.936E-1	4.762E-2
13	C7orf49	78998	0.000E0	6.514E-1	0.000E0	6.527E-1	7.085E-2	3.061E-1			1.000E0	4.709E-2	1.000E0	7.194E-3	3.809E-1	2.642E-1			1.720E-1	5.523E-2
14	WDR91	29062	0.000E0	6.514E-1	0.000E0	6.527E-1	0.000E0	6.671E-1			1.000E0	4.709E-2	1.000E0	7.194E-3	4.036E-1	2.570E-1			1.588E-1	7.062E-2
15	MCFD2	90411	4.573E-2	2.322E-1	9.916E-1	1.890E-1	9.298E-1	5.036E-2	9.681E-1	6.802E-2	1.000E0	4.709E-2	0.000E0	5.572E-1	1.292E-1	2.963E-1	0.000E0	5.265E-1	4.713E-1	7.424E-2
16	CNOT4	4850	4.263E-1	1.413E-1	9.952E-1	1.812E-1	4.060E-1	2.191E-1			1.000E0	4.709E-2	0.000E0	5.572E-1	2.455E-1	2.963E-1			4.651E-1	8.473E-2
17	SLC13A4	26268	1.000E-2	2.747E-1	9.014E-1	2.426E-1	8.181E-1	1.001E-1			1.000E0	4.709E-2	0.000E0	5.572E-1	1.340E-1	2.963E-1			4.287E-1	8.951E-2
18	C2orf61	285051	0.000E0	6.514E-1	0.000E0	6.527E-1	0.000E0	6.671E-1			1.000E0	4.709E-2	5.001E-1	7.129E-2	0.000E0	6.481E-1			1.414E-1	1.886E-1

Figura 4.5. Ejemplo de resultados obtenidos mediante el programa de priorización *Toppgene*. Se muestran los genes por orden de prioridad y significancia, basándose en su función molecular, proceso biológico en el que participa, localización celular, fenotipo expresado en el humano, fenotipo expresado en el ratón, la vía en la que participa y las referencias existentes en Pubmed.

Los genes de referencia empleados para el análisis de los candidatos, se obtuvieron a partir de la base de datos CHDWiki, especializada en CC (http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/chdwiki/index.php/Main_Page).

A continuación se detalla la lista de *training genes* utilizados para el análisis atendiendo a criterios de función:

Vascularización: NOTCH1, TGFB2, SEMA3E, TGFB1, VCAM1, PLXND1, EDN1, VEGFA, SEMA3C, SEMA3A, TEK, ENG, NRP1, SMAD6, NR2F2, NOTCH3, TGFB1, BMP2, NOTCH2, ANGPT1.

Genes dependientes de dosis: LEFTY2, CFC1, CRELD1, ACVR2B, EVC, NKX2-5, CITED2, GATA4, ZFPM2, NOTCH1, THRAP2, ZIC3, NPPA, SOS1, ZEB2, TGFB2, FBN2, TFAP2B,

SEMA3E, BRAF, CHD7, TGFBR1, EHMT1, HRAS, KRAS, PTPN11, TBX5, MAP2K1, MAP2K2, JAG1, TBX1, MID1, ATRX.

Células de la cresta neuronal: NOTCH1, SEMA3E, VEGFA, TGFB1, CITED2, YPEL1, FGF8, CHD7, JAG1, ACVR1, ERBB4, PAX3, RARB, FOXC1, RXRB, HEY2, WTAP, RXRA, NTF3, FOXC2, RAI1, RARA, HIRA, UFD1L, CRKL, RXRG, PLXNA2, LIMS1, NRP2, EDNRA, MSX2, GJA1, PDGFA, DLX6, BMPR1A, WNT1, ACVR1B, MKL2, MMP2, DVL2, GATA6, LBX1.

Determinación de los ejes derecho e izquierdo: PITX2, LEFTY2, CFC1, ACVR2B, CITED2, ZIC3, SHH, NODAL, PLCG1, DNAH11, BMP4

Primera línea embrionaria del corazón: NKX2-5, GATA4, ZFPM2, TBX5, BMP10, HAND2, MEF2C, HAND1, TBX20, MYOCD, AGTRL1, APLN

Segunda línea embrionaria del corazón: NKX2-5, HAND2, MEF2C, HAND1, TBX20, TBX1, PITX2, FGF10, ISL1, FOXH1, YPEL1, FGF8

B. Análisis de vías con implicación de genes candidatos

Después de determinar los posibles genes candidatos a causar CC a partir de CNVs, el siguiente análisis fue dirigido a conocer si estos genes formaban parte de alguna vía o vías comunes, celulares o metabólicas. Para ello, se realizó un análisis con todos los genes encontrados en las deleciones/duplicaciones de los pacientes y por otro lado, aquellos genes seleccionados en el análisis de priorización. El software empleado fue el *Ingenuity Pathways* (IPA), que es capaz de encontrar interacciones entre genes, mecanismos o funciones y vías implicadas relevantes. Permite contextualizar los genes mediante una perspectiva global en un contexto de procesos (implicación de genes), vías (interconexiones de genes) y redes (interconexiones de vías) biológicas a partir de lo descrito en la literatura, de bases de datos de genomas y de datos sobre estructuras proteicas. Además, muestra otros genes con los que interaccionan y proteínas asociadas que pueden explicar su implicación en la enfermedad de estudio. Proporciona también información sobre los mecanismos de regulación de los genes de estudio.

Para llevar a cabo el análisis determina en primer lugar la relación entre los genes o proteínas analizadas y en segundo lugar, intenta establecer una interconexión entre ellos o vía en relación al tipo celular, enfermedad u objeto de estudio.

C. Revisión bibliográfica y comparativa de los genes candidatos

La descripción en la literatura de los genes encontrados mediante SNP-Array da relevancia a los resultados obtenidos, por ello, se realizó una revisión bibliográfica de los últimos 10 años identificando aquellos artículos cuyo objeto de estudio fueran las CC, en los que se determinaran CNVs y se utilizara la técnica de SNP-Array o CGH-Array. Conocer la recurrencia de los genes candidatos en la bibliografía nos permitió afianzar los resultados obtenidos. Se seleccionaron un total de 21 artículos (Tabla 4.1) y se realizó una comparativa entre los genes contenidos en los CNVs de nuestro estudio y los genes contenidos en CNVs descritos en la literatura en pacientes con CC.

Título	Autor	Año
Array Comparative Genomic Hybridization as a Diagnostic Tool for Syndromic Heart Defects	Brekpot J. <i>et al</i>	2010
Challenges of Interpreting Copy Number Variation in Syndromic and Non-Syndromic Congenital Heart Defects	Brekpot J. <i>et al</i>	2011
Contribution of Global Rare Copy-Number Variants to the Risk of Sporadic Congenital Heart Disease	Soemedi R. <i>et al</i>	2012
Contribution of Rare Copy Number Variants to Isolated Human Malformations	Serra-Juhé C. <i>et al</i>	2012
High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array with isolated congenital heart disease comparative genome hybridisation in patients	Erdogan F. <i>et al</i>	2008
High-Resolution Analysis of Copy Number Variants in Adults With Simple-to-Moderate Congenital Heart Disease	Zhao W. <i>et al</i>	2013
Identification of Novel Candidate Gene Loci and Increased Sex Chromosome Aneuploidy Among Infants With Conotruncal Heart Defects	Osoegawa K. <i>et al</i>	2013
Prenatal genetic diagnosis using microarray analysis in fetuses with congenital heart defects	Schmid M. <i>et al</i>	2011
Rare Copy Number Variants in Isolated Sporadic and Syndromic Atrioventricular Septal Defects	Priest JR. <i>et al</i>	2012
Rare Copy Number Variations in Adults with Tetralogy of Fallot Implicate Novel Risk Gene Pathways	Silversides CK. <i>et al</i>	2012
Submicroscopic Chromosomal Copy Number Variations Identified in Children With Hypoplastic Left Heart Syndrome	Payne AR. <i>et al</i>	2012
Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients	Thienpont B. <i>et al</i>	2007
Chromosome abnormalities in neonates with congenital heart defects	Bachman KK. Thesis	2012
Chromosomal abnormalities identified in infants with CHD	Connor J. Thesis	2011
The contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart disease	Warburton D. <i>et al</i>	2014
<i>De Novo</i> Copy Number Variants Identify New Genes and Loci in Isolated, Sporadic Tetralogy of Fallot	Greenway SC. <i>et al</i>	2009
Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations	Tomita-Mitchell A. <i>et al</i>	2012
Increased Frequency of De Novo Copy Number Variations in Congenital Heart Disease by Integrative Analysis of SNP Array and Exome Sequence Data	Glessner JT. <i>et al</i>	2014
Microdeletions and Microduplications in Patients with Congenital Heart Disease and Multiple Congenital Anomalies	Goldmuntz E. <i>et al</i>	2011
Rare Copy Number Variants Contribute to Congenital Left-Sided Heart Disease	Hitz MP. <i>et al</i>	2012
Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning	Fakhro KA. <i>et al</i>	2011

Tabla 4.1. Relación de artículos revisados, autor y año de publicación, utilizados en la realización de la comparativa bibliográfica. Ref.: 168,169,296-312

4.1.2 SNP-Array. Análisis de ligamiento

El estudio de ligamiento se llevó a cabo gracias a la colaboración que se estableció con la Dra. Antonia Flaquer del *Institute of Medical Informatics, Biometry, and Epidemiology, Chair of Genetic Epidemiology, Ludwig-Maximilians-Universität*, Munich, Alemania. Se pretendía identificar regiones cromosómicas implicadas en un posible marco genético común compartido entre las diferentes CC. Este análisis se llevó a cabo a partir de los datos de genotipado obtenidos mediante SNP-Array (ver apartado 4.1.1) en familias con alta prevalencia de CC y sin causa conocida.

4.1.2.1 Descripción de familias con CC

Se reclutaron 6 familias procedentes de los hospitales Son Espases (Palma) y Puerta del Hierro (Madrid), que presentaban elevada prevalencia de CC y que estaban formadas por un total de 48 miembros (Fig. 4.6), de los cuales 16 son afectados. El fenotipo presentado por los distintos miembros era variable: CIA, CIV, TGV, TOF y DSVD.

A partir de muestras sanguíneas de los pacientes, se extrajo ADN mediante el *Master Pure™ DNA Purification Kit for Blood. Version II* (Epicentre-Illumina). Todas las muestras de ADN (200ng/μl) se enviaron al centro nacional de genotipado (Cegen) para su análisis mediante el SNP-Array *Illumina 660W beadchip*.

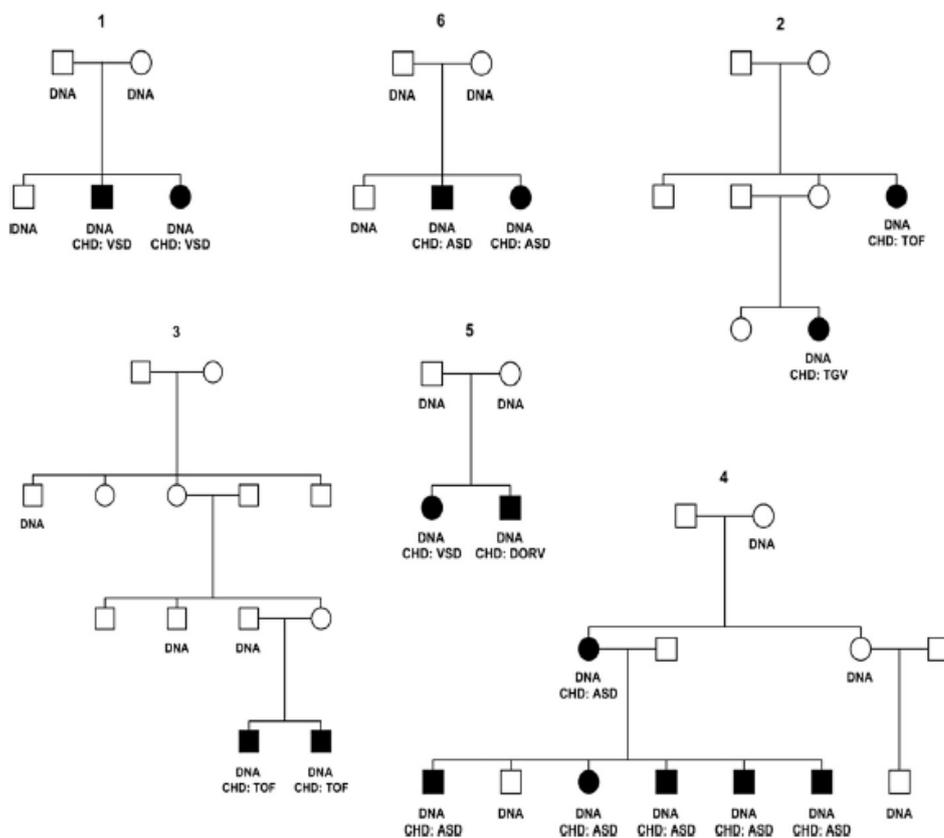


Fig. 4.6. Pedigrís de las familias analizadas mediante análisis de ligamiento. En negro se señalan los miembros afectados y en blanco los miembros sanos. Se han analizado mediante *SNP*-Array los que indican DNA. Se muestra también la CC mostrada en cada uno de los pacientes. VSD=CIV (Comunicación interventricular); ASD=CIA (Comunicación interauricular); DORV=DSVD (Doble salida ventricular dcha.); TGV: Trasposición de grandes vasos; TOF: Tetralogía de Fallot.

4.2.1.2 Análisis de ligamiento

A partir de los análisis de *SNP*-Array realizados a varios de los miembros de las familias 1-6 señalados en la figura 4.6, se obtuvo información de 660000 *SNPs* y sus posiciones. Estos datos se utilizaron *a posteriori* para la realización del análisis de ligamiento respecto a aneurisma y CIA (comunicación interauricular). En este análisis se consideraron afectados tanto los que presentaban CIA y aneurisma como los que únicamente presentaban aneurisma, dado que se consideró que la aneurisma era un paso previo a la formación de la CIA.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el análisis de ligamiento se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Flaquer, basándose en el método estadístico MOD para el cálculo de LOD Score, que evalúa tanto los parámetros de recombinación como los de herencia de la propia enfermedad (recesivo, dominante, ligado al sexo).

Cualquier posible error en el genotipado de la familia podría provocar un análisis erróneo de los resultados. Para evitarlo, se utilizó en primer lugar el programa *Graphical*

Representation of Relationship Errors (GRR) que ayuda a descartar errores en el pedigrí, eliminar muestras duplicadas y sujetos sin relación. El segundo filtro que se aplica es bajo la utilización del programa PEDCHECK para detectar incompatibilidad de marcadores y la tercera herramienta es el programa MERLIN v1.1.2 que detecta problemas en los genotipos como dobles recombinantes.

Una vez descartados todos los SNPs potencialmente “erróneos” se llevó a cabo un análisis de ligamiento paramétrico (*LOD Score*). Previamente se calcularon las frecuencias alélicas (proporción de individuos que presentan un alelo concreto respecto al conjunto de la población) y las penetrancias (proporción de individuos de una población que presentan el fenotipo patológico). El modelo utilizado para el cálculo del ligamiento es el MOD Score multivariable porque permite hacer un análisis considerando distintas aproximaciones. Este método es útil para evaluar patologías con una herencia desconocida, adquiriendo importancia en las enfermedades complejas.

4.1.3 EMG. Secuenciación del Exoma Humano o WES. Análisis de secuencias.

4.1.3.1 Secuenciación del Exoma Humano.

La técnica de WES se utilizó con el objetivo de identificar variantes poco frecuentes que pudieran estar asociadas a las EMG y que ayudaran a esclarecer la etiología de la enfermedad.

El análisis se realizó a sujetos pertenecientes a 2 familias con elevada prevalencia en EMG, reclutados en el servicio de psiquiatría del Hospital Universitario Son Espases. La familia 1 está formada por 23 miembros distribuidos en 3 generaciones, de los cuales 18 son sanos y 5 son afectados (Fig. 4.7). El fenotipo que presentan los afectados es el siguiente: II-4: trastorno bipolar; III-1: depresión severa recurrente; III-2, III-3 y III-4: esquizofrenia.

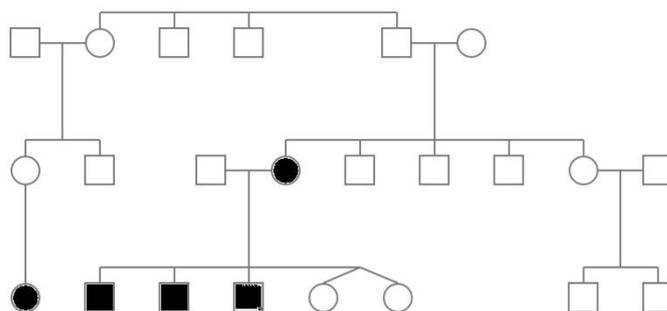


Figura 4.7. Pedigrí de la familia 1 analizada mediante WES con elevada prevalencia en EMG. En negro se señalan los miembros afectados de EMG (esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión severa recurrente).

La familia 2 está formada por 120 miembros distribuidos en 5 generaciones, de los cuales 33 son afectados y 87 son no afectados (Fig. 4.8). Los 33 pacientes afectados presentan un fenotipo psicótico con al menos un episodio psicótico diagnosticado.

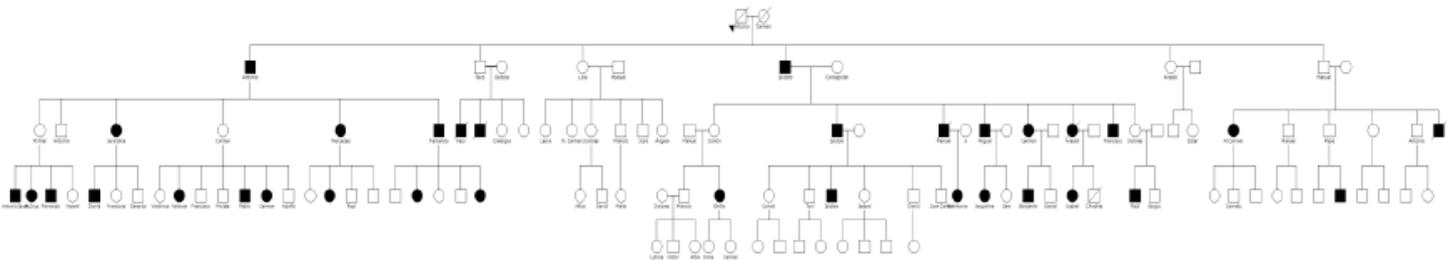
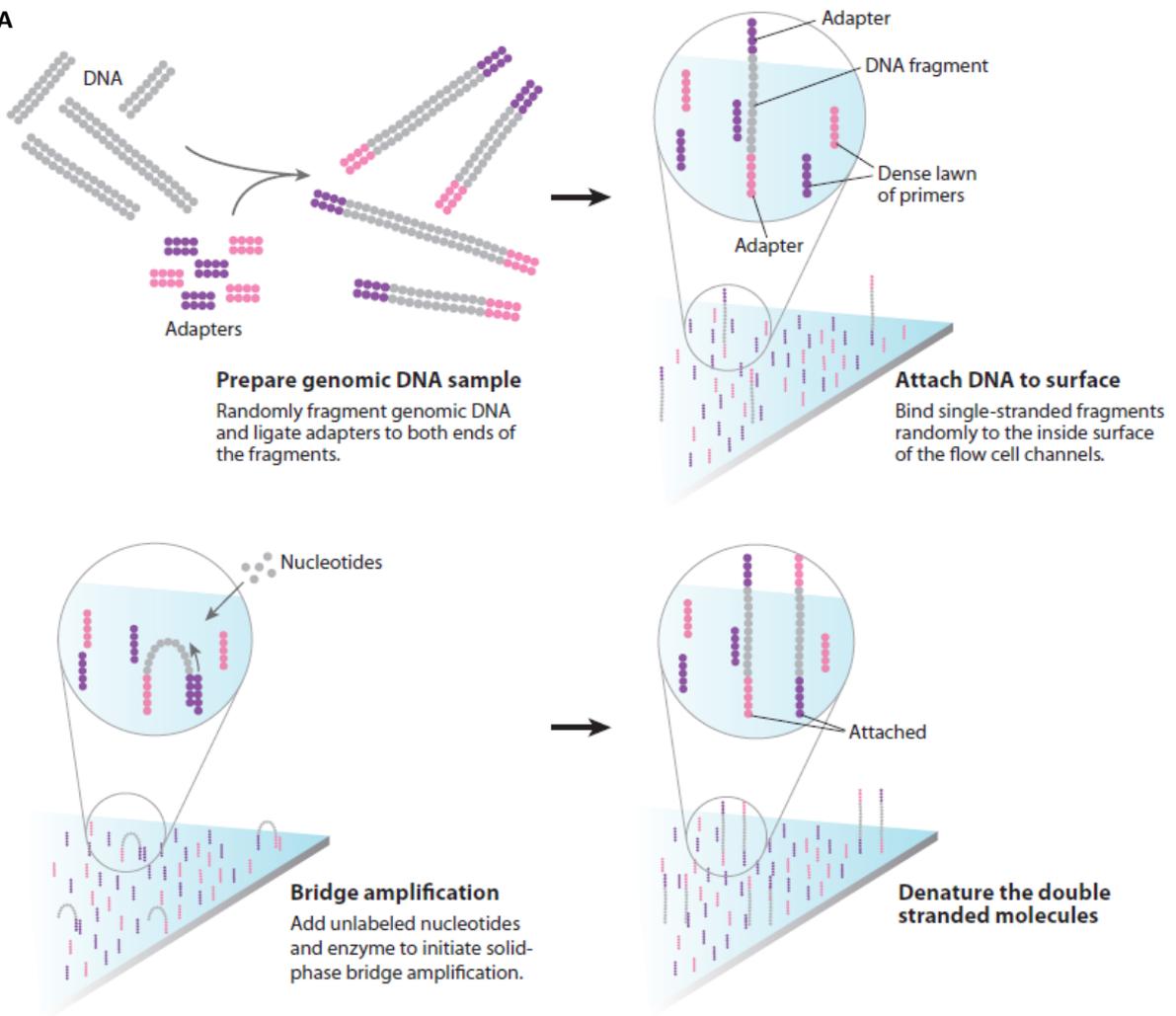


Figura 4.8. Pedigrí de la familia 2 analizada mediante WES con elevada prevalencia en EMG. En negro se señalan los miembros afectados de EMG (esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión severa recurrente) y en blanco los no afectados.

A partir de muestras sanguíneas de los miembros II-4, III-3, III-4 y III-5 de la familia 1 y IV-1, IV-20, IV-29 y IV-43 de la familia 2, se extrajo ADN mediante el *Master Pure™ DNA Purification Kit for Blood. Version II* (Epicentre-Illumina). La secuenciación del genoma se externalizó a la empresa *Beijing Genome Institute* en Hong Kong donde utilizan el secuenciador *Illumina Genome Analyzer*.

El secuenciador de Illumina se basa en la amplificación en puente sobre una plataforma sólida. En esta plataforma, se localizan cebadores a los que se unen los fragmentos de ADN. Éstos, formarán un puente y se amplificarán hasta formar distintos grupos o clústeres a partir de los diferentes fragmentos de ADN. La secuenciación se lleva a cabo añadiendo los 4 nucleótidos marcados con diferentes fluorocromos. El software es capaz de captar el nucleótido que se ha añadido en cada ciclo. Los ciclos se repiten hasta obtener la secuencia completa de todos los fragmentos. En último lugar, se lleva a cabo un ensamblaje de todos los fragmentos secuenciados (Fig. 4.9).

A



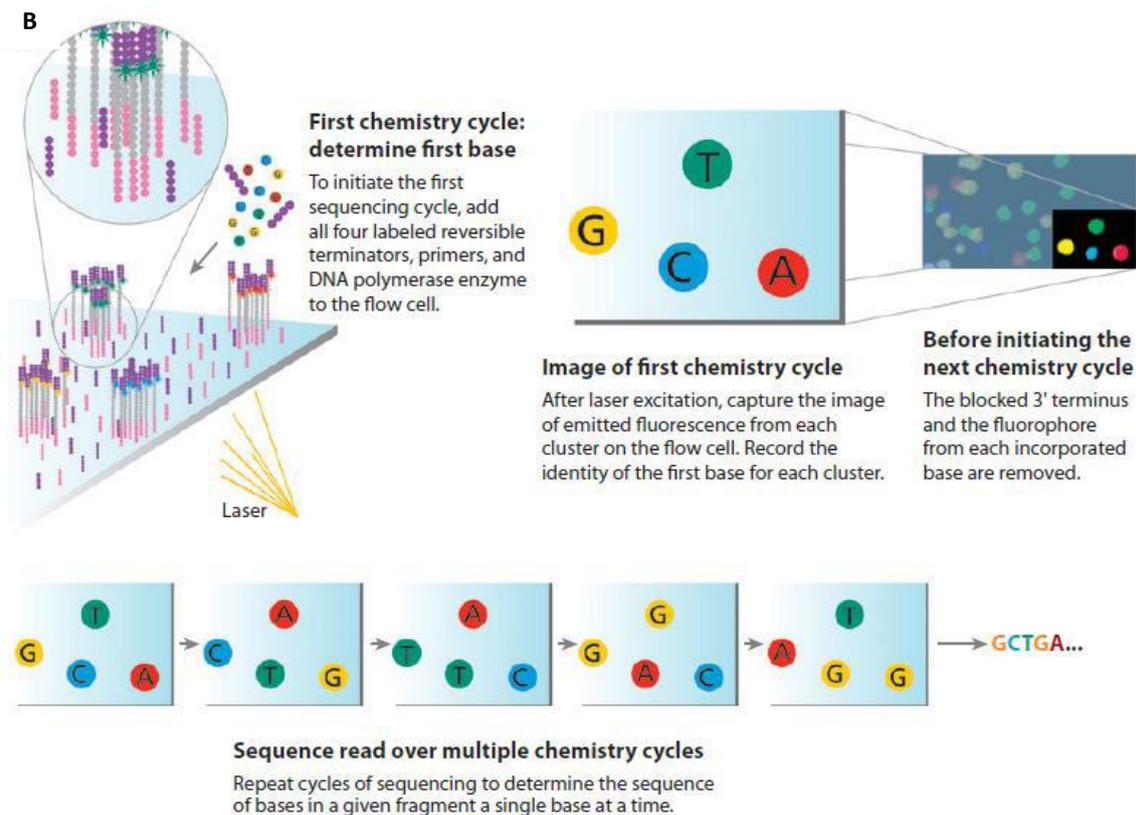


Figura 4.9. Método de secuenciación utilizado por la tecnología de *Illumina*. (A y B) Los grupos de fragmentos se forman por amplificación de los mismos en puente. Se añaden los 4 nucleótidos marcados con fluorocromos además de la polimerasa. La secuenciación se inicia con la unión del primer nucleótido. El sistema óptico lo capta y a continuación se elimina el extremo 3' junto con el fluoróforo de la base que ha sido incorporada. La cadena está preparada para añadir un nuevo nucleótido.

4.1.3.2 Análisis de datos a partir de la técnica de WES.

El análisis de secuenciación se llevó a cabo mediante el programa *Next Gene Software* de *Soft Genetics*. Este software genera un listado de todas las variantes genéticas presentes en los individuos estudiados que difieren de la secuencia del genoma humano consenso (GRCh37/hg19) y que podrían corresponder a variantes causales de la enfermedad de estudio. Este listado se genera a partir de la utilización de unos filtros aplicados por el usuario.

Así pues, los criterios de filtraje para el análisis de la secuenciación del exoma fueron:

- 1) *SNPs* compartidos entre los miembros afectados y que no estaban contenidos en los controles sanos no relacionados, que presentaran una cobertura en la secuencia del exoma mayor del 10X (número de veces que se ha secuenciado el fragmento de ADN).
- 2) No considerar *SNPs* no codificantes o sinónimos ya que es más improbable que puedan causar cambios en la expresión de las proteínas.

3) No considerar *SNPs* descritos con una frecuencia mayor de 0,5%. Presuponemos que las variables que están presentes en la población general con frecuencias medias-altas no tendrían efectos patogénicos muy penetrantes y presentarían elevada expresividad.

Una vez obtenidos los resultados, utilizamos las páginas web <http://www.1000genomes.org> y <http://exac.broadinstitute.org>, para comprobar las frecuencias de los polimorfismos encontrados en las familias y para confirmar que los cambios encontrados pudieran tener relevancia con la enfermedad. Estas webs contienen secuencias de referencia generadas a partir de la secuenciación de 1000 y 63000 exomas humanos, respectivamente.

La segregación de las variantes genéticas compartidas por los miembros afectos a los que se les secuenció el genoma se completó en el resto de miembros de la familia mediante secuenciación Sanger. Se utilizó el secuenciador de capilar ABI Prism 310 y las secuencias se analizaron mediante el programa *CLC Bio* que permite visualizar las secuencias de interés y alinearlas con secuencias consenso. Los oligos empleados para la amplificación y secuenciación del ADN de los pacientes y sus familiares, para las distintas variantes, están descritos en las tablas 4.2 y 4.3.

Gen	Secuencia de oligos	Gen	Secuencia de oligos
UNC80-F	TTGGCCATAATATCATAA	KLB-F	AAAGCTAAATCCTCAAT
UNC80-R	TGGGCAGCGATGACCCC	KLB-R	TGTCAACACCTAAGGGAA
Gli2-F	TCAGGACAGCATCCAGCCC	ACTBL2-F	ACGGTGTGGCATAGAG
Gli2-R	TGGGCAGCGATGACCCC	ACTBL2-R	TCAGGACGGACCACAGGC
CASQ1-F	GGTGCTAGGGACACCCAAG	PPAP2A-F	TTTGGTGGGAAGGCTTGG
CASQ1-R	GACTAAAGCCACATGCC	PPAP2A-R	CCTCAAAGTATATCCTTT
HRNR-F	GACCCATGTCTGGCCATA	FKBP9-F	GAGGGCCACATGGCGTG
HRNR-R	GGCTCCCATCAATCTTCG	FKBP-R	AGAAGAAAAAGAAAAGA
MACF1-F	TTTAAATAACAGTTTAA	OR11G2-F	CCTATGGTAAAAATGTG
MACF1-R	GACCCCTGAAGGGGACAT	OR11G2-R	ACATATCTCCAAGAAGGA
TRIP12-F	GCCTGTAATCCAGAAGG	MCTP2-F	CGTGTTCCTCACTTTGA
TRIP12-R	TCACGGAGTCAGAAAAGA	MCTP2-R	TTCAGACTGTTTCAAGGA
RNF25-F	TACTAGCTGATGAGATG	USP32-F	ACATCCCGAATTTAGAG
RNF25-R	CCCATGGACCTAAAGCCA	USP32-R	CCAAGGAATACATCTCTT
ZPLD1-F	ATCCAGGTTTTATTGTC	HNRNPH2-F	TATTTATAATTTCTTCT
ZPLD1-R	TCTAACACATATCCACTT	HNRNPH2-R	CTATTTAGTCGTCCTTCT

Tabla 4.2. Descripción de las secuencias de los oligos utilizados para cada una de las variantes estudiadas en los miembros de la familia 1.

Gen	Secuencia de oligos
SKA3-F	TCGGATGTTCTGTCCATG
SKA3-R	CAAAGTGCTGGAATTGCA
RBBP6-F	GACTTTGGAAGCTTGAATGTG
RBBP6-R	CAATACGCTGAGGCTGACA
HCAR3-F	TCTCCAGAGATTGCTGGTTCT
HCAR3-R	GTAGGTGAAGCTGACAGTGA
ARHGAP19-F	GACTCCACAAATCTTAATGC
ARHGAP19-R	GCAAGGACAGTGGTTCTC
EVPL-F	GCTGAGCTACATTTTCAAGC
EVPL-R	CCTGTAAAGAGTAGTTGCTG

Tabla 4.2. Descripción de las secuencias de los oligos utilizados para cada una de las variantes estudiadas en los miembros de la familia 2.

Con el objetivo de conocer si los genes que presentaban variantes poco frecuentes y que eran comunes a los enfermos estaban implicados en vías metabólicas o de señalización relevantes, se realizó un análisis mediante el software IPA (ver apartado 4.1.1.2.B).

4.2 Técnicas de biología celular-proteómica

4.2.1 Cultivo celular

4.2.1.1 Mantenimiento de líneas celulares

Para los distintos experimentos de localización y función de DISC1, tanto los realizados en expresión basal, en sobreexpresión o en silenciamiento, se llevaron a cabo técnicas básicas de cultivo celular. Las líneas utilizadas en los distintos experimentos fueron:

- HEK293T: Células embrionarias de riñón humano.
- SH-SY5Y: Células de neuroblastoma humano.

Los cultivos se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con 4,5g/l de Glucosa y 2mM de L-Glutamina (Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO), 1% de piruvato sódico (GIBCO), 1% de antibióticos penicilina/estreptomina (GIBCO) y 1% de antimetabólico Fungizone (GIBCO).

Las células se subcultivaban cuando alcanzaban el 80% de confluencia, mediante tripsinización con 0,25% de tripsina-EDTA (ácido etilen diamino tetraacético).

4.2.1.2 Transfección de líneas celulares mediante liposomas

Para inducir la sobreexpresión de nuestra proteína de interés en la línea celular HEK293T se utilizó Lipofectamina 2000 de Invitrogen siguiendo el protocolo de dicha casa comercial para esta línea celular. Los plásmidos utilizados fueron, pDEST40 que contenía la forma completa hDISC1 (FL, hDISC1-V5) y sus formas aberrantes Δ 597 (Δ 597-hDISC1-V5) y Δ 384 (Δ 384-hDISC1-V5), que en el extremo C-ter tienen un epítipo V5 para su

detección específica, y el plásmido pCMV-SC-NM, que contenía hDISC1 con un epítipo myc en el extremo Nter (myc-hDISC1).

Para experimentos de degradación proteica, BN-PAGE e IP (ver apartados 4.2.2.3, 4.2.2.6 y 4.2.2.8) se sembraron 3×10^5 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos, una placa para cada plásmido y una para el plásmido vacío (MOCK), que es utilizado como control para comprobar que los efectos observados son producidos por la proteína recombinante y no por el plásmido *per se*. A las 24h se realizó la transfección añadiendo $10 \mu\text{l}$ de lipofectamina y $4 \mu\text{g}$ de ADN por cada pocillo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen). A las 24h post transfección se recogieron las células y se continuó con el protocolo de extracción de mitocondrias descrito en el apartado 4.2.2.1.

Para experimentos de inmunofluorescencia (ver apartado 4.2.2.10) se sembraron 5000 células sobre cubreobjetos colocados en placas de cultivo de 24 pocillos. Se realizó una transfección a las 24h y se añadió $2 \mu\text{l}$ de lipofectamina y $0,8 \mu\text{g}$ de ADN por cada pocillo. A las 24h se llevó a cabo la técnica establecida.

4.2.2 Estructura y localización de DISC1 en la mitocondria

4.2.2.1 Subfraccionamiento celular

Con la intención de conocer la localización subcelular de nuestra proteína de interés se realizó un subfraccionamiento celular aislando las mitocondrias, el citoplasma y el núcleo a partir de cerebro de ratón.

Para el aislamiento de las distintas fracciones celulares se escogieron entre 2-4 machos adultos, se les sacrificó por dislocación cervical y se diseccionaron los cerebros manteniéndolos en PBS frío. A partir de este momento el tejido se mantuvo continuamente en hielo. Se les quitó la región del cerebelo y se procedió a segmentar el resto de estructuras para facilitar su homogenización. Se recogieron todos los fragmentos de tejido en un tubo de 15ml y se peletizaron centrifugándolos a $3200g$, 1min, 4°C . A continuación se retiró el sobrante de PBS y se añadieron 3ml de tampón MT compuesto por 10mM Tris (hidroximetil aminometano); 0,2mM EDTA; 0,25M sacarosa; pH 7.8. La homogenización se llevó a cabo con un homogenizador de vidrio Potter-Elvehjem de 5ml (30 golpes) y se centrifugó el homogenado (i) 5min. a $3200g$, 4°C . Se guardó el sobrenadante y se repitió el proceso 3 veces. El pellet (iii) sobrante se utilizó posteriormente para el aislamiento de núcleos. Se juntaron los sobrenadantes y se centrifugó 15min. a $20000g$, 4°C . El sobrenadante (ii) se guardó para el aislamiento de las proteínas del citosol y el pellet se resuspendió en $50 \mu\text{l}$ de percoll 15% con tampón MT para la obtención de la fracción impura de mitocondrias.

Para la obtención de la fracción pura de mitocondrias se utilizó un gradiente de percoll (25-40%) sobre el que se depositó la fracción impura y se centrifugó a $35000g$, 25min., 4°C en una ultracentrífuga con rotor basculante. Se extrajo la fase de mitocondrias, se pasó a un eppendorf y se hicieron 3 lavados con tampón MT a $20000g$, 10min., 4°C . El

pellet (mitocondrias) obtenido se resuspendió en 100µl de tampón MT y se procedió a su cuantificación mediante el método de Bradford, siguiendo el protocolo de la casa comercial (BioRad™ Protein Assay).

La fracción citosólica (ii) obtenida a partir del sobrenadante recogido en el aislamiento de la fracción impura de mitocondrias, se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) ya que las proteínas que contenían se encontraban muy diluidas. Para ello se añadió un volumen de TCA por cada 4 volúmenes de muestra y se incubó 10min. a 4°C. Seguidamente se hizo una centrifugación a 20000g, 5 min. y 2 lavados del pellet obtenido con 200µl de acetona.

El aislamiento de los núcleos (iii) se llevó a cabo a partir del pellet de homogenado descrito anteriormente. Se resuspendió en tampón 1.8M sacarosa en Tris-HCl (Tris ácido clorhídrico) a pH 7.4 y se centrifugó a 70900g, 90min. Se descartó el sobrenadante y el pellet (núcleos) se resuspendió en 50µl de tampón MT para su cuantificación.

Además de estas fracciones celulares se guardó 50µl del homogenado (i) inicial donde es posible detectar el total de las proteínas contenidas en el tejido.

Una vez cuantificadas las proteínas de las diferentes fracciones, se separaron por electroforesis y se inmunodetectaron las proteínas de interés por *Western Blot* (WB), procediendo cómo se explica a continuación (apartado 4.2.2.2).

Los anticuerpos utilizados para el experimento de subfraccionamiento celular fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500; Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Actina (MC)*	1/1000; Sigma	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Tom20 (MM)*	1/500; Sta. Cruz	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor

*MC: Marcador citosólico. MM: Marcador mitocondrial.

4.2.2.2 Western Blot (WB)

Esta técnica se basa en la detección específica de proteínas contenidas en una muestra determinada mediante su inmunodetección con anticuerpos específicos.

Para poder realizar la determinación las proteínas se deben desnaturalizar. Para ello, se cogieron 20µg de proteína de cada muestra, se equilibraron con el tampón MT y se añadió tampón de carga (5X) compuesto por tampón Tris (0,5M Tris; 0,4% SDS (dodecilsulfato sódico); 8mM EDTA; pH 6,8); 20% SDS; 0,4M EDTA; 5% β-mercaptoetanol, 42,5% glicerol y 5mg/10ml tampón de azul bromofenol. Se calentaron 5min. a 95°C.

Los geles de electroforesis estaban compuestos por un gel separador al 12% compuesto por 30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida; 1,5M Tris; 10% SDS; 0,1% APS (persulfato de

amonio); 0,04% TEMED (tetrametiletlenodiamina); pH 8,8, y un gel de apilamiento al 5% compuesto por 30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida; 1M Tris; 10% SDS; 0,1% APS; 0,04% TEMED; pH 6,8. La electroforesis se realizó a 50V durante 30min. y 1h a 150V. El tampón utilizado para la electroforesis estaba compuesto por 250mM Tris-Base; 1.92M glicina; 1% SDS; pH 8,3.

La transferencia se realizó utilizando el sistema húmedo de BioRad con tampón de transferencia compuesto por 25mM Tris-Base; 190mM glicina; 20% metanol durante 75min. a 75V. La membrana utilizada para la transferencia de las proteínas fue de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de BioRad. El bloqueo se hizo con tampón de bloqueo compuesto por 5% BSA (suero bovino albúmina), 0,02% azida de sodio, 0,02% rojo fenol y TBST 1X, tampón Tris salino y Tween compuesto por 150mM NaCl (cloruro sódico); 2mM KCl (cloruro potásico); 50mM Tris; 0,1% Tween; pH 7.4; durante 30min. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante la (O/N por sus siglas en inglés *overnight*) y fue seguida de 3 lavados con TBST de 10min. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1h a temperatura ambiente seguido también de 3 lavados con TBST. Éstos anticuerpos están marcados con fluoróforos *IRDye*[®] pudiendo capturar su señal al ser excitados a 700nm u 800nm en el equipo de revelado *Odyssey CLx for infrared fluorescence* (LI-COR) utilizado en nuestros experimentos.

4.2.2.3 Ensayo de Protección de Degradación Proteica

Para determinar la localización submitocondrial de la proteína DISC1 se realizó un ensayo de protección de degradación proteica basado en la incubación de mitocondrias aisladas con concentraciones crecientes de la proteasa Proteinasa K. El patrón de degradación proteica es dependiente de la localización mitocondrial de las proteínas, siendo las proteínas de la ME las más susceptibles a la degradación, posteriormente las proteínas del EIM, MI y finalmente las contenidas en la MZ.

Este experimento se realizó a partir de mitocondrias extraídas de cerebro de ratón, de células HEK293T sin transfectar o control (CTL) y en sobreexpresión con FL-hDISC1-V5, Δ597-hDISC1-V5 y myc-FL-hDISC1.

A partir de cerebro de ratón: Procedimos como se describe en el apartado 4.2.2.1 para obtener la fracción pura de mitocondrias. 20μg de proteína aislada se digirieron con 0; 0,2; 0,8; 1; 10; 50 y 100 (μg/ml) de proteinasa K en tampón de sacarosa (250mM sacarosa; 10mM Hepes; 2mM MgCl₂ (cloruro de magnesio); 1mM EDTA, 10mM KCl ; pH 7.4) Después de una incubación de 20min. en hielo se detuvo la reacción con 100mM PMSF (fenil metano sulfonilfluorido). Se replicó la muestra a 100μg/ml a la que se le añadió tritón 0,1% que permite la solubilización total de las proteínas. Para finalizar se añadió 5μl de tampón de carga (5X).

A partir de células: Se recogieron 2,5x10⁶ células (HEK293T) y se sometieron a congelación para la rotura de membranas (1h). Posteriormente se homogenizaron con un homogenizador de vidrio Potter-Elvehjem en tampón de homogenización compuesto

por 250mM sacarosa; 1mM EGTA (ácido etilen glicol tetraacético); 1mM EDTA; 10mM Hepes; pH 7.4. El sobrenadante resultante se centrifugó a 20000g, 12min. a 4°C para obtener la fracción mitocondrial.

Se prepararon 8 tubos con 20µg de proteína cada uno y se resuspendieron con las diluciones preparadas anteriormente de Proteinasa K (0,2; 0,8; 1; 10; 50; 100 µg/ml). Después de una incubación de 20min. en hielo se detuvo la reacción con 100mM PMSF. Se replicó la muestra a 100µg/ml a la que se le añadió tritón 0,1% permitiendo la solubilización total de las proteínas. Para finalizar se añadió 5µl de tampón de carga (5X). Los productos de degradación se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% y se realizó un WB (ver apartado 4.2.2.2) para identificar las proteínas marcadoras de cada compartimento mitocondrial y comparar sus patrones de degradación con los obtenidos por nuestra proteína de estudio, DISC1.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500; Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
VDAC (ME)*	1/1000; Cell Signaling	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
ENDO G (EIM)*	1µg/ml; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Mic60/mitofilina (MI)*	1/2000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Hsp60 (MZ)*	1/20000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
V5-tag	1/5000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Myc-tag	1/1000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

*ME: Membrana externa. EIM: Espacio intermembrana. MI: Membrana interna. MZ: Matriz.

4.2.2.4 Rotura de membranas mediante tratamiento con fosfatasa alcalina.

Para determinar si la proteína DISC1 estaba localizada en el EIM de forma soluble o asociada a la MI, se aislaron mitocondrias de cerebro de ratón (ver apartado 4.2.2.1) y se sometieron a un tratamiento con fosfatasa alcalina para provocar la rotura de las membranas (externa e interna) pudiendo así separar mediante centrifugación la fracción soluble de la insoluble.

Para ello se cuantificaron las proteínas y se obtuvo un total de 3000µg. Una vez obtenida esta fracción se dividió la muestra en 2 tubos eppendorf (A y B). En el tubo A se añadieron 20 volúmenes de tampón H compuesto por 0,32M sacarosa; 1mM EDTA y

40mM Tris a pH 7.4 al que se añadió 0,1M Na₂CO₃ (carbonato sódico) a pH 11.5. En el tubo B se añadieron también 20 volúmenes de tampón H al que se le añadió 0,5% Triton X-100 con el objetivo de obtener todas las proteínas en una misma fracción disociando las que estuvieran asociadas a membrana. Después de una incubación de 30min. en hielo se centrifugaron a 91000g, 25min., 4°C. El pellet se resuspendió en 50µl del mismo tampón y se cuantificaron las proteínas. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron por TCA (ver apartado 4.2.2.1).

Las muestras se resolvieron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 20µg de proteína del pellet y todo el precipitado del sobrenadante. Mediante WB (ver apartado 4.2.2.2) y utilizando marcadores de los diferentes compartimentos mitocondriales se determinó la localización submitocondrial de la proteína de estudio DISC1.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500; Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
ENDOG (EIM)	1µg/ml; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Mic60/mitofilina (MI)	1/2000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Hsp60 (MZ)	1/20000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

*EIM: Espacio intermembrana. MI: Membrana interna. MZ: Matriz.

4.2.2.5 Generación de mitoplastos: Rotura de la membrana mitocondrial mediante digitonina.

Los mitoplastos son el resultado de eliminar la ME de las mitocondrias, con lo que están compuestos de la MI y la MZ.

Para su obtención, se llevó a cabo una permeabilización con digitonina, un detergente lábil, que permite solubilizar la ME pero no la MI, así, mediante centrifugación se consigue separar el mitoplasto del resto de estructuras del orgánulo.

Primeramente se realizó un aislamiento de mitocondrias (ver apartado 4.2.2.1) y se cuantificaron las proteínas obteniendo un total de 3000µg. Se trataron las mitocondrias con 1,1mg de digitonina al 2% en tampón A que contiene 0,22M manitol; 0,07M sacarosa; 2mM Hepes; 0,5mg/ml BSA a pH 7.4, por cada 10mg de proteína y se incubó 15min. en hielo. Seguidamente se añadieron 3 volúmenes de tampón A y se centrifugó a 31000g, 20min., 4°C. El pellet se resuspendió en 20µl del mismo tampón y se cuantificaron las proteínas. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron por TCA (ver apartado 4.2.2.1).

Las muestras se resolvieron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 20µg de proteína del pellet y todo el precipitado del sobrenadante. Mediante WB (ver apartado 4.2.2.2) y utilizando marcadores de los diferentes compartimentos mitocondriales se determinó la localización submitocondrial de la proteína de estudio DISC1.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500; Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
ENDOG (EIM)*	1µg/ml; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Mic60/mitofilina (MI)*	1/2000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Hsp60 (MZ)*	1/20000; Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

*EIM: Espacio intermembrana. MI: Membrana interna. MZ: Matriz.

4.2.2.6 BN-PAGE. Análisis de complejos.

Para determinar si DISC1 estaba formando parte de un complejo multiproteico en la mitocondria, se aislaron mitocondrias tanto de células como de cerebro de ratón utilizando detergentes lábiles (digitonina y LM (lauril-β-D-maltósido)) y se resolvieron en geles nativos no desnaturizantes (*Blue Native-gels, BN-PAGE*) y sus correspondientes segundas dimensiones desnaturizantes (2D-WB, *SDS-PAGE*).

El BN-gel fue desarrollado para separar proteínas de membrana y complejos proteicos con un tamaño de entre 10-10000kDa. Esta técnica se basa en la utilización de detergentes no iónicos como la digitonina que se utiliza para aislar complejos multiproteicos asociados, como es el caso de los supercomplejos de la cadena respiratoria o los dímeros de la ATP sintasa; o el LM, detergente con mayor capacidad de solubilización que la digitonina y utilizado para el aislamiento de proteínas de membrana o complejos proteicos individuales. Después de la solubilización se añade un colorante aniónico, el azul de Coomassie G-250 por sus propiedades hidrofóbicas. Éste, se une a la superficie de las proteínas de membrana provocando un cambio de carga que ayuda a su migración hacia el tampón ánodo (pH 7). Debido a la carga negativa que contienen se repelen unas de otras evitando que se formen agregados. Además la pérdida del carácter hidrofóbico minimiza el riesgo de ser desnaturizadas por detergentes¹⁵⁰.

Para los geles nativos se utilizaron fracciones puras de mitocondrias extraídas a partir de distintos tejidos de ratón (hipotálamo, córtex, córtex prefrontal y estriado en cerebro; y corazón e hígado) (ver apartado 4.2.2.1) y de células en sobreexpresión (ver apartado 4.2.1.2).

Para el BN-PAGE a partir de muestras de tejido, 200µg de proteína se centrifugaron a 10000g, 2min., 4°C; para eliminar restos del tampón de homogenización y se resuspendió el pellet en 20µl de tampón A compuesto por 50mM Bis-Tris y 1,5M ácido aminocaproico; pH 7. A continuación se les sometió a una solubilización débil mediante la incubación en hielo durante 5min. con 0,4% (w/v) LM o 1% (w/v) digitonina. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron a 20000g, 30min. a 4°C descartando el pellet y añadiendo al sobrenadante un 10% del volumen de tampón de carga compuesto por 50mM Bis-Tris; 750mM ác. aminocaproico; 0.5mM EDTA y 5% azul de Coomassie G-250.

Para el análisis de complejos a partir de células se recogieron 2.5×10^6 y se peletizaron a 600g, 3min., 4°C y posteriormente se hizo un lavado con 1ml PBS frío y se centrifugó a 3200g, 5min., 4°C. Seguidamente se hizo una solubilización lábil con 3% (w/v) de digitonina en 200µl de PBS y se incubó 10min. en hielo. Se añadió 1ml de PBS y se centrifugó a 10000g, 5min., 4°C y se hizo un lavado en las mismas condiciones. A continuación se congeló el pellet a -80°C para facilitar la rotura de las membranas celulares O/N. Se resuspendió el pellet en tampón A suplementado con 0,4% (w/v) de LM para solubilizar de nuevo las muestras y se incubó 5min. en hielo. Posteriormente se realizó una última centrifugación a 20000g, 30min., 4°C y se recogió el sobrenadante añadiendo 10µl de tampón de carga.

En ambos casos se utilizaron la misma composición de geles y las mismas condiciones de electroforesis y transferencia.

Para el gel separador se realizó un gradiente del 5-13%. Para ello se mezclaron 5 ml de gel al 5% con 5ml de gel al 13% con la ayuda de un mezclador de gradiente. El gel al 5% estaba compuesto por 0,9ml de AB (48g acrilamida; 1,5g bisacrilamida en un volumen de 100ml); 3ml tampón gel 3X (150mM Bis-Tris; 1,5M ác. aminocaproico; pH 7); 4,95ml agua destilada; 60µl APS al 10% y 6µl TEMED. Y el gel del 13% estaba compuesto por 1,56ml AB; 2ml tampón gel 3X; 1,32ml agua destilada; 1,08ml glicerol; 36µl APS (10%) y 3,6µl TEMED.

El gel de apilamiento al 4% estaba compuesto de 250µl de AB; 1ml tampón gel 3X; 1,75ml agua destilada; 25µl APS (10%) y 3µl de TEMED.

La separación de complejos multiproteicos se llevó a cabo mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes, seguida de una transferencia a una membrana de PVDF, donde pudimos detectar el complejo en el cual se hallaba nuestra proteína de interés utilizando anticuerpos específicos. Los tampones utilizados para la electroforesis fueron dos, el tampón cátodo (entre vidrios) compuesto por 50mM Tricina; 15mM Bis-Tris; 0,02% azul de Coomassie G-250; pH 7.0, 4°C; y el tampón ánodo (cubeta) compuesto por 50mM Bis-Tris a pH 7.0 y 4°C. La electroforesis se realizó a 4°C en las siguientes condiciones: 50V, 30min., seguido de 1h a 150V, en tampón cátodo con azul de Coomassie y 6h a 150V con tampón cátodo sin colorante.

La transferencia se llevó a cabo O/N a 63A en tampón de transferencia compuesto por 25mM Tris-Base; 190mM glicina; 20% metanol. Después de la transferencia se hizo un

lavado inicial de la membrana con metanol para eliminar los restos de azul de Comassie y se continuó con lavados con tampón de bloqueo (Odyssey) durante un día. La incubación con el anticuerpo primario se hizo O/N y fue seguida de 3 lavados con TBST de 10min. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó 1h a temperatura ambiente seguido también de 3 lavados con TBST. Finalmente las membranas se revelaron en el equipo *Odyssey CLx for infrared fluorescence*.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500. Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
V5-tag	1/5000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Myc-tag	1/1000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Complejo I (NDUFA9)	1/2000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Complejo II (SDHA)	1/2000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Complejo III (CoreI)	1/2000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Complejo IV (CoxI)	1/2000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor

4.2.2.7 2D-WB. Análisis de ensamblaje de las subunidades componentes de los complejos multiproteicos.

Con la finalidad de determinar el ensamblaje de las subunidades componentes de los complejos multiproteicos, y a su vez identificar si nuestra proteína de estudio se alineaba con proteínas conocidas del complejo MICOS, se realizaron análisis de segundas dimensiones de geles desnaturalizantes a partir de muestras previamente resueltas en un gel nativo. Para ello, con la ayuda de un cúter se cortaron las tiras del gel nativo que contenían los complejos proteicos. Éstas, se incubaron en agitación en 3ml de tampón PBS suplementado con 1% de SDS y 1% β -mercaptoetanol durante 30min. a temperatura ambiente, seguidos de 30min. adicionales en tampón PBS suplementado únicamente con 1% de SDS. Posteriormente se realizaron 6 lavados de las tiras de 5min. con agua destilada. Finalmente, la tira se colocó de forma horizontal en la parte superior de un gel desnaturalizante a modo de gel de apilamiento.

La composición del gel separador al 10% se realizó mezclando 250 μ l AB; 1ml tampón gel (3X) (3M Tris y 0,3% SDS; pH 8,45); 1,75ml de agua destilada, 25 μ l APS al 10% y 3 μ l TEMED. El gel de apilamiento al 4% estaba compuesto por 2ml AB; 3,33ml tampón gel (3X); 1ml glicerol; 3,67ml agua destilada; 25 μ l APS al 10% y 3 μ l TEMED.

Los tampones utilizados para la electroforesis fueron dos, el tampón cátodo (entre vidrios) compuesto por 0,1M Tricina; 0,1M Tris y 0,1% SDS; pH 8,25; y el tampón ánodo (cubeta) compuesto por 0,2M Tris; pH 8,9. La electroforesis y la transferencia se realizaron tal y como se describe en el apartado 4.2.2.2.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500. Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Mic60/mitofilina	1/2000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
CHCHD3	1/1000. Abcam	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
CHCHD6	1/1000. ProSci	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Sam50	1/10000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
TRAK1	0,3µg/ml. Thermo	Cabra 800RD	1:5000/Li-Cor
CHCHD10	1/1000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

4.2.2.8 Inmunoprecipitación (IP)

Las interacciones proteína-proteína adquieren especial importancia en el estudio de complejos multiproteicos. La técnica de inmunoprecipitación permite aislar nuestra proteína de interés junto con el resto de proteínas con las que está interaccionando físicamente. Esta técnica consiste en realizar un *pull-down* de un antígeno proteico, mediante la utilización de anticuerpos unidos específicamente a él y que a su vez están unidos a *beads* magnéticas que facilitan la precipitación.

Para la realización de la IP se utilizó el *Dynabeads Co-IP Kit* de Life Technologies y se procedió según el protocolo de la casa comercial. Inicialmente se formaron los complejos anticuerpo-beads. Para ello, se pesaron 2mg de beads por cada IP, se añadió 10µg de anticuerpo por cada muestra y se incubó O/N en un agitador rotatorio.

Para llevar a cabo el estudio de interacción se transfectaron células HEK293T con las formas recombinantes FL-hDISC1-V5, Δ597- hDISC1-V5 y Δ384- hDISC1-V5 (ver apartado 4.2.1.2). A las 24h post-transfección se recogieron las células y se obtuvo la fracción de mitocondrias tal y como se describe en el apartado 4.2.2.3. Se cogieron 10µl de mitocondrias para cuantificar la cc de proteínas y el resto se centrifugó a 10000g, 12min., 4°C. El pellet se resuspendió en 200µl de tampón de IP compuesto por 50mM Tris a pH 7,4; 50mM NaCl, 0,5mM EDTA, 10% glicerol, 0,15% digitonina, 1mM PMSF; y se incubó durante 20min. A continuación se centrifugó a 20000g, 10min., 4°C y se guardó el sobrenadante. De éste, se separaron 20µl que se utilizaron *a posteriori* como control (input). El resto (180µl) se utilizó para la IP añadiendo a éste el anticuerpo contra V5,

unido a las beads y 300µl de tampón IP. Se incubó O/N a 4°C en un agitador rotacional. Se hicieron 3 lavados con tampón IP que contenía 0,15% de digitonina y finalmente se añadió tampón de carga para realizar un WB (ver apartado 4.2.2.2).

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
V5-tag	1/5000. Invitrogen	Ratón 680RD	1:5000/Li-Cor
Mic60/mitofilina	1/2000. Abcam	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

4.2.2.8 Ensayo de ligamiento por proximidad in situ o PLA, por sus siglas en inglés *In situ Proximity Ligation Assay*.

Esta técnica se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Paquis-Flucklinger del Instituto de Investigación en Cáncer y Envejecimiento (IRCAN) de Niza, Francia, para detectar interacciones entre CHCHD10, una proteína asociada a demencia frontotemporal (DFT) y las subunidades del complejo MICOS.

La técnica de PLA es una técnica de inmunofluorescencia para la detección de interacciones proteína-proteína basada en la unión de anticuerpos específicos contra proteínas diana, que están unidos a su vez, a sondas PLA que contienen pequeñas secuencias de ADN. Después de una PCR, si las proteínas diana se localizan próximas, estas cadenas se unen emitiendo una señal fluorescente que puede ser captada mediante un microscopio confocal¹⁵¹.

Esta técnica se llevó a cabo en fibroblastos de pacientes con DFT y para ello se sembraron en placas de 16 pocillos Lab-Tek (Nunc) donde se habían colocado previamente cubreobjetos. Para la detección de mitocondrias, los fibroblastos se incubaron con 100nM Mitotracker rojo (compuesto para marcaje específico de mitocondrias) durante 15min. Seguidamente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA) durante 20min. a 37°C. Se realizaron nuevamente 5 lavados con PBS y se permeabilizaron con 2% Triton X100, 10min. Después de otros 5 lavados con PBS, los cubreobjetos se saturaron con 5% de BSA durante 45min. a temperatura ambiente. Se incubaron con los anticuerpos primarios anti-CHCHD10 (Sigma), anti-mitofilina (Abcam/Proteintech) y anti-CHCHD6 (Santa Cruz) durante 1h. a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se diluyeron 1/200 con 5% de PBS-BSA. Después de 2 lavados con PBS, se incubaron con la sonda PLA apropiada (anti-conejo MINUS, anti-ratón PLUS o anti-cabra PLUS). La hibridación, ligación y amplificación se realizaron con el kit *DuoLink In situ Detection Reagents Green* (Olink Biosciences) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Finalmente, las muestras se colocaron en portaobjetos utilizando el medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Molecular Probes) y se analizaron con el microscopio *DeltaVision Imaging*

System (GE Healthcare Life Sciences). Para el análisis estadístico se realizó el test t-Student con el programa Graph (GraphPad Software). Los controles negativos, con un anticuerpo omitido, se llevaron a cabo en paralelo y se comprobaron los resultados en ausencia de la señal de PLA.

4.2.2.10 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica basada en la unión específica de un anticuerpo contra una proteína de interés o una secuencia diana de un plásmido. En este caso los anticuerpos secundarios, marcados con distintos fluorocromos, van a permitir su detección y visualización en un microscopio de fluorescencia.

Dicha técnica se utilizó para estudiar la localización subcelular de las formas recombinantes de DISC1, tanto la forma completa, como sus formas aberrantes encontradas en pacientes.

Los plásmidos utilizados para ello fueron FL-hDISC1-V5, Δ 597- hDISC1-V5 y Δ 385-hDISC1-V5. A las 24h post-transfección (ver apartado 4.2.1.2) se fijaron con solución de fijación compuesta por 760 μ l de PFA al 16%; 240 μ l 1M sacarosa y 2ml tampón fosfato (0,2M Na-dibásico (Na_2HPO_4) y 0,2M Na-monobásico (NaH_2PO_4) en relación 4:1). Se continuó con una permeabilización con PBS y 0,1% Tritón y un bloqueo con 1% BSA. La incubación con el anticuerpo primario se realizó 2h a temperatura ambiente seguido 3 lavados de 5min. con PBS suplementado con glicina y a continuación la incubación del anticuerpo secundario 45min. a 37°C seguido también de 3 lavados con PBS-Gly. El medio de montaje utilizado fue *FluoroshieldTM with DAPI* de Sigma (que permite la marcación del núcleo).

Las preparaciones se visualizaron en un microscopio confocal (ZeissConfocal LSM710) utilizando tres canales: DAPI, GFP y Cy3 con el objetivo de 63X.

4.2.3 Silenciamiento del gen DISC1 mediante *shRNA*.

Con el objetivo de conocer el papel de DISC1 en el complejo proteico y su función, silenciamos el gen mediante un *shRNA* (*short hairpin RNA*) insertado en un lentivirus. Para ello, se adquirió el sistema comercial *Thermo Scientific SMART choice Lentiviral shRNA Particles*. Los elementos del vector que contiene el *shRNA* constan de una secuencia Psi que permite el empaquetamiento del genoma del lentivirus, el promotor *hCMV* (citomegalovirus) utilizado en vectores de expresión en mamíferos, GFP (proteína fluorescente verde) para poder comprobar visualmente el proceso de transducción mediante su expresión, IRES o lugar de unión al ribosoma permitiendo la expresión de GFP y del gen de la resistencia a puomicina, que permite seleccionar aquellas células que hayan incorporado el vector, el *shRNA* de interés que afectará a la expresión de la proteína de estudio y WPRE, un elemento post-transcripcional que mejora la expresión del transgen en las células huésped (Fig. 4.10 y 4.11).

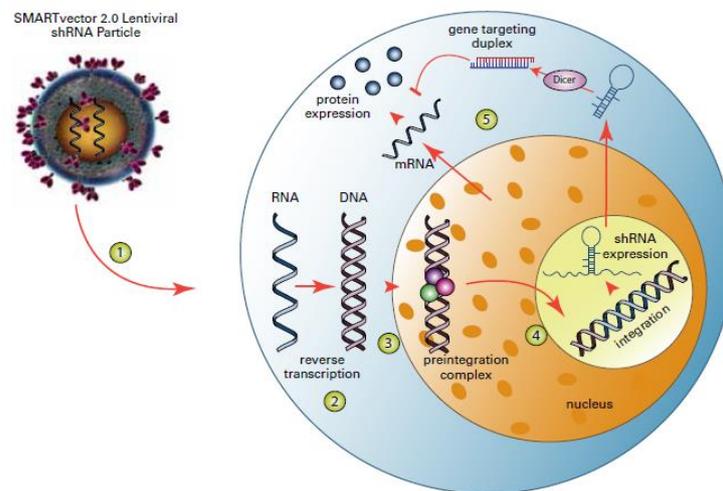
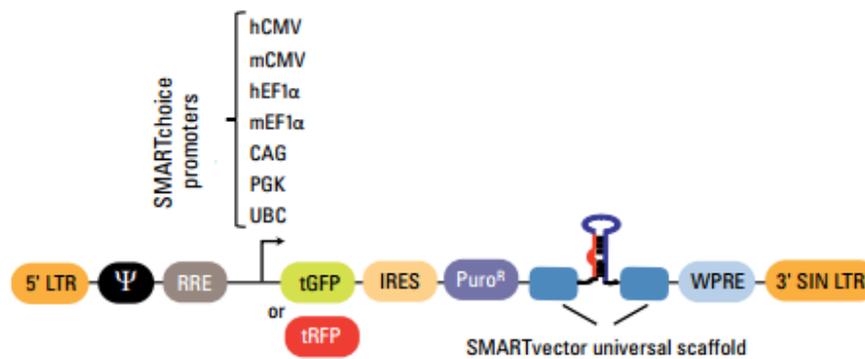
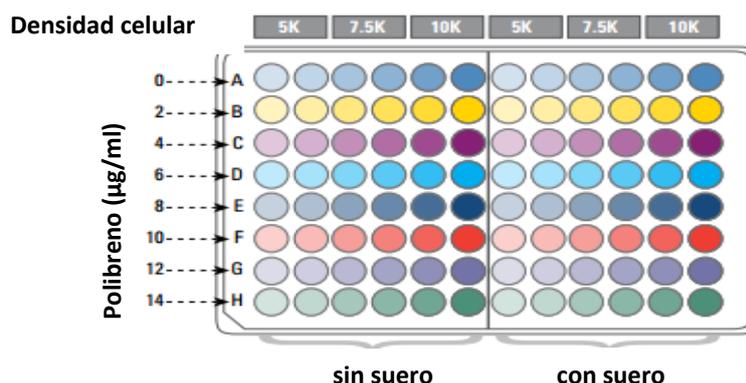


Figura 4.11. Proceso por el cual un lentivirus transduce una célula. Éste introduce su ARN en el citoplasma celular que es transcrito a ADN mediante transcripción reversa. El ADN se importa al núcleo donde se integra en el genoma del huésped. Éste se expresa constitutivamente y se procesa en *shRNA* afectando a la expresión del gen diana.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se seleccionó el *shRNA* con las siguientes características para realizar la transducción en células SH-SY5Y:

Gen	Clon	Vector	Titulación (TU/ml)	Secuencia diana
DISC1	SH-054060-01-10	hCMV-TurboGFP	2,48x10 ⁸	TATTCGAGAGAAACAGCGA

Primero, se optimizaron las condiciones de transducción controlando número de células, presencia o ausencia de FBS y concentración de polibreno a utilizar. Para ello se preparó una placa como la siguiente:



Mediante un test de viabilidad celular comprobamos que la densidad celular óptima estaba entre 5000 y 7500 células, sin suero y una concentración de polibreno de 6µg/ml. Para determinar la multiplicidad de infección o MOI, por sus siglas en inglés *Multiplicity Of Infection*, es decir, el número de partículas virales por célula necesarias para una óptima infección, se realizaron infecciones a MOI 5, 10, 20 y 40, comprobando que el más eficiente fue 5 partículas víricas por célula.

Una vez controlados todos los parámetros necesarios para una óptima transducción se procedió a realizar la infección. En placas de 24 pocillos se sembraron 6 pocillos con 4×10^4 células por pocillo. La densidad celular se calculó haciendo una extrapolación de la obtenida en las placas de 96 y considerando la superficie de los pocillos (placas 96: $0,3 \text{ cm}^2$, 6×10^3 células; placas 24: 2 cm^2 , 4×10^4 células). El número de partículas víricas se obtuvo utilizando la siguiente fórmula: $TU = (MOI \times CN) / VT$, donde TU=partículas víricas; MOI=multiplicidad de infección; CN=número de células por pocillo; VT=Titulación.

El procedimiento se llevó cabo tal y como indica la casa comercial. A las 48h post-transducción se comprobaron las células positivas por la incorporación de GFP en el microscopio para célula viva (Zeiss Cell Observer) y se les cambió el medio de cultivo DMEM completo por medio selectivo DMEM completo suplementado con 3µg/ml de puomicina para eliminar las células que no hubieran incorporado el constructo que contiene el *shRNA* contra DISC1. Pasados 7 días de cultivo en medio selectivo, se determinaron niveles de expresión de DISC1 por WB pudiendo comprobar que la expresión estaba disminuida en las células KD del inglés *Knock Down*.

Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Disc1 N-ter	1/500. Abbiotec	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor
Actina	1/1000. Sigma	Conejo 800RD	1:5000/Li-Cor

4.2.4 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se basa en un sistema colorimétrico para la detección de célula viva en proliferación. Consiste en la reducción del colorante tetrazolio MTT

(bromuro 3-(4,5-diMeTilTiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) a su forma insoluble formazan, que adquiere un color morado. Con la finalidad de determinar si las células DISC1 KD eran más o menos dependientes de la energía mitocondrial, 5×10^3 células se cultivaron en dos medios de cultivo diferentes, suplementados con glucosa (DMEM suplementado con 4,5g/L de glucosa, 10%FBS, 1% Pen/Strep y 1% A/A) o galactosa (DMEM sin glucosa y suplementado con 9g/L de galactosa, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% A/A) como fuente de carbono. La viabilidad celular se determinó a diferentes tiempos de incubación (0h, 16h, 24h y 48h) siguiendo el protocolo de la casa comercial (*Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* de Promega). Las células se incubaron con 10 μ l de la solución del colorante del kit durante 1h y posteriormente se midió la absorbancia a 490nm en un espectofotómetro *Synergy H1 microplate reader* (Biotek).

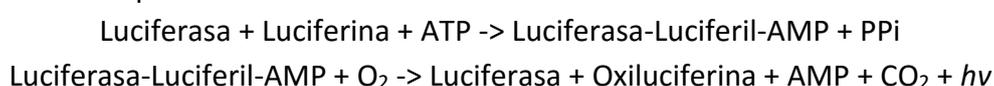
4.2.5 Análisis de fosforilación oxidativa de la proteína DISC1

Para conocer la función de DISC1 en la mitocondria y su papel en la viabilidad celular, se realizaron experimentos con la línea celular SH-SY5Y y la línea estable silenciada de DISC1 KD determinando la función bioenergética, midiendo síntesis de ATP, consumo de oxígeno y potencial de membrana. Además se estudió la capacidad de diferenciación de las células SH-SY5Y midiendo el número y el tamaño de las proyecciones neuríticas y la expresión de proteínas implicadas en vías de diferenciación neuronal.

4.2.5.1 Síntesis de ATP

Conocer los niveles de ATP, ADP o AMP (monofosfato de adenosina) ayuda a conocer el estado energético de la célula, dependiente en su mayoría de la función mitocondrial. Para medir la síntesis de ATP se utilizó el sistema luciferina-luciferasa (ThermoFisher). La luciferasa cataliza la reacción donde se modifica la luciferina, gracias al ATP que se utiliza como cofactor y con la ayuda del oxígeno. La reacción produce luz, a un pico de emisión de 560nm, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de sustrato de la reacción y que puede ser captada por un luminómetro¹⁵². La generación de un destello de luz requiere activación de la luciferina (ácido carboxílico complejo) por una reacción enzimática con ATP en la que la luciferasa (enzima) oxida a la luciferina y se produce una rotura pirofosfato (PP_i) del ATP formando una enzima intermediaria, la luciferasa-luciferil-AMP y PP_i. La unión del AMP a un intermediario metabólico, lo activa para la siguiente reacción, la oxidación y descarboxilación de la luciferil-AMP. Sobre este compuesto actúan el oxígeno molecular y la luciferasa para llevar a cabo la descarboxilación oxidativa de la luciferina que forma oxiluciferina. Esta reacción, que tiene varios pasos intermedios, es acompañada por la emisión de luz. El carbono liberado de la luciferina se une al oxígeno para formar CO₂¹⁵³.

Las reacciones que se llevan a cabo son:



Para poder cuantificar la síntesis de ATP/min. primero se realizó una curva estándar para poder referir los valores de luminiscencia a concentraciones conocidas de ATP utilizando las siguientes concentraciones 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM, 10mM; diluidas en tampón A compuesto por 150mM KCl; 25mM Tris; 2mM EDTA; 0.1% BSA; 10mM K₂PO₄ y 0.1mM MgCl₂. Para la medición se diluyeron 10μl de muestra en 160μl de tampón A y 10μl de tampón B compuesto por 388.8μl Tris-acetato 0.5M a pH 7.75 suplementado con 3.2μl 0.8mM luciferina y 8μl luciferasa (20μg/ml) y se hizo la lectura en un luminómetro (GLOMAX 20/20 Promega), programa STEADY-GLO.

Para las mediciones de las muestras, 2x10⁶ de células se solubilizaron con 0,4μl de digitonina (10mg/ml) durante 1min. Seguidamente se centrifugaron a 600g y se resuspendieron en 160μl de tampón A suplementado con 300μM pentafosfato de adenosina (APP); 300μM ADP; 30μM Piruvato/Malato y 10μl de tampón B. Se midió la luminiscencia con el programa cinético ATP-SYNT que realiza mediciones cada 10 segundos durante 3 minutos.

Estos mismos experimentos se llevaron también a cabo administrando un tratamiento con 17β-estradiol a cc de 0nM, 2nM, 20nM, 200nM y 2000nM y realizando medidas a las 24h post-tratamiento.

4.2.5.2 Respiración celular

En la cadena de transporte de electrones el oxígeno cumple un papel clave como último aceptor de electrones, el cual es reducido a H₂O por la citocromo c oxidasa o complejo IV, mientras se bombean H⁺ al exterior. Conocer la tasa de consumo de oxígeno nos permite establecer deficiencias en la fosforilación oxidativa y por tanto en la viabilidad celular. La tasa de consumo de oxígeno es posible medirla mediante la utilización de un oxígrafo (Hansatech). Esta herramienta permite conocer el consumo de oxígeno a partir de células permeabilizadas, gracias a un electrodo tipo Clark. Este sistema, consiste en un disco con dos electrodos, una membrana permeable al oxígeno y un electrolito, contenidos en una cámara en la que se puede regular la temperatura. El electrodo contiene un cátodo central de platino y un ánodo concéntrico de plata que se bañan con una disolución saturada de KCl y que está separada de la solución problema por una membrana permeable al oxígeno pero no al resto de compuestos. Al aplicar un pequeño voltaje entre los electrodos se produce corriente proporcional a la actividad de oxígeno en la muestra^{154,155}.

Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

En el ánodo: $4\text{Ag} \rightarrow 4\text{Ag}^+ + 4\text{e}^-$

En el cátodo: $\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

Para la realización del experimento, 2x10⁶ de células se resuspendieron en medio DMEM con 1mM piruvato de sodio y se incubaron en la cámara para la medición a 37°C. Al aparecer un patrón regular de consumo de oxígeno, se añadió 1μl del agente

desacoplador de la cadena respiratoria, carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazono (FCCP, 1mM). El FCCP es un ácido lipídico soluble débil que incrementa la permeabilidad de la membrana lipídica a los protones provocando un "desequilibrio" en la cadena de electrones. Al observar de nuevo el patrón regular de consumo de oxígeno se añadió 2mM de cianuro de potasio (KCN), inhibidor específico del complejo IV de la cadena transportadora de electrones, inhibiendo así la respiración.

Del mismo modo, se determinó la actividad del complejo IV inhibiendo la cadena respiratoria en el complejo III con antimicina A y reduciendo el citocromo c endógeno con tetrametil-p-fenil diamina (TMPD), que actúa como donador de electrones directamente al citocromo c, en presencia de ácido ascórbico, que actúa como agente reductor. Así, se midió la tasa de consumo de oxígeno añadiendo 20nM de antimicina A (Sigma-Aldrich), 2mM de TMPD y 10mM ascorbato sódico (Sigma) tal y como se describe anteriormente. Se añadió también 2mM de KCN para inhibir la respiración.

4.2.5.3 TMRM. Potencial de membrana mitocondrial

La respiración mitocondrial genera un gradiente de protones como consecuencia de una diferencia negativa de potencial eléctrico ($\Delta\Psi_m$) a través de la membrana mitocondrial interna. Con la utilización de compuestos catiónicos lipofílicos fluorescentes es posible visualizar el Ψ_m y cuantificarlo. Estos compuestos, son secuestrados por la mitocondria activa debido al potencial eléctrico generado por la cadena transportadora de electrones. La acumulación del colorante será mayor si la mitocondria está polarizada (interior negativo) y viceversa^{156,157}.

El Ψ_m se relaciona con el consumo de cationes fluorescentes por la ecuación de Nerst, $\Psi = -59 \log(F_{in}/F_{out})$, donde Ψ es el potencial eléctrico en milivoltios, F_{in} es la concentración del fluoróforo catiónico en cualquier punto de la célula y F_{out} es la concentración del fluoróforo catiónico en el espacio extracelular. Mediante el uso de microscopía confocal se puede cuantificar la distribución intracelular. A partir de la $\Delta\Psi$ entre compartimentos se puede determinar el $\Delta\Psi_m$.

El potencial de membrana mitocondrial se determinó en células *in vivo* con el método de tinción tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Se sembraron 5×10^4 células en una cámara de cubreobjetos de cuatro pocillos. A las 24h se les cambió el medio DMEM completo por medio DMEM sin glucosa, sin rojo fenol y suplementado con 1mM de piruvato de sodio como única fuente de carbono. Las células se incubaron durante una hora y a continuación se añadió 10nM TMRM en el mismo medio durante 20min. Acto seguido las células se incubaron en la cámara de incubación y se procedió a la captura de imágenes utilizando el microscopio de célula viva (Zeiss *Cell Observer*) equipado con un módulo de incubación de CO₂ (Module S), un módulo de temperatura (TempModule S) y una unidad Heating Unit XL S; con el objetivo de 20X. Finalmente y para comprobar que toda la fluorescencia captada era efecto del TMRM y como consecuencia del $\Delta\Psi_m$, se despolarizó la mitocondria añadiendo 3mM FCCP.

La cuantificación se realizó mediante el programa de análisis ImageJ¹⁵⁸.

4.2.5.4 Medición del contenido de ADN mitocondrial

El contenido de ADN mitocondrial nos indica si existe algún déficit en la maquinaria de transcripción mitocondrial que tendría como consecuencia un severo desequilibrio en la fosforilación oxidativa. Para determinar si existían diferencias en el ADNmt entre las células CTL y las células DISC1 KD se realizó un RT-PCR (del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Para ello se extrajo ARN de las ambas líneas utilizando el kit *e.Z.N.A Total RNA Kit I* (Omega Bio-Tek, Norcross, GA) según las instrucciones del fabricante. La RT-PCR se realizó usando el kit *SensiFAST SYBR No-ROX One-Step Kit* (Bioline USA, Taunton, MA) y el equipo fue el *CFX96™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, Richmond, CA). El ARN se retrotranscribió a 45°C durante 10min. y posteriormente el ADNc (ADN copia, cadena de ADN que contiene la secuencia complementaria al ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado) se desnaturalizó a 95°C 2min. seguido de 40 ciclos de 95°C 10"; 60°C 30" y 72°C 30".

Se amplificaron el ARN ribosomal mitocondrial 12S según Podlesniy P. *et al.*, 2013¹⁵⁹ y GAPDH, como normalizador, con los oligos 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' y 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'. Los valores se normalizaron también con respecto a las células CTL. Se realizaron 3 experimentos independientes para su representación.

4.2.5.5 Análisis estadístico de la fosforilación oxidativa

Los datos se expresan en medias \pm SD. Las comparaciones entre los grupos experimentales se han llevado a cabo mediante una prueba t de Student no paramétrica. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$. Se utilizó el programa informático de estadística SPSS.

4.2.6 Estudios de diferenciación de las células SH-SY5Y: Contaje de neuritas

4.2.6.1 Diferenciación de células de neuroblastoma humano

Las células SH-SY5Y tienen la capacidad de diferenciarse en respuesta a ciertos estímulos, como pueden ser la inclusión en el medio de cultivo de AR seguido de BDNF o la privación de FBS. Para estudiar la diferenciación de las células SH-SY5Y, 2×10^4 células se sembraron en placas de 24 pocillos (6 pocillos línea CTL y 6 pocillos línea DISC1 KD) con cubreobjetos en medio DMEM completo. A las 48h se realizó un lavado con PBS y se cambió el medio de cultivo por medio DMEM completo sin rojo fenol suplementado con FBS tratado con Charcoal (HyClone Thermo Scientific), penicilina/estreptomicina al 1%, antimicótico al 1%, piruvato de sodio al 1% y $10 \mu\text{M}$ de AR (Sigma-Aldrich). A las 24h se realizó otro lavado con PBS y la mitad se incubaron tres días sin suero para inducir su diferenciación. El resto, se trataron con 100 ng/ml de BDNF durante 4 días para inducir

también su diferenciación. Posteriormente se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia tal y como se describe en el apartado 4.2.3.10.

Los anticuerpos utilizados fueron:

Antc. primario	cc/casa comercial	Antc. secundario	cc/casa comercial
Mic60/mitofilina (MM)*	1/500. Abcam	Cy3.Conejo	1:500/ Jackson
α-tubulina	1/200. Abcam	Alexa 647. Ratón	1:500/ Jackson

*MM=Marcador mitocondrial

La captura de las imágenes se realizó con el microscopio confocal LSM710 utilizando cuatro canales: DAPI, GFP (para las células DISC1 KD), Cy3 y Alexa 647 con el objetivo de 40X.

4.2.6.2 Cuantificación de la diferenciación y neuritogénesis

Para la medición de las neuritas se utilizaron las imágenes obtenidas por microscopía y el programa de análisis *ImageJ, Simple Neurite Tracer*. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 100 células de cada línea y se contaron las células que se habían diferenciado en cada caso (con núcleo polarizado y con proyecciones). A continuación se midieron las proyecciones únicamente de las que eran mayores de dos cuerpos neuronales y se registraron. Se midieron tanto la longitud del núcleo como la de las proyecciones. Los cálculos se realizaron restando a las proyecciones el diámetro del núcleo de la célula a la cual pertenecía, se sumaron en el conjunto y se dividió por el número de células diferenciadas (con o sin proyecciones).

4.2.6.3 Análisis estadístico de la neuritogénesis

El análisis estadístico de los datos obtenidos en la cuantificación de la neuritogénesis se realizó con el programa *Statgraphics Centurion XVI* versión 16.2. Para calcular las diferencias entre células no diferenciadas vs diferenciadas se realizó una comparación de proporciones, que consistió en comparar el porcentaje de diferenciación entre células CTL y células DISC1 KD. Con este análisis se comprueba que las muestras presentan baja similitud ($p < 0,001$) confirmando la hipótesis o en caso contrario, rechazándola. Por otro lado, para determinar la significancia de las diferencias obtenidas en las mediciones de la longitud de las proyecciones, se llevó a cabo un análisis Mann-Whitney para muestras independientes no paramétricas. Se utilizó este análisis porque los valores de longitud de neuritas no seguían una distribución normal. Por ello, se obtuvieron las medianas y se comprobó si existía baja similitud ($p < 0,001$) entre las células CTL y las células DISC1 KD y confirmando o rechazando la hipótesis.

5. Resultados

5.1 SNP-Array. Análisis de las variaciones en el número de copia (CNVs)

Se analizaron 112 pacientes, 85 de los cuales presentaron CNVs no patológicos sin genes implicados o con una frecuencia >1% en la población; y 27 eran portadores de CNVs poco frecuentes no descritos, susceptibles de contener genes asociados con la patología de estudio. Entre todos los pacientes, se encontraron un total de 32 alteraciones (22 duplicaciones y 10 deleciones) que afectaban a 109 genes, así pues, había individuos con más de un CNV (Tabla 5.1).

Paciente	Alteración	Región cromosómica	Genes contenidos en los INDELS
1	Del	1p21,1	COL11A1
2	Del	10q11,23	ASAH2B; A1CF; PRKG1
3	Dupl/Dupl	11q22,1 8q24,2	FLJ32810; MIR548G; TMEM133; PGR; ZFAT; MIR30B
4	Dupl	13q12,11	MPHOSPH8; PSPC1; ZMYM5
5	Dupl	14q13,2	SRP54; FAM177A1; PPP2R3C; KIAA0391; PSMA6
6	Dupl/Dupl	2q32.3 15q11.2	MKRN3; MAGEL2; NDN; STAT1; STAT4; MYO1B
7	Dupl	15q26.1	CHD2; RGMA
8	Del	15q26,3	IGF1R
9	Dupl/Dupl	15q25,3 15q26,1	AKAP13; GABARAPL3; ZNF774; IQGAP1
10	Dupl	17p13,1	MYH13; GAS7
11	Dupl/Del	17p13,2 7p13	NLRP1; TBRG4; SNORA5A; SNORA5C; SNORA5B; RAMP3
12	Dupl	18q12,1	MCART2; TRAPPC8; RNF125; RNF138
13	Del	19p13	PIGU; TP53INP2; NCOA6
14	Del/Del	2p21 7q33	PRKCE; EPAS1; LOC388946; ATP6V1E2; RHOQ; PIGF; CRIPT; SOCS5; LOC100134259; MCFD2; TTC7A; C2orf61; CALM2; C7orf49; WDR91; STRA8; CNOT4; NUP205; PL-5283; SLC13A4;
15	Dupl	21q22.3	PCNT; DIP2A; S100B; PRMT2
16	Dupl	3p26	GRM7
17	Dupl	4q24	TBCK
18	Dupl	4q26	NDST3; SNHG8; SNORA24; PRSS12; CEP170L
19	Del	5q23.1	DTWD2
20	Dupl	6q27	THBS2
21	Dupl	6p21	MUC21
22	Dupl	6q14	ELOVL4; TTK; BCKDHB
23	Dupl	7q31.1	IMMP2L; DOCK4
24	Dupl	7q33	GRM8; MIR592; ZNF800
25	Del	8q22	DKFZp779L1068; FAM92A1; RBM12B; C8orf39; TMEM67; PPM2C; PDP1; CDH17; GEM; RAD54B; KIAA1429; RBM35A; DPY19L4; INTS8; CCNE2; TP53INP1; C8orf38; PLEKHF2; C8orf37
26	Dupl	Xq26.3	DDX26B
27	Del	Xp21,1	DMD

Fig. 5.1. Descripción de pacientes analizados mediante CNVs. Se señala el número de paciente, tipo de alteración (Dupl: Duplicación; Del: Delección), región cromosómica afectada y genes contenidos en las regiones afectadas.

Conocidos los genes contenidos en los indels, se llevaron a cabo distintas aproximaciones bioinformáticas para conocer su potencial implicación en la etiología de las CC: análisis de priorización, análisis de vías y comparativa bibliográfica.

En primer lugar, se realizó un análisis de priorización mediante dos softwares, *Endeavour* y *Toppgene*. Estos programas permiten realizar comparativas entre los posibles genes candidatos y genes de referencia o *training genes* seleccionados por el usuario y descritos anteriormente por su relación con la patología de estudio (ver apartado 4.1.1.2 A). Para el análisis de priorización se llevaron a cabo dos estrategias. En primer lugar, se hizo el análisis con el total de los genes identificados en los indels de los 27 pacientes estudiados, 109 genes (identificado como “TOTAL” en la tabla 5.2). En segundo lugar, se diferenció aquellos pacientes que tenían únicamente un gen afectado por el indel (n=9), de los que tenían más de uno (n=18). En los primeros, los genes encontrados ya fueron considerados potenciales genes candidatos a causar la enfermedad. En el segundo caso, se realizó el análisis de priorización individual para cada uno de los pacientes. Los genes situados en la primera posición en el análisis de priorización comunes a ambos programas, fueron también considerados potenciales genes candidatos (Tabla 5.2).

Paciente	Priorización	
	Endeavour	Toppgene
TOTAL	IGFR1	IGFR1
2	PRKG1	PRKG1
3	PGR	PGR
4	MPHOSPH8	MPHOSPH8
5	PSMA6	PSMA6
6	STAT1	STAT1
7	CHD2	CHD2
9	IQGAP1	IQGAP1
10	GAS7	MYH13
11	RAMP3	NLRP1
12	TRAPPC8	RNF138
13	NCOA6	NCOA6
14	EPAS1	EPAS1
15	S100B	S100B
18	PRSS12	PRSS12
22	ELOVL4	ELOVL4
23	DOCK4	DOCK4
24	MIR592	GRM8
25	PPM2C	TMEM67

Tabla 5.2. Resultados del análisis de priorización. Se muestran los genes localizados en primera posición en el análisis de priorización según los programas *Endeavour* y *Toppgene*, en el total de los pacientes, “TOTAL”, y en aquellos con más de un gen afectado por el indel.

Con todos los genes candidatos obtenidos a partir del análisis de priorización, comunes a ambos programas, se realizó un análisis de vías celulares o metabólicas mediante el software IPA (descrito en el apartado 4.1.1.2.B), con el objetivo de comprobar si

pertenecían a la misma vía o a vías relacionadas. Se encontraron 5 interacciones entre 6 genes (Fig. 5.1). Este mismo método se aplicó a los 109 genes contenidos en las regiones alteradas de los 27 pacientes totales. Se encontraron un total de 20 interacciones entre 18 genes (Fig. 5.2).

En la primera aproximación, se observa como el mayor número de interacciones son con el gen PGR o receptor de progesterona. El gen PGR actúa principalmente en el proceso de ovulación donde interacciona con EPAS1, gen que se expresa en condiciones de hipoxia. El déficit en esta interacción puede crear problemas de fertilidad¹⁶⁰. PGR participa también en otros procesos biológicos. Es un gen diana de ER- α , receptor de estrógenos α , involucrado en distintas vías de señalización celular¹⁶¹. IQGAP1 tiene la capacidad de modular la transcripción tanto de ER- α como de PGR¹⁶² y además se une a S100B, que participa en la remodelación de la membrana celular¹⁶³. PGR modula también la expresión de STAT1¹⁶⁴ o estatina 1. La vía de las estatinas Jak/STAT, es una vía de señalización que modula la expresión génica¹⁶⁵. Esta vía es igualmente activada por IGF1R, que también actúa sobre las vías Akt y ERK, otras dos vías de señalización¹⁶⁶. En la segunda aproximación, aparece además otra vía importante, la de las calmodulinas. IQGAP1 interacciona con CALM1, que interviene en vías de señalización celular en presencia de Ca²⁺ y en la formación del citoesqueleto¹⁶³. PCNT se une también a CALM1 a nivel de centrosoma para la formación de microtúbulos¹⁶⁷.

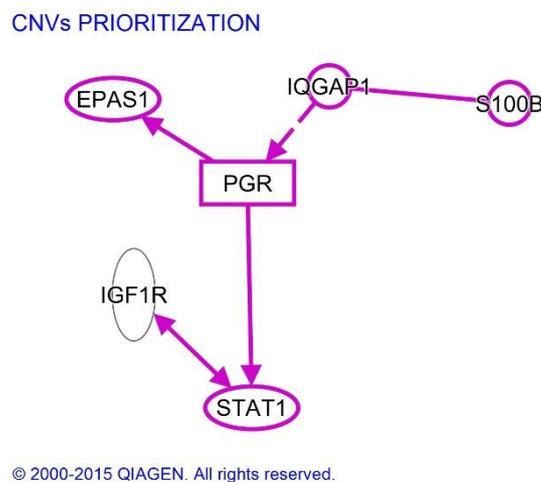
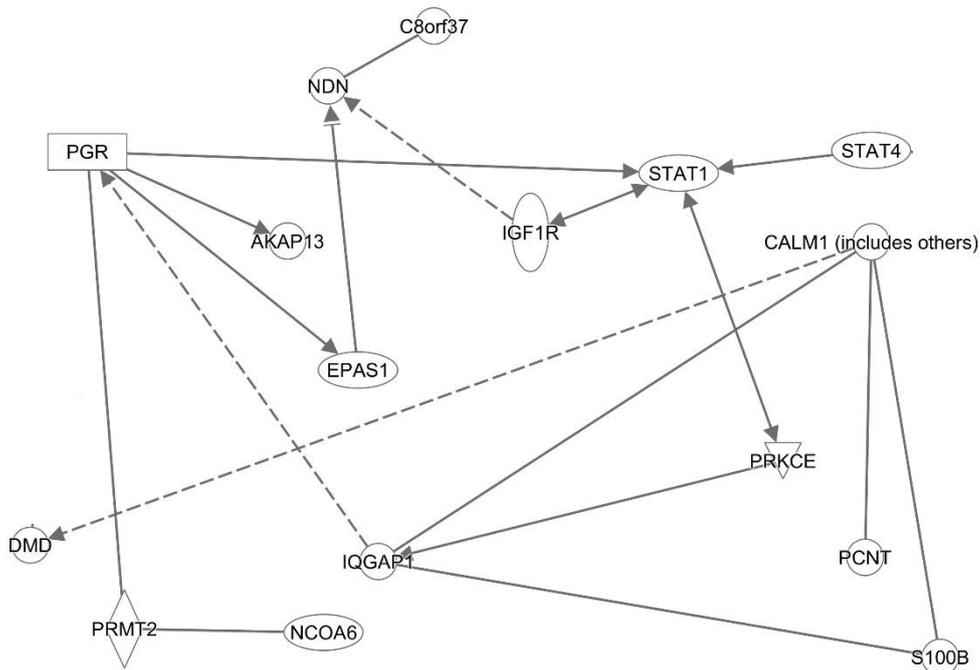


Fig. 5.1. Mapa de interacciones entre genes priorizados y genes contenidos en regiones con un solo gen afectado. Análisis de interacciones mediante el programa IPA. Muestra únicamente los genes que presentan interacciones y sus relaciones directas.



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Fig. 5.2. Mapa de interacciones entre todos los genes contenidos en las alteraciones de los pacientes con CNVs poco frecuentes. Análisis de interacciones mediante el programa IPA. Muestra únicamente los genes que presentan interacciones y sus relaciones directas.

En último lugar y bajo la premisa de que otros estudios hubieran identificado los mismos genes que los encontrados por nuestro grupo, pudiendo así dar una mayor significancia a nuestros resultados, se realizó una revisión bibliográfica de los últimos 10 años. Se encontraron un total de 21 artículos en los que se relacionaba de igual modo CC y CNVs (ver apartado 4.1.1.2, tabla 4.1). A partir de los genes descritos en estas publicaciones se llevó a cabo una comparativa obteniendo un total de 21 genes comunes a los encontrados en el total de nuestros pacientes, adquiriendo una mayor importancia como potenciales genes candidatos en la enfermedad de estudio. Éstos fueron los siguientes: OPCML¹⁶⁸; IGF1R (Connor J. Thesis, 2011); NUP205, THBS2, CNOT4, PRKCE, DDX52, ZNHIT3, MYO19, PIGW, GGNBP2, DHRS11, MRM1, LHX1, AATF, ACACA, C17orf78, TADA2A, DUSP14, SYNRG, HNF1B¹⁶⁹.

Para una mejor aproximación se realizó una nueva comparativa entre los 21 genes compartidos en la bibliografía y nuestros resultados, con los genes obtenidos en el análisis de priorización de ambos programas, *Endeavour* y *Toppgene*, localizados en primera posición (Tabla 5.2). Así pues, se identificaron 4 genes comunes al análisis de priorización y la comparativa bibliográfica: IGF1R, THBS2, PRKCE y HNF1B, potenciales genes candidatos a causar CC.

El gen **IGF1R** (por sus siglas en inglés, *insulin-like growth factor 1 receptor*) codifica para un receptor tirosina quinasa de membrana plasmática celular que se activa mediante la unión de la hormona factor de crecimiento 1 o 2 parecido a insulina (IGF-1, IGF-2) de manera autocrina y paracrina. La vía de las IGFs, regula la proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia celular¹⁷⁰.

El gen **THBS2** codifica para la proteína trombospondina 2, perteneciente a la familia TSPs identificadas como reguladores de la angiogénesis. Tienen un papel en las uniones célula-célula, célula-matriz e interacciona con proteasas, factores de crecimiento y otras biomoléculas¹⁷¹.

El gen **PRKCE** codifica para la Proteína Kinasa C tipo épsilon e interviene en el ciclo celular, en las fases G0/G1 y G2 de células T. Activa el ciclo a través de la regulación de ciclinas, ciclinas dependientes de quinasas (cdk), inhibidores de cdk y fosfatasa cdc25; todas ellas proteínas involucradas en el ciclo celular (¹⁷²).

El gen **HNF1B**, codifica para el factor nuclear hepatocítico 1β. Actúa en el desarrollo de las nefronas y regula el desarrollo embrionario del páncreas.

Debidos a sus funciones conocidas e interacciones con genes ya descritos asociados a CC, los genes IGFR1, PRKCE, THBS2 y HNF1B, son buenos genes candidatos a causar CC. En concreto, el gen IGFR1 es un buen candidato por su capacidad reguladora de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. De igual modo, PRKCE por su implicación en el ciclo celular. El gen THBS2 por su papel como regulador de la angiogénesis. Y el gen HNF1B por su implicación en el desarrollo.

5.2 SNP-Array - Análisis de ligamiento.

Con el objetivo de identificar loci de susceptibilidad a padecer CC, independientemente del tipo morfológico, en familias con elevada prevalencia, se optó por realizar un análisis de ligamiento, considerada una estrategia útil por realizar un mapeo directo complementado por métodos estadísticos de segregación. Para ello, se utilizaron los datos obtenidos del análisis de SNP-Array llevado a cabo a un conjunto de 6 familias con alta prevalencia de CC y sin causa conocida.

A partir de análisis de MOD Score se identificaron 2 regiones de ligamiento en los cromosomas 15 y 18. En el cromosoma 18, se identificó la región 18q21.2-18q21.3, con un tamaño de entre 51197-52023 Kb, con un total de 57 SNPs contenidos en dicha región, un valor de MOD Score de 3.9 y un Pempírico= 0,0005-0,0006 (Pempírico=Pvalue obtenido a partir de simulaciones).

En el cromosoma 15, la región que presentaba ligamiento con la enfermedad fue 15q26.3, con un tamaño de entre 99749-99883 Kb; con un total de 27 SNPs contenidos en dicha región, un valor de MOD Score de 3.5 y un Pempírico= 0.0004-0.0005.

Para corroborar los resultados del análisis de ligamiento se realizó un análisis de asociación basado en familias para estas 2 regiones y se obtuvo un MOD Score > 2.5 y

un Pvalue ≤ 0.01 , considerando un total de 304 SNPs en el cromosoma 18 y 211 en el cromosoma 15.

A partir de análisis de LOD Score se observó que todas las familias, excepto la familia 5 que sólo presenta asociación con el cromosoma 18, presentaban asociación con ambas regiones apoyando la hipótesis inicial de que existe una base genética común a las distintas CC.

Una vez descritas las regiones de ligamiento, se identificaron los genes contenidos en ellas. Se comprobó que la región del cromosoma 15 contenía 3 genes, SELS, SNRPA1 y PCSK6; y la región del cromosoma 18 un único gen, TCF4. Estos 4 genes son potenciales candidatos a causar CC.

El gen **SELS** codifica para una selenoproteína que contiene un residuo de selenocisteína en su centro activo. Se ha visto asociada a lipoproteínas de baja densidad por lo que podría tener un papel en el metabolismo lipídico¹⁷³. En pacientes con CC parece que el metabolismo lipídico podría estar alterado¹⁷⁴.

El gen **SNRPA1** codifica para una pequeña ribonucleoproteína tipo A o *snRPN*, por sus siglas en inglés *small nuclear ribonucleoprotein A*. La acción de *snRNPs* es esencial para eliminar los intrones del pre-ARNm¹⁷⁵. Las modificaciones post-transcripcionales son claves para la expresión y actividad de los factores de transcripción. La desregulación de éstos puede afectar al desarrollo del corazón¹⁷⁶.

El gen **PCSK6** codifica para una proteína de la familia *subtilisin-like proprotein convertase*. Procesan precursores de proteínas a proteínas activas, como la albúmina y el factor Willebrand¹⁷⁷. Además, PCSK9, otra proteína de la misma familia, codifica para una proteína que regula lipoproteínas de baja densidad, relacionados con las enfermedades coronarias¹⁷⁸.

El gen **TCF4** codifica para un factor de transcripción. Se expresa en fibroblastos de tejido conectivo. Éstos regulan 2 aspectos de la miogénesis, el desarrollo de la fibra muscular y la maduración¹⁷⁹.

5.3 EMG. Secuenciación masiva del exoma humano (WES). Análisis de secuencias.

El análisis de exomas de la familia 1 con elevada prevalencia en EMG se realizó a los miembros afectados II-4 (TBP), III-3, III-4 (SZ) y al miembro no afecto III-5 (ver apartado 4.1.3.1). Se identificaron 14 variantes genéticas poco frecuentes compartidas por los tres individuos afectados que no estaban presentes en la hermana sana. Dichas variantes estaban contenidas en los genes: UNC80, Gli2, CASQ1, HRNR, MACF1, TRIP12, RNF25, ZPLD1, ACTBL2, PPAP2A, FKBP9, OR11G2, MCTP2 y USP32 (Tabla 5.3). Posteriormente se realizó el estudio de segregación de dichas variantes en el resto de miembros de la familia mediante secuenciación por Sanger. Las variantes genéticas rs142126808 del gen UNC80, rs150330307 del gen CASQ1, rs61814932 del gen HRNR, 1:39914279 del gen MACF1, rs146468598 del gen ACTBL5, 5:54721089 del gen PPAP2 y rs149237812 del gen

MCTP2 segregan con los tres hermanos esquizoafectivos y la madre con trastorno bipolar, aunque únicamente las variantes 2:230723775 del gen TRIP12, rs138321594 del gen RNF25 y rs145497598 del gen ZPLD1, también segregan con la prima segunda afectada de depresión severa recurrente. Estas últimas variantes contenidas en los genes TRIP12, RNF25 y ZPLD1, los convierten en potenciales genes candidatos a causar EMG por segregar con todos los miembros afectados de la familia, por lo que han sido estudiados en detalle en esta tesis. Las primeras variantes contenidas en los genes UNC80, CASQ1, HRNR, MACF1, ACTBL5, PPAP2 y MCTP2, aunque no segregan con todos los miembros afectados, están presentes en los individuos con fenotipos más graves por lo que también pueden jugar un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad y deberán ser objeto de estudio en futuras aproximaciones.

Posición variante	rs ID	Genes	Cambio ADNc	Cambio proteico	PolyPhen (Class:score)
2:219528732	rs138321594	RNF25	c.1328G>A	p.(R443Q)	benign:0.223
3:102187900	rs145497598	ZPLD1	c.902A>G	p.(K301R)	benign:0.099
1:152185774	rs61814932	HNRN		2777S>SS	
2:121748118	rs138987487	GLI2	c.4628G>A	p.(R1543H)	probably-damaging:1.0
2:210658485	rs142126808	UNC80	c.840C>G	p.(I280M)	benign:0.011
1:160160801	rs150330307	CASQ1	c.260T>C	p.(M87T)	possibly-damaging:0.612
1:39914279	unknown	MACF1	c.13925C>G	p.(T4642S)	possibly-damaging:0.589
2:230723775	unknown	TRIP12		205S>LS	
14:20665640	rs140668031	OR11G2	c.146G>A	p.(G49D)	benign:0.044
15:94841610	rs149237812	MCTP2	c.116G>A	p.(R39Q)	benign:0.024
4:39450295	rs143809363	KLB	c.3124G>A	p.(V1042I)	benign:0.18
5:56777915	rs146468598	ACTBL2	c.620G>A	p.(R207Q)	possibly-damaging:0.461
7:33028165	rs150348129	FKBP9	c.940G>A	p.(V314M)	probably-damaging:1.0
X:100668164	rs147663358	HNRNPH2	c.1188G>C	p.(M396I)	benign:0.176
17: 58288421	unknown	USP32	E (GAA) --> K (AAA)	793E>EK	
5:54721089	unknown	PPAP2A		268T>IT	

Tabla 5.3. Descripción de variantes genéticas encontradas en la familia 1. Se muestra posición de la variante, número de identificación rs, gen afectado, cambio producido en el cDNA, cambio proteico, conservación y resultados de PolyPhen (predicción del efecto funcional de SNPs humanos).

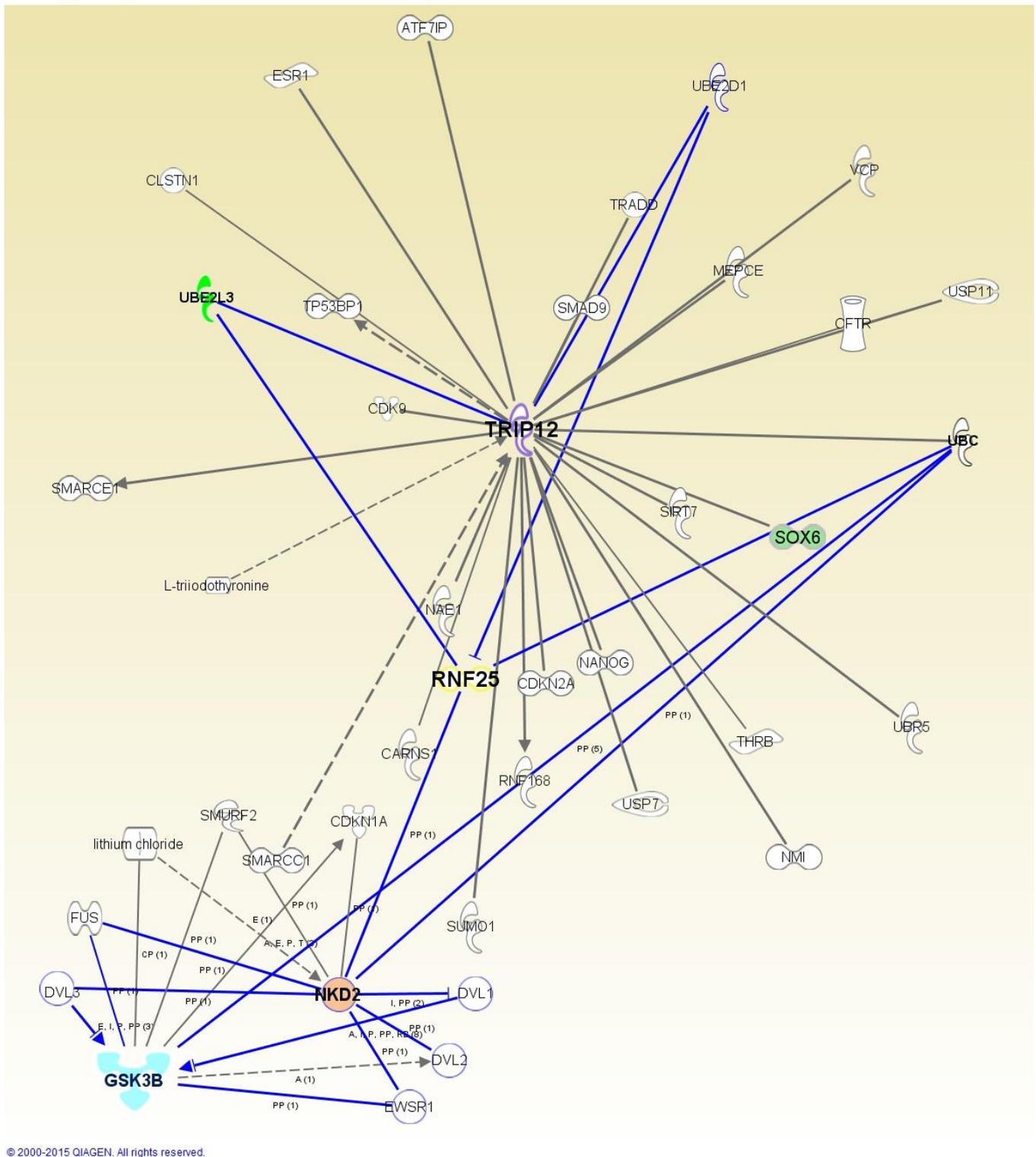
El gen **ZPLD1** (por sus siglas en inglés *Zone Pellucida-Like Domain containing 1*) codifica para una proteína contenida en la región de adhesión esperma-zona pelúcida. Además, actúa como receptor transmembrana de glucoproteínas¹⁸⁰. Sus funciones conocidas no sugieren que sea un buen candidato a causar EMG.

El gen **TRIP12** (por sus siglas en inglés, *Thyroid Receptor-Interacting Protein 12*) o ULF, codifica para una proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa. Una de sus funciones es actuar como supresor de RNF168, otra ubiquitina ligasa que actúa reparando daños en el ADN a nivel de cromatina¹⁸¹.

El gen **RNF25** (por sus siglas en inglés, *Ring Finger Protein 25*) o AO7, codifica para otra proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa. RNF25 ubiquitina a la proteína Naked2 y la activa durante un breve período de tiempo. Mientras está activa, Naked2 actúa como antagonista de la vía Wnt/ β -catenina¹⁸², promoviendo la diferenciación celular.

Tanto el gen TRIP12 como el gen RNF25 codifican para proteínas con actividad ubiquitina ligasa, encargadas de marcar aquellas proteínas que van a ser degradadas vía proteosoma. La desregulación del sistema ubiquitina-proteosoma puede provocar disfunción neuronal, desórdenes neurológicos y discapacidad intelectual¹⁸³. Esta implicación las hace especialmente interesantes en el proceso del neurodesarrollo y como consecuencia en la manifestación de las EMG. Además, ambas juegan un papel importante en vías de señalización imprescindibles en procesos de proliferación y supervivencia celular. Estas características, además de las ya citadas anteriormente, hacen que estos genes sean potenciales candidatos a causar EMG.

Con la finalidad de conocer una posible interacción entre estos genes mediante la participación en vías celulares o metabólicas comunes, se realizó un análisis de vías con el software IPA (ver apartado 4.1.1.2.B) observando que los genes TRIP12 y RNF25 presentaban una interacción indirecta a través de los genes UBE2D1, UBE2L3 y UBC. UBE2D1 y UBE2L3 codifican para una enzima E2 de conjugación de ubiquitina. UBE2D1 está implicada en el metabolismo del hierro en el cerebro¹⁸⁴ y UBE2L3 modula la activación de otra proteína, parkin, involucrada en la enfermedad de Parkinson¹⁸⁵. UBC presenta a su vez interacciones con Naked2 y la vía de GSK3 β . Naked2 también está regulado por RNF25 y participa de forma indirecta en la vía de GSK3 β a través de las proteínas DVL1, DVL2 y DVL3. Además se muestran interacciones del gen TRIP12 con Sox6 ya descritas (Fig. 5.3).



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Fig. 5.3. Mapa de interacciones entre TRIP12 y RNF25. Análisis de interacciones mediante el programa IPA. Muestra las relaciones directas e indirectas entre los genes TRIP12 y RNF25. Además se muestran todas las interacciones conocidas de manera independiente.

El análisis de exomas en la familia 2 con elevada prevalencia de EMG se realizó a los miembros afectados IV-1 (esquizofrénico deficitario), IV-20 (trastorno esquizoafectivo), IV-

29 (TBP) y IV-43 (SZ) (ver apartado 4.1.3.1). Se identificaron 5 variantes genéticas poco frecuentes compartidas por los 4 individuos afectados. Dichas variantes estaban contenidas en los genes SKA3, RBBP6, EVPL, HCAR3 y ARHGAP19 (Tabla 5.4). Posteriormente se realizó el estudio de segregación de dichas variantes en el resto de miembros de la familia mediante secuenciación por Sanger. El análisis mostró que la variante genética rs142126808 del gen HCAR era compartida por los miembros IV-1 y IV-43 aunque no segregaba con el resto de familiares afectados. Es posible que en este caso haya habido un error de lectura durante la secuenciación del exoma. Por otro lado, la variante rs150330307 del gen ARHGAP19 era compartida por todos los miembros afectados. Así pues, ARHGAP19 se considera un potencial gen candidato a causar EMG. El gen **ARHGAP19** codifica para una proteína involucrada en la regulación de las RhoGTPasas que participan en la reorganización del citoesqueleto, proliferación celular y diferenciación¹⁸⁶.

Posición variante	rs ID	Genes	Cambio ADNc	Cambio proteico	PolyPhen (Class:score)
10:99006061	rs145032100	ARHGAP19	c.934C>T	p.(H312Y)	benign:0.002
13:21729952		SKA3	Ins>TT		
16:24564880		RBBP6	Del>AT		
17:74017594	rs193119748	EVPL	c.966T>C	p.(C322C)	
12:123200334	rs116821988	HCAR3	c.951A>G	p.(I317M)	benign:0.002

Tabla 5.4. Descripción de variantes genéticas encontradas en la familia 2. Se muestra posición de la variante, número de identificación rs, gen afectado, cambio producido en el cDNA, cambio proteico, conservación y resultados de PolyPhen (predicción del efecto funcional de SNPs humanos).

5.4 Caracterización de la topología mitocondrial de la proteína DISC1

5.4.1 La forma mitocondrial de DISC1 se encuentra anclada a la membrana interna (MI) orientada hacia el espacio intermembrana (EIM)

James R. *et al.*, 2004 habían demostrado anteriormente la ubicuidad de DISC1 en líneas celulares estables (SH-SY5Y, U373 MG, HEK293) y su enriquecimiento en la mitocondria¹³⁴, pero su topología en el organelo continuaba siendo desconocida.

Primero, mediante subfraccionamiento celular de homogenado de cerebro de ratón adulto, confirmamos que la isoforma de DISC1 de 70kDa se localizaba mayoritariamente en la mitocondria. Mediante centrifugación diferencial se separaron las fracciones nucleares, mitocondriales y citosólicas, y se resolvieron por electroforesis en un gel SDS-PAGE, observando una banda de 70kDa con mayor expresión en la fracción mitocondrial, utilizando el anticuerpo contra el dominio N-ter de disc1 (Abbiotec) (Fig. 5.4.A).

Segundo, con la finalidad de determinar la topología mitocondrial de disc1 se realizó un ensayo de protección con proteinasa K. Se aislaron mitocondrias de cerebro de ratón (Fig. 5.5.D) y de células HEK293T transfectadas con la forma recombinante completa FL-

hDISC1-V5 y sus forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5, en el dominio C-terminal (Fig. 5.5.A-B) o la forma completa hDISC1 myc-FL-hDISC1 en el dominio N-terminal (Fig. 5.5.C) y se incubaron con concentraciones crecientes de proteinasa K (PK) en presencia o ausencia de Triton X-100. Investigamos la accesibilidad de la PK a proteínas seleccionadas de la ME, EIM, MI y MZ. En las mitocondrias aisladas de cerebro de ratón, disc1 detectada con un anticuerpo contra el dominio N-terminal (Abbiotec), mostró un patrón de digestión similar al de la proteína Mic60/mitofilina, situada en la MI y a Hsp60, marcador proteico de MZ (Fig. 5.5.D). El patrón de digestión de las formas recombinantes FL-hDISC1-V5 y myc-FL-hDISC1, detectadas con el anticuerpo contra el epítipo V5 y myc, respectivamente, se asociaba con la proteína de ME, VDAC y la proteína marcadora de EIM EndoG (Fig. 5.5.A,C). No se observaron diferencias importantes entre el patrón de digestión de PK de $\Delta 597$ -hDISC1-V5 (Fig. 5.5.B).

Y tercero, para discernir si la asociación de disc1 con la MI era directa o indirecta, se procedió al subfraccionamiento mitocondrial. A partir de mitocondria purificada de cerebro de ratón, se aislaron los mitoplastos mediante solubilización con 1,1mg de digitonina al 2% (Fig. 5.4.B), y mediante tratamiento con 0,1M de fosfatasa alcalina seguida de ultra-centrifugación se separaron las fracciones solubles de las fracciones de membrana (Fig. 5.4.C). La inmunoreactividad de disc1 en el aislamiento de mitoplastos estaba presente tanto en el sobrenadante (Sup) (EIM y ME) como en el pellet (mitoplastos), aunque en mayor cantidad en este último. En el tratamiento con fosfatasa alcalina también presentaba inmunoreactividad de disc1 tanto el sobrenadante (fracción soluble) como en el pellet (fracción de membranas), aunque en este caso presentaba una mayor cantidad en el sobrenadante.

Estos resultados sugerían que la proteína estaba asociada a la MI orientada hacia el EIM (Fig. 5.4.B-C).

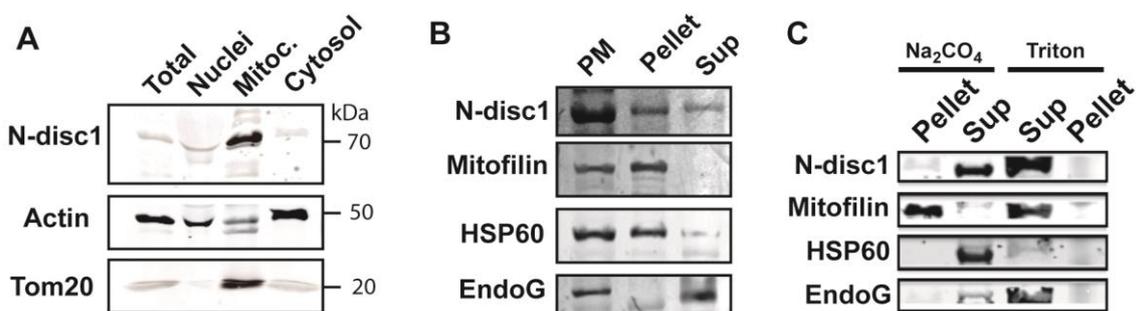


Fig. 5.4. Disc1 mitocondrial está asociada a la MI mirando al EIM. (A) El subfraccionamiento celular en cerebro de ratón seguido de una inmunotransferencia de las distintas fracciones muestra un enriquecimiento de disc1 en la mitocondria. (B) Aislamiento de mitoplastos a partir de mitocondria purificada de cerebro de ratón mediante solubilización con digitonina. (C) Rotura de membranas mediante tratamiento con fosfatasa alcalina. (B y C) La inmunoreacción de disc1 se localiza tanto en el pellet como en el sobrenadante (sup) sugiriendo que una parte de la proteína está asociada a la MI y otra parte está situada en el EIM.

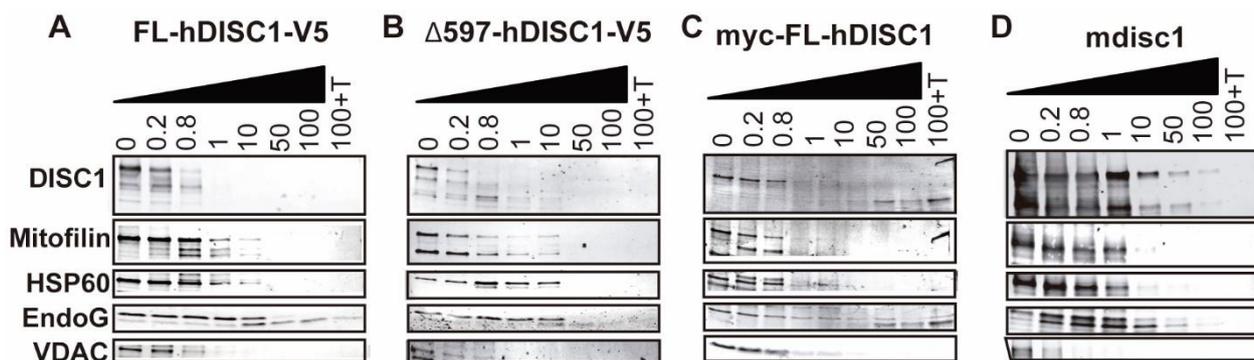


Fig. 5.5. Disc1 mitocondrial presenta un patrón de degradación proteica similar a Mic60/mitofilina. (A-D) Ensayo de protección de degradación proteica: Aislamiento de mitocondrias de cerebro de ratón (D) y de células HEK293T transfectadas con la forma recombinante hDISC1-V5 (A), la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5 (B) y la forma completa myc-hDISC1 (C), incubadas con concentraciones (cc) crecientes de proteinasa K, previo a la inmunotransferencia. La inmunoreactividad de DISC1 es dependiente de la cc de proteinasa K y presenta un patrón paralelo a la Mic60/mitofilina, proteína de la MI. Marcadores: VDAC, ME; ENDOG, EIM; Mic60/mitofilina, MMI; HSP60, MZ.

5.4.2 Asociación de DISC1 al complejo multiproteico MICOS (*Mitochondrial Contact Site and cristae Organizing System*)

Debido a que la proteína DISC1 no posee ningún dominio canónico transmembrana, supusimos que su asociación con la MI podía ser debida a su interacción física con la proteína transmembrana Mic60/mitofilina, tal y como previamente habían apuntado Park y colaboradores¹⁴⁶. Mic60/mitofilina es el componente central del complejo MICOS. En consecuencia, se decidió investigar si DISC1 mitocondrial se asociaba al complejo MICOS. Se solubilizó mitocondria aislada de cerebro de ratón con el detergente LM y los complejos proteicos mitocondriales se resolvieron por BN-PAGE (Fig. 5.6.A-B). Disc1 murina se detectó con el anticuerpo contra el dominio N-ter, que presentó inmunoreactividad en una banda de un tamaño aproximado de 700kDa, justo debajo del complejo I de OXPHOS. El complejo de disc1 se detectó en todos los tejidos analizados (cerebro, corazón e hígado) siendo más abundante en cerebro y corazón, y estando presente en menor cantidad en hígado (Fig. 5.6.A). El complejo que contenía la proteína disc1 también se detectó con los anticuerpos contra Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3, subunidades conocidas de MICOS (Fig. 5.6.B). Para verificar que disc1 era realmente un componente del complejo MICOS, se resolvieron las diferentes subunidades del gel nativo en un gel desnaturizante (2D-WB). Incubando secuencialmente con anticuerpos contra las subunidades de MICOS, se observó que la banda de disc1 alineaba con las subunidades conocidas Mic60/mitofilina, Mic19/CHCHD3 y Mic25/CHCHD6 (Fig. 5.6.C).

Con la finalidad de demostrar que la inmunoreactividad detectada tanto en el BN-PAGE como en la 2D-WB con el anticuerpo anti-Nter de disc1 era específica de disc1, decidimos investigar si la forma recombinante humana de DISC1 (hDISC1) también era

capaz de ensamblarse en el complejo MICOS. Para ello, se transfectaron células HEK293T con la forma completa FL-hDISC1-V5 y su forma aberrante $\Delta 597$ -hDISC1-V5, y la otra forma completa FL-myc-hDISC1. Se analizó el ensamblaje de hDISC1 recombinante en el complejo MICOS mediante BN-PAGE (Fig. 5.6.D) seguido de 2D-WB (Fig. 5.6.E). Tanto la forma myc-hDISC1 como hDISC1-V5 fueron capaces de ensamblarse a MICOS, en cambio, la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5 no muestra ensamblaje al complejo. El análisis mediante 2D-WB confirmó que la forma completa myc-hDISC1 alineaba con Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3, evidenciando que las tres proteínas están contenidas en el mismo complejo multiproteico (Fig. 5.6.E). Para confirmar la interacción entre DISC1-Mic60/mitofilina, se realizó una co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra V5 en células HEK293T que sobreexpresaban FL-hDISC1-V5 y las formas truncadas $\Delta 597$ -hDISC1-V5 y $\Delta 384$ -hDISC1-V5 conteniendo todos ellos el epítipo V5 en el dominio C-ter. Únicamente las células que expresaban hDISC1-FL-V5 fueron capaces de precipitar la forma endógena de Mic60/mitofilina (Fig. 5.6.F).

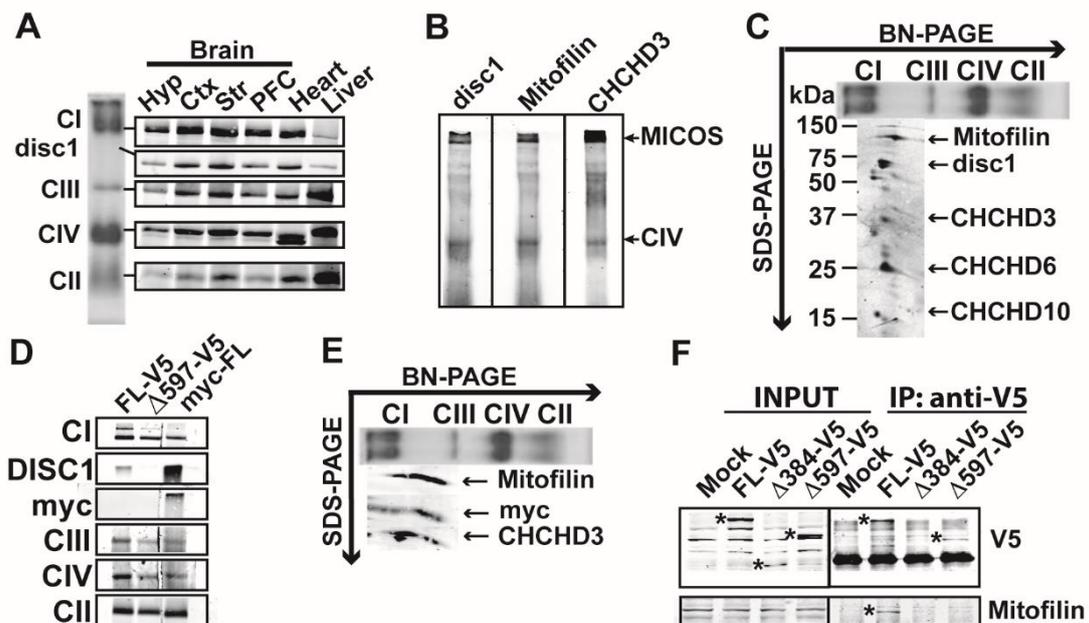


Fig. 5.6. DISC1 se asocia con Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3 en el complejo MICOS. (A) BN-PAGE de mitocondria aislada de cerebro de ratón (hipotálamo (Hyp), córtex (Ctx), estriado (Str) y córtex prefrontal (PFC)), corazón e hígado. La banda inmunoreactiva de disc1 se encontró asociada a un complejo de unos 700kDa. El complejo de disc1 está enriquecido en cerebro y corazón. (B) La migración de la banda inmunoreactiva de disc1 presenta el mismo peso molecular que Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3. Se cargaron 200 μ g de proteínas de mitocondria aislada de cerebro de ratón en 3 carriles diferentes y se hizo BN-PAGE. Se cortó la membrana y se incubó cada carril con el anticuerpo correspondiente. El CIV de OXPHOS se detectó con el anticuerpo contra la subunidad COX1. (C) La segunda dimensión del BN-PAGE mostró que disc1 se asociaba con Mic60/mitofilina, Mic19/CHCHD3, Mic25/CHCHD6 y CHCHD10 en el complejo MICOS. (D) La forma recombinante FL-hDISC1-V5 también se asocia con Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3 en el complejo MICOS. BN-PAGE de células HEK293 transfectadas con las formas myc-

hDISC1 (myc-FL), hDISC1-V5 (FL-V5) o la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5, mostrando que las formas completas de la proteína son capaces de ensamblarse en el complejo MICOS. Por el contrario, $\Delta 597$ -hDISC1-V5 no se ensambla en MICOS. (E) Segunda dimensión del BN-PAGE mostrando que la forma humana hDISC1-V5 se asocia con Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3 en el complejo MICOS. (F) Co-inmunoprecipitación de hDISC1-V5 con la proteína Mic60/mitofilina endógena en células HEK293T que sobreexpresan la forma completa hDISC1-V5 o sus formas truncadas $\Delta 597$ -hDISC1-V5 y $\Delta 384$ -hDISC1-V5. Únicamente la forma completa hDISC1-V5 inmunoprecipita con Mic60/mitofilina. Mock: Células transfectadas con el plásmido vacío.

Además de estudiar la interacción de las subunidades ya descritas de MICOS con DISC1, estudiamos también otras proteínas que se han visto asociadas con DISC1 o Mic60/mitofilina en la mitocondria, que también pudieran formar parte de MICOS, como es el caso de TRAK1 y Samm50. La proteína TRAK1 se asocia a DISC1 regulando el tráfico mitocondrial¹⁴⁷ (ver apartado 1.4.2). La proteína Samm50 interacciona con mitofilina y Mic19/CHCHD3 formando el complejo MIB, del inglés *Mitochondrial Intermembrane space Bridging*⁸⁹. Se comprobó si TRAK1 y Samm50 pertenecían también al complejo de DISC1 utilizando anticuerpos contra estas proteínas. Los resultados mostraron que ninguna de ellas alineaban con el complejo de disc1 (Fig. 5.7.A-B).

En paralelo a nuestros estudios, se publicó que mutaciones en otra proteína con dominio CHCHD, provocaba inestabilidad en el ADNmt y se asociaba a DFT¹⁸⁷. Esta proteína codifica para una proteína mitocondrial del EIM y está enriquecida en las CJs¹⁸⁷. Su localización y su fenotipo mutante sugerían que podía estar formando parte de MICOS y que las mutaciones encontradas en CHCHD10 podían estar afectando al complejo. Por este motivo, decidimos estudiar en cerebro de ratón, si CHCHD10 formaba parte del complejo MICOS mediante BN-PAGE seguida de 2D-WB observando que sí era otra subunidad del complejo (Fig. 5.6 C). Además, se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Paquis-Flucklinger del Instituto de Investigación en Cáncer y Envejecimiento (IRCAN) de Niza, Francia, gracias a la cual también pudimos evaluar la interacción entre las subunidades mediante la técnica de PLA (ver apartado 4.2.2.9) mostrando que CHCHD10 interaccionaba con CHCHD6 y mitofilina (Fig. 5.8 E). Estos resultados pudieron ampliarse analizando fibroblastos de 2 pacientes con DFT a los que se les había detectado mutaciones en CHCHD10. Así pues, comprobamos que en fibroblastos de pacientes con DFT, CHCHD10 también formaba parte del complejo MICOS junto con CHCHD3, CHCHD6 y mitofilina mediante BN-PAGE seguido de 2D-WB (Fig. 5.8 A). Además, se observó un desensamblaje parcial de MICOS en los fibroblastos de los pacientes vs controles y cambios en la expresión de sus subunidades. Los niveles de CHCHD10 y CHCHD3 estaban significativamente reducidos, mientras que CHCHD6 estaba aumentado (Fig. 5.8 B). Los análisis mediante BN-PAGE también revelaron deficiencias en el ensamblaje del CIV y de los supercomplejos III+IV y I+III₂+IV_n (Fig. 5.8 C) solubilizando con LM y digitonina, respectivamente. Estudios de IP, mostraron que existía interacción entre CHCHD10 y mitofilina también en fibroblastos de ambos pacientes (Fig. 5.8 D). Finalmente, en ensayo PLA mostró que existía menor interacción

entre CHCHD10, Mic25/CHCHD6 y Mic60/mitofilina en fibroblastos de pacientes vs controles (Fig. 5.8 E).

Estos resultados sugieren el posible papel de MICOS en la DFT que se podría trasladar a enfermos de EMG. Es por ello que se deberían estudiar con detalle mutaciones en DISC1 y la implicación de MICOS en pacientes con EMG.

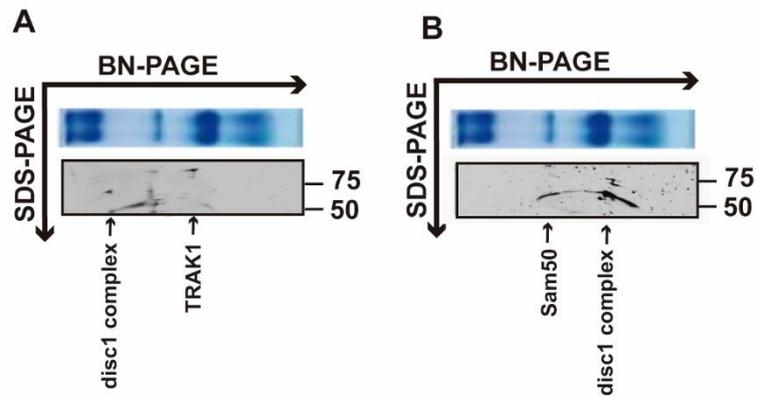


Fig. 5.7. Disc1 no se asocia con las proteínas TRAK1 y Samm50. La segunda dimensión del BN-PAGE mostró que disc1 no se asociaba con TRAK1 (A) ni Samm50 (B).

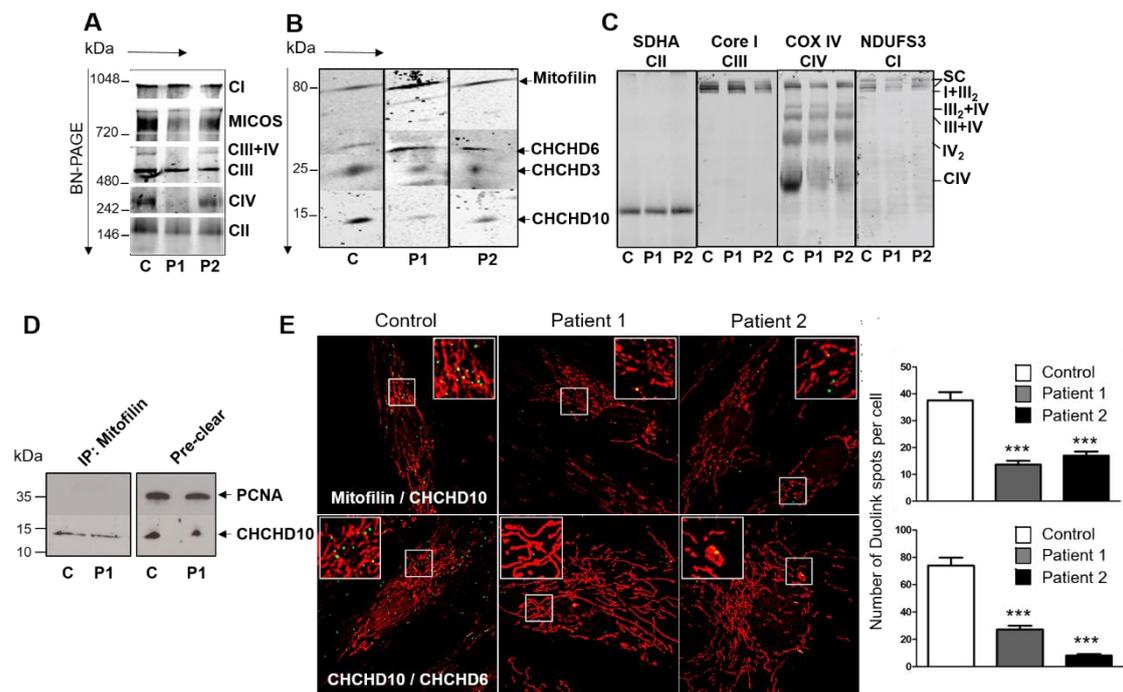


Fig. 5.8. El complejo MICOS se encuentra parcialmente desensamblado en fibroblastos de pacientes con mutaciones en CHCHD10. (A) BN-PAGE de los complejos MICOS y OXPHOS en fibroblastos control (C) y en pacientes (P1 y P2). Complejos I al IV de OXPHOS fueron detectados con los anticuerpos contra las subunidades de 39kDa de CI, 70kDa de CII, core I de CIII y citocromo c oxidasa de CIV. MICOS fue detectado con anti-mitofilina. (B) 2D-WB mostrando los niveles basales de las subunidades de MICOS. En los pacientes CHCHD10 se encuentra disminuida. (C) Análisis de los complejos de OXPHOS en fibroblastos controles y de pacientes. En los pacientes se ven alterados. SC: supercomplejo I+III₂+IV_n. (D) Co-inmunoprecipitación (IP) de mitofilina y CHCHD10 endógena en fibroblastos control (C) y de pacientes (P1). (E) Ensayo de proximidad DuoLink entre mitofilina y CHCHD10 (panel superior) y CHCHD10 y CHCHD6 (panel inferior) en fibroblastos controles y de pacientes, mediante microscopía confocal. Mitocondria marcada con Mitotracker. Los puntos del DuoLink se cuantificaron al azar en 30 células por paciente en 2 experimentos independientes. Las diferencias fueron analizadas por el tes t-Student: muy significativo (***:p<0,001).

5.4.3 El silenciamiento de DISC1 afecta al ensamblaje del complejo MICOS.

Para caracterizar la función de DISC1 en el complejo MICOS, se generó una línea estable en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y reduciendo la expresión de DISC1 mediante la infección con partículas lentivirales que contenían shRNA específico contra hDISC1 (células DISC1 KD). El constructo lentiviral contenía además del shRNA resistencia al antibiótico puomicina. Para el crecimiento de las células infectadas se utilizó un medio de cultivo suplementado con puomicina y 15 días post-infección, se seleccionaron los clones de acuerdo a los niveles de expresión de DISC1, medidos mediante WB.

La expresión de DISC1 en el clon seleccionado estaba severamente disminuida (13%±6), comparado con las células CTL infectadas con el *scrambled* shRNA, es decir un shRNA sin diana conocida en el genoma humano (Fig. 5.9.A-B). Posteriormente, se analizó el

ensamblaje del complejo MICOS en las células DISC1 KD mediante BN-PAGE. Como puede observarse en la Fig. 5.9.D, la reducción de DISC1 provoca desensamblaje parcial del complejo DISC1/MICOS en células SH-SY5Y DISC1 KD. En la 2D-WB se demostró que los niveles basales de DISC1 ensamblado al complejo estaban severamente reducidos. Esta reducción afectaba también a los niveles de la proteína Mic19/CHCHD3 pero no los de Mic60/mitofilina, que no mostraban diferencias significativas entre las células CTL y las células DISC1 KD (Fig. 5.9.E). Por el contrario, los niveles basales de las proteínas de los complejos MICOS, analizados mediante WB, mostraron que las células DISC1 KD tienden a compensar la pérdida de DISC1 sobreexpresando las subunidades de MICOS, Mic60/Mitofilin, Mic19/CHCHD3 o CHCHD10 (Fig. 5.9.C).

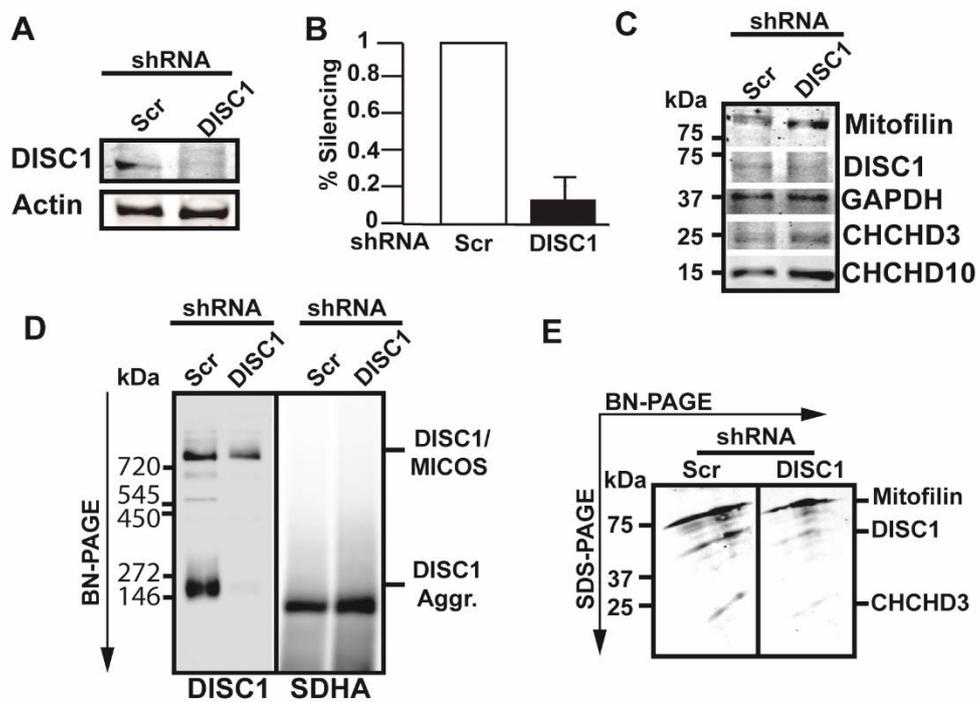


Fig. 5.9. El silenciamiento de DISC1 provoca un desensamblaje parcial del complejo MICOS. (A) WB mostrando los niveles de expresión de DISC1 en la línea estable SH-SY5Y expresando el shRNA contra DISC1. (B) Eficiencia del silenciamiento de DISC1, medida a partir de 3 experimentos independientes de WB, muestra que la línea estable SH-SY5Y DISC1 KD expresa únicamente el $13 \pm 6\%$ de DISC1, comparado con las células control que expresan scrambled (Scr) shRNA. (D) BN-PAGE de SH-SY5Y DISC1 KD estables donde se evidencia un desensamblaje parcial del complejo DISC1/MICOS y un desensamblaje completo de un complejo de unos 230kDa de naturaleza desconocida. Se utilizó como control de carga el anticuerpo contra la subunidad de 70kDa del CII de OXPHOS. (E) Segunda dimensión del BN-PAGE que muestra una drástica reducción del ensamblaje de DISC1 y Mic19/CHCHD3 en su estado basal. Los niveles basales de Mic60/mitofilina no se ven afectados, sugiriendo que DISC1 y Mic19/CHCHD3 son proteínas más periféricas del complejo. (C) Análisis de WB que evidencia que las células SH-SY5Y DISC1 KD presentan sobreexpresión de las subunidades MICOS Mic60/mitofilina, Mic19/CHCHD3 y CHCHD10.

5.4.4 Las células DISC1 KD presentan déficit funcional del sistema OXPHOS.

Además de estudiar el ensamblaje del complejo MICOS, también se analizó el ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS debido a que se ha descrito una estrecha interrelación entre MICOS y OXPHOS. La inestabilidad de MICOS provoca defectos en el sistema de fosforilación oxidativa causadas por una desregulación de la transcripción del ADNmt¹⁸⁸. Por lo que respecta al ensamblaje de los complejos individualizados de OXPHOS, el complejo I estaba disminuido en las células DISC1 KD, pero por el contrario el supercomplejo CI+III₂ estaba aumentado, pudiendo ser un efecto compensatorio por sobreexpresión del CIII en respuesta a la disminución del CI. El CIV también estaba ligeramente disminuido en las células DISC1 KD. Respecto al ensamblaje de los supercomplejos, las células DISC1 KD evidenciaron un sensible desensamblaje de los supercomplejos CI+III₂+IV_n (Fig. 5.10.C).

Alteraciones en el complejo MICOS se han asociado con déficits en la biogénesis mitocondrial y en la inestabilidad del ADNmt¹⁸⁸. En vistas de los resultados obtenidos en los estudios de ensamblaje del sistema OXPHOS en las células DISC1 KD, se investigó cómo afectaba el déficit de DISC1 a los niveles de ADNmt y a los niveles basales de las proteínas de OXPHOS. Las células DISC1 KD tenían una reducción del 20%±6,8 (p-value=0,0264) en contenido de ADNmt (Fig. 5.10.A). Este hecho correlacionaba con niveles de expresión reducidos de polipéptidos codificados por el ADNmt, como la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (COX1). Pero paradójicamente también las subunidades codificadas por el ADNn como son las subunidades NDUFA9 del CI, UQCRC2 del CIII y SDHA del CII (Fig. 5.10.B) estaban disminuidas en las células DISC1 KD. Como consecuencia, el ensamblaje de los complejos IV y I de OXPHOS se ven severamente afectados en las células DISC1 KD (Fig. 5.10.C).

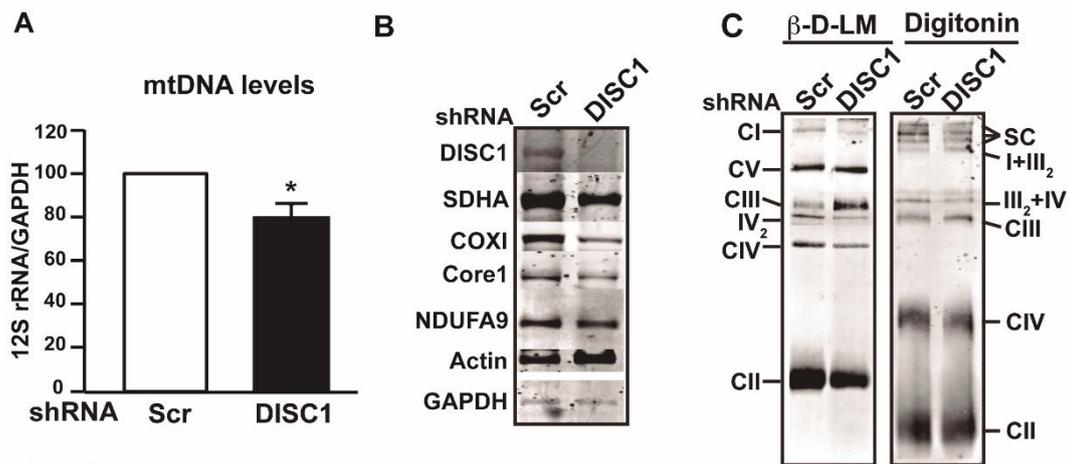


Figure 5

Fig. 5.10. La reducción de DISC1 afecta a la traducción de subunidades del sistema OXPHOS y a la formación de los supercomplejos respiratorios. (A) Niveles de transcripción del ADNmt. PCR a tiempo real del transcrito 12S ARNr a partir de células estables SH-SY5Y que expresan el *scrambled* shRNA (Scr) o hDISC1 shRNA (DISC1). Datos expresados relativos a GAPDH de 3 experimentos independientes \pm SD. (B) Las células SH-SY5Y DISC1 KD presentaban reducción de subunidades OXPHOS codificadas tanto por el

ADNn como por el ADNmt, evidenciado por WB. (C) Las células SH-SY5Y DISC1 KD presentaron un desensamblaje parcial de los complejos y supercomplejos de OXPHOS. BN-PAGE de complejos y supercomplejos de OXPHOS. El complejo I fue detectado con la subunidad de 39kDa NDUFA9, el CII con la subunidad de 70kDa SDHA, el CIII con la subunidad core I, el CIV con la subunidad COXI y el CV con la subunidad β .

A continuación comprobamos si las anomalías estructurales en OXPHOS se traducían en una disfunción bioenergética en las células DISC1 KD.

En primer lugar, se comparó el ratio de crecimiento celular entre células DISC1 CTL y DISC1 KD cultivadas en medio de cultivo suplementado bien con glucosa o con galactosa como fuente de carbono. No se observaron diferencias entre las células DISC1 CTL y las DISC1 KD en medio enriquecido con glucosa. En cambio, con medio enriquecido con galactosa, donde las células dependen principalmente de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP^{189,190}, la tasa de replicación de las células DISC1 KD se ve severamente reducida (Fig. 5.11.A), sugiriendo que dichas células presentaban problemas en la producción de energía mitocondrial. Para caracterizar la función de OXPHOS, se midió la síntesis de ATP mitocondrial en células SH-SY5Y DISC1 CTL y DISC1 KD, permeabilizadas con digitonina y usando malato y piruvato como sustratos generadores de poder reductor en forma de NADPH para el CI. Las células DISC1 KD mostraron una disminución del 48% en la producción de ATP comparado con las células CTL (Fig. 5.11.B). Debido a que la actividad de la ATP sintasa está acoplada a la transferencia de electrones y la translocación de protones, la síntesis de ATP refleja directamente la eficiencia de la cadena respiratoria. En consecuencia, las diferencias observadas en la síntesis de ATP podrían depender de cambios en la función de la cadena respiratoria *upstream* a la ATP sintasa. Es por ello que se midió la respiración mitocondrial en células SH-SY5Y intactas (CTL y DISC1 KD) utilizando piruvato como sustrato y, tal y como se esperaba, los resultados correlacionaron con los obtenidos en la síntesis de ATP. La respiración acoplada en las células DISC1 KD se vio reducida en un 51% en comparación a las células CTL (Fig. 5.11.C). Para cuantificar la capacidad respiratoria máxima, independiente de la ATP sintasa, las células fueron incubadas con 1 μ M del agente desacoplante FCCP. La respiración desacoplada estaba severamente disminuida en las células DISC1 KD (57% en comparación con las células CTL), evidenciando el déficit severo en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria causado por la pérdida de DISC1 (Fig. 5.11.C). Al observar esta deficiencia en la respiración y considerando el desensamblaje parcial del CIV observado en las células DISC1 KD, determinamos si el déficit en el consumo de oxígeno era debido a un déficit específico de la actividad citocromo c oxidasa. Para ello, medimos el consumo de oxígeno dependiente exclusivamente del CIV, inhibiendo el transporte de electrones a nivel de complejo III con antimicina A y aportando directamente los electrones al complejo IV con TMPD, en presencia del ascorbato, que actúa como agente reductor. Al contrario de lo esperado, los resultados mostraron un aumento en la actividad de la citocromo c oxidasa (Fig. 5.12), sugiriendo que la enzima intenta compensar el déficit

bioenergético, que posiblemente es generalizado, como consecuencia del desensamblaje de los supercomplejos, tal y como hemos observado en las células DISC1 KD (Fig. 5.10).

Para finalizar la caracterización de la función de OXPHOS, se midió el $\Delta\Psi_m$ mediante tinción con TMRM seguido por microscopía de célula viva. TMRM es un colorante fluorescente catiónico que es incorporado en la mitocondria dependiendo de su $\Delta\Psi_m$. Las células DISC1 KD mostraron una disminución en la capacidad de captación del colorante en referencia a las células CTL. Para demostrar que los resultados bioenergéticos obtenidos eran debidos exclusivamente al déficit de hDISC1, se decidió hacer un experimento de rescate, intentando suplir el déficit bioenergético de las células DISC1 KD, sobreexpresando tanto la variante completa (FL) como la variante aberrante de la familia escocesa ($\Delta 597$). Para ello se transfectaron las células SH-SY5Y DISC1 KD bien con el plásmido pDEST40 que contiene el gen completo hDISC1-V5 o con el que contiene la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5. A las 24h post-transfección se realizó el análisis del $\Delta\Psi_m$ mediante tinción con TMRM, observando que las células DISC1 KD que sobreexpresaban hDISC1-V5 eran capaces de revertir parcialmente su déficit en el $\Delta\Psi_m$, en cambio, las células DISC1 KD que sobreexpresaban la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5 no podían suplir el déficit en el $\Delta\Psi_m$ (p-value= Scr/DISC1=1,025x10⁻³; DISC1/WT+ hDISC1-V5=1,2x10⁻³; DISC1/WT+ $\Delta 597$ -hDISC1-V5=1,2x10⁻³; Fig. 5.11.D), sugiriendo que parte de los efectos deletéreos de la forma aberrante identificada en la familia escocesa vienen mediados por la función de DISC1/MICOS sobre el sistema OXPHOS.

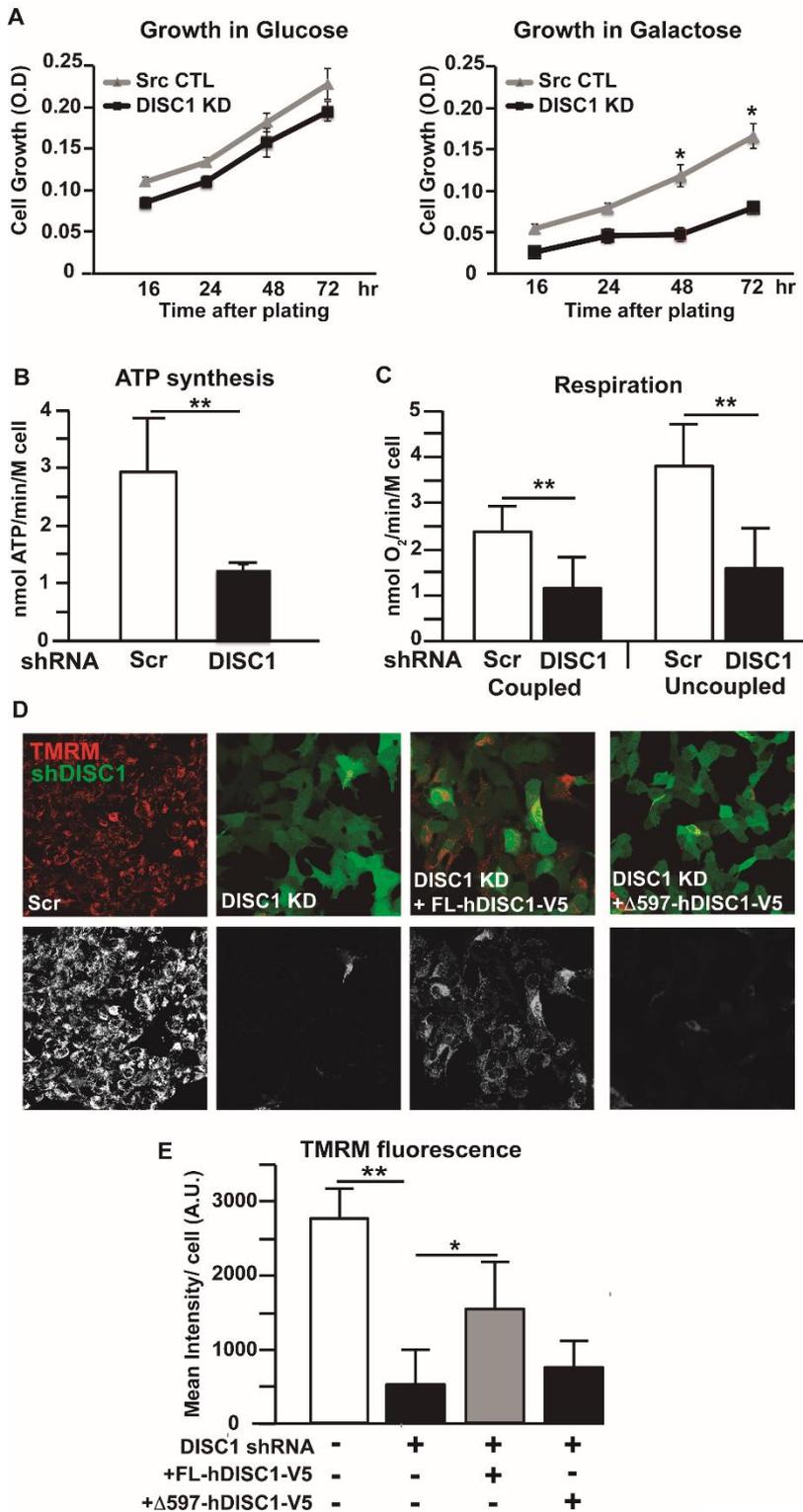
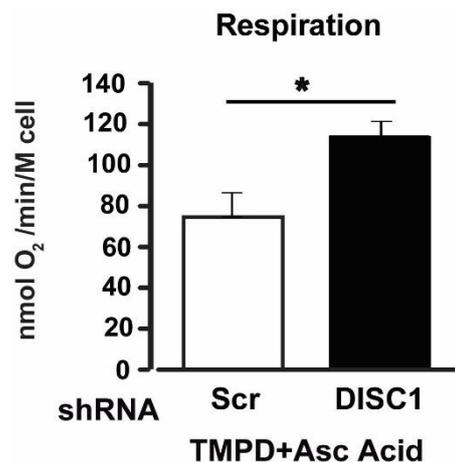


Fig. 5.11. El déficit de DISC1 afecta a la función de OXPHOS. (A) Crecimiento de células en medio con glucosa (izq.) y con galactosa (dcha.). Se sembraron el mismo número de células (5000) y se cuantificó la proliferación celular mediante el ensayo de MTT. (B) Síntesis de ATP medida en células SH-SY5Y permeabilizadas con digitonina utilizando el método luciferina-luciferasa con malato y piruvato (1mM) como sustratos. (C) Consumo de oxígeno medido en células intactas utilizando piruvato (1mM) como sustrato, con o sin 1μM del agente desacoplante carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazono (FCCP) y 1,5mM de KCN como inhibidor final, en un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark. (D,E) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) medido por fluorescencia del TMRM. (D) Imágenes representativas evidencian una menor fluorescencia en células DISC1 KD y en células DISC1 KD transfectadas con la forma truncada $\Delta 597-854$ en comparación con las células control (Scr) y las células transfectadas con la forma completa hDISC1-V5 (DISC1). Barras, 10μm. (E) Cuantificación de la fluorescencia del TMRM. DISC1 KD debilita $\Delta\Psi_m$ que es parcialmente recuperado mediante la sobreexpresión de hDISC1, pero no por la forma truncada $\Delta 597-854$.

Fig. 5.12. Actividad del complejo IV. Consumo de oxígeno medido en células intactas SH-SY5Y CTL (Scr) y DISC1 KD (DISC1) utilizando piruvato (1mM) como sustrato, con 20nM de antimicina A para la inhibición del complejo III y 2mM de tetrametil-p-fenil diamina (TMPD) y 10mM de ácido ascórbico, en un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark. Scr: Células control. DISC1: Células DISC1 KD. Barras representan la tasa de consumo de oxígeno +/- SD, en nmol O₂/min/millón de células. p<0,05.



5.4.5 El silenciamiento de DISC1 afecta a la diferenciación de las células SH-SY5Y

DISC1 está implicado en procesos de proliferación neuronal a través de su interacción con GSK3 β en la vía GSK3 β / β -catenina¹⁹¹. En el cerebro, juega un papel importante en la regulación de la diferenciación y proliferación neuronal. DISC1 se ha relacionado específicamente con la diferenciación de oligodendrocitos, regulando negativamente este proceso, disminuyendo su expresión desde la célula precursora al oligodendrocito¹³⁷. Además se ha visto que tanto la sobreexpresión como la supresión de la forma completa provoca deficiencias en el proceso de neuritogénesis en células PC12¹³⁸. Y en cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata la supresión conlleva severos problemas de migración¹³⁸. Por ello, se comprobó si el déficit de DISC1 en las células SH-SY5Y podía implicar defectos en su diferenciación.

Las células SH-SY5Y son bioquímica, estructural y electrofisiológicamente parecidas a neuronas bajo unas determinadas condiciones de cultivo. En condiciones normales, las células se mantienen sin diferenciar presentando un núcleo circular. Cuando son sometidas a una situación de estrés o en respuesta a estímulos neuritogénicos como son la inclusión en el medio de cultivo de 10 μ M de AR durante 5 días, seguido de 100ng/ml de BDNF durante 1 día; o la eliminación de FBS durante 3 días, éstas se diferencian adoptando un núcleo alargado y polarizado y emergiendo proyecciones neuríticas. En la primera etapa de la diferenciación surgen proyecciones en las regiones apicales, semblantes a las que presentan las neuronas piramidales, y posteriormente, pierden la polaridad y son capaces de proyectar desde cualquier punto de la región citosólica¹⁹².

Para caracterizar el efecto de DISC1 sobre la diferenciación, las células DISC1 KD fueron privadas de suero (-FBS) o incubadas secuencialmente con AR y BDNF. Mediante inmunofluorescencia se comprobó que las diferencias morfológicas entre las células control y las células DISC1 KD eran evidentes. Las células DISC1 KD presentaban menos proyecciones neuríticas (Fig. 5.13). Se contaron 100 células de cada condición al azar (CTL, -FBS, RA+BDNF) y se midió la longitud de las proyecciones neuríticas, observando

que en las células sometidas a diferenciación existían diferencias significativas en cuanto a la longitud de las proyecciones neuríticas, entre las células CTL y las DISC1 KD ($p < 0.001$) (Fig. 5.14).

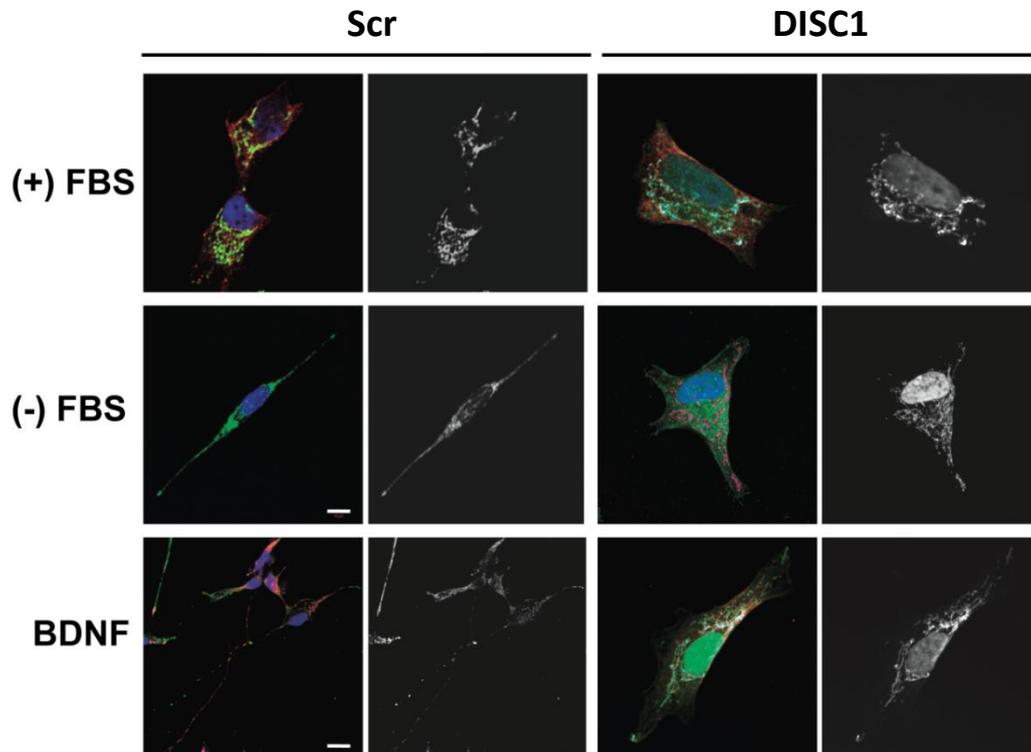


Fig. 5.13. Las células SH-SY5Y DISC1 KD tienen impedida su capacidad de diferenciación neuronal. Imágenes por inmunofluorescencia representativas de células CTL (Scr) y DISC1 KD (DISC1) sometidas a diferenciación. Las células fueron incubadas en medio completo (+10% FBS) y en medio de diferenciación por privación de suero durante un día (-FBS) o medio de cultivo suplementando con 10 μ M RA durante 5 días, seguido de un día con 100ng/ml BDNF (RA+BDNF). En ambos casos, se observó una marcada deficiencia de diferenciación de las células DISC1 KD respecto a las células CTL. Marcaje en DISC1 CTL: DAPI: núcleo; GFP: mitofilina; Cy3: α -tubulina; en DISC1 KD: DAPI: núcleo; GFP procedente del vector del shRNA; Cy3: α -tubulina; Alexa647: mitofilina. Barra de escala=10 μ m.

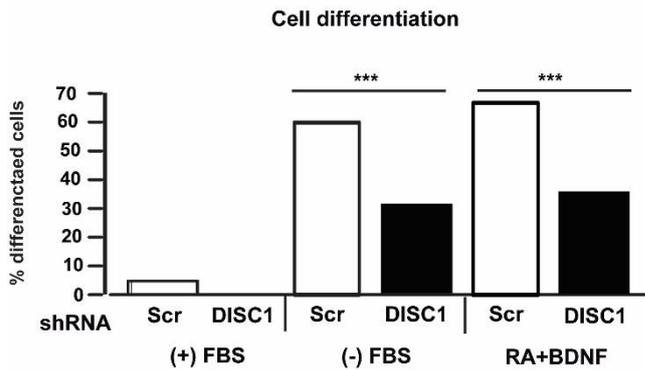


Fig. 5.14. Las células SH-SY5Y KD se diferencian menos que las células control. Porcentaje de células que proyectan neuritas al ser sometidas a diferenciación mediante privación de FBS o suplementación con RA+BDNF. En ambos casos se muestra una reducción significativa en el porcentaje de células diferenciadas DISC1 KD respecto a las control. (+) FBS: Medio suplementado con 10% FBS. (-) FBS: Medio sin suplementación de FBS. RA+BDNF:

Células incubadas en medio suplementado con 10 μ M AR durante 5 días seguido de 10ng/ml BDNF durante 1 día. Scr: Células control. DISC1: Células DISC1 KD. ***p<0.001.

Finalmente, nos planteamos si el déficit en la capacidad de diferenciación de las células DISC1 KD era debido a sus problemas bioenergéticos o, por el contrario, se debía a problemas de activación de la vía canónica de diferenciación MAPK/ERK¹⁹³. Esta vía, desempeña un papel esencial en el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular en condiciones fisiológicas. Cada familia de MAPKs se compone de 3 quinasas que actúan secuencialmente: MAPK, MAPK quinasa y MAPKK quinasa. La vía ERK es regulada vía Ras. Después de la activación de Ras, ésta, activa a la serina-treonina quinasa Raf-1 que fosforila a MAPKK y MEK. MEK, una quinasa dual, activa ERK mediante fosforilación de 2 residuos, Tyr183 y Thr185. ERK activa se transloca al núcleo y regula la transcripción proteica¹⁹⁴.

Para determinar la implicación de la vía MAPK/ERK, se incubaron células CTL y células DISC1 KD con BDNF a distintos tiempos de exposición (0, 5, 10 y 30 min. y 1, 6 y 24h), y se determinó la activación de la vía determinando los niveles de fosforilación de ERK mediante WB (Fig. 5.15). No se observaron diferencias significativas en la fosforilación de ERK respecto a ERK total entre las células CTL y las células DISC1 KD (Fig. 5.13). Los resultados indican que las deficiencias en la diferenciación de las células DISC1 KD no son causadas por diferencias en la activación de la vía MAPK/ERK, y refuerzan nuestra hipótesis que deben ser debidas a su déficit bioenergético. De hecho se ha observado que las células SH-SY5Y en condiciones de desdiferenciación dependen básicamente de la glucólisis, mientras que, al ser sometidas a diferenciación con AR pasan a depender casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial¹⁹⁵.

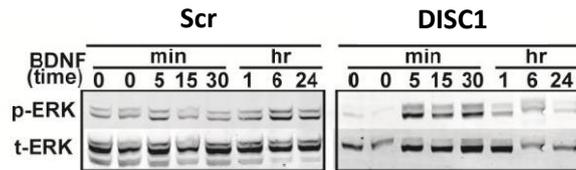


Fig. 5.15. Activación de la vía MAPK/ERK de las células SH-SY5Y mediante incubación con BDNF. La incubación se realizó a tiempos 0, 5, y 30min. y 1, 6, y 24h con 100ng/ml de BDNF en células control (Scr) y células DISC1 KD (DISC1). No se observan diferencias significativas en la fosforilación de ERK entre las células CTL y las células DISC1 KD. P-ERK: ERK fosforilada; t-ERK: ERK total.

La mitocondria tiene un papel fundamental en la viabilidad y muerte neuronal. Las neuronas dependen del ATP producido en el orgánulo. Cualquier deficiencia en la fosforilación oxidativa puede conducir a la muerte celular por apoptosis¹⁹⁶.

Se ha demostrado que los estrógenos tienen un papel neuroprotector contra la privación de suero y el estrés oxidativo, entre otros, en neuronas del hipocampo, de la amígdala, corticales y mesencefálicas¹⁹⁷.

El tratamiento con 17 β -estradiol en células SH-SY5Y tratadas con un inhibidor del complejo II (3-NPA), previene de la reducción de ATP, preserva el $\Delta\Psi_m$ e inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁹⁸. Además, se ha mostrado el papel neuroprotector de los estrógenos en pacientes con EMG. Los estrógenos tienen un efecto modulador sobre los síntomas manifestados en mujeres con SZ y TBP^{199,200}.

A partir de estos estudios se planteó si los estrógenos podrían modular la actividad de OXPHOS y revertir el déficit bioenergético observado en las células DISC1 KD. Para comprobarlo, se trataron las células DISC1 KD con concentraciones crecientes de 17 β -estradiol y se midió la síntesis de ATP.

Los resultados mostraron que a concentraciones de 20nM y 200nM las células DISC1 KD eran capaces de mantener niveles de síntesis de ATP similares a las células CTL, aunque sólo a 20nM alcanzaba un valor significativo ($p < 0.05$)(Fig. 5.16).

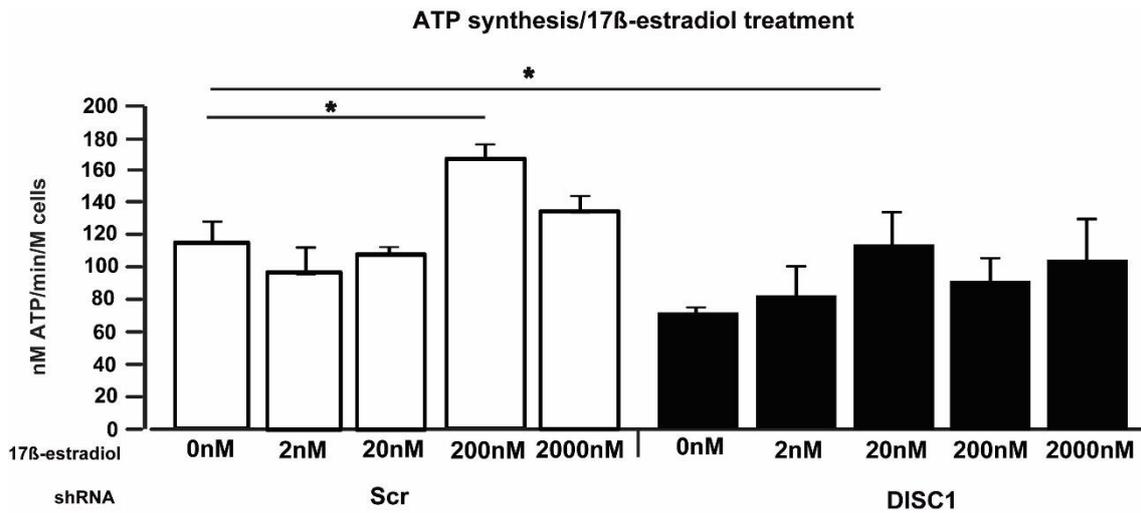


Fig. 5.16. El tratamiento con 17 β -estradiol revierte el déficit en la función de OXPPOS en las células DISC1 KD. Las células CTL (Scr) y DISC1 KD (DISC1) se incubaron con concentraciones crecientes de 17 β -estradiol (0, 2, 20, 200 y 2000nM) durante 24h antes de la medición de síntesis de ATP. El tratamiento con 17 β -estradiol a una concentración de 20nM en las células DISC1 KD permite alcanzar niveles de síntesis de ATP similares a los obtenidos en las células CTL, en condiciones basales. Barras representan la síntesis de ATP +/- SD en nM ATP/min/millón de células. * $p < 0.05$.

6. Discusión

6.1 Descripción de genes candidatos en enfermedades complejas: cardiopatías congénitas y enfermedad mental grave.

El estudio de las enfermedades complejas resulta complicado por las características que las definen, un origen poligénico e influencia del ambiente. Avances recientes en el conocimiento de estas enfermedades y del propio genoma²⁰¹, junto con la evolución de las técnicas de genotipado, han permitido un nuevo enfoque en el estudio de su etiología que está provocando una mejora significativa en la práctica clínica²⁰².

Las técnicas llamadas de última generación surgidas en la última década como el SNP-Array y la secuenciación masiva, han permitido realizar aproximaciones desde un punto de vista más amplio, llevando a cabo cribados de todo el genoma que permiten tener una visión global del mismo, aspecto fundamental en el abordaje de las enfermedades complejas⁴. Además, han posibilitado la comparación de frecuencias alélicas entre miles de casos que ha permitido sugerir variantes de efecto moderado importantes en la etiología de las enfermedades complejas (*Welcome Trust Case Control Consortium*, 2007).

En el presente trabajo hemos mostrado la utilización de estas técnicas de última generación, junto con distintas aproximaciones estadísticas, en la búsqueda de nuevos genes candidatos a causar CC y EMG. En el caso de las CC hemos llevado a cabo un análisis mediante SNP-Array en un conjunto de pacientes afectos pudiendo obtener datos de CNVs y realizar un análisis de ligamiento en familias con elevada prevalencia de CC. En el caso de EMG, hemos realizado un análisis de variantes poco frecuentes en dos familias con elevada prevalencia mediante WES.

En la primera aproximación, en la búsqueda de nuevos genes candidatos a causar CC, hemos identificado los genes IGF1R, THBS2 y PRKCE mediante SNP-Array, análisis de priorización, de vías y comparativa bibliográfica, en un grupo de 27 pacientes que presentaban CC.

De forma global, el análisis de priorización de los genes contenidos en las regiones alteradas de los 27 pacientes de estudio que presentaban CNVs poco frecuentes, mostró que el gen IGF1R era el que se posicionaba en primer lugar, mediante los dos programas utilizados (*Toppgene* y *Endeavour*). Estos dos programas basan su análisis en la comparación de los potenciales candidatos respecto a genes de referencia asociados a la patología de estudio, clasificándolos según un valor asignado^{33,149}. Ambos realizan estas clasificaciones a partir de datos obtenidos en bases de datos de predicción de la ontología, interacción proteína-proteína, información de regulación o vías de señalización, expresión de genes, información de secuencias, fenotipos, función y estudios publicados en revistas indexadas. Endeavour emplea hasta 26 bases de datos y Toppgene 14, aunque sus aproximaciones son distintas. La mejor estrategia, como han

llevado a cabo otros investigadores^{203,204}, es la de realizar análisis en paralelo y escoger los genes comunes entre ambos programas, tal y como se ha hecho en este trabajo.

El paciente que presenta la delección de IGF1R, tiene una del15q26.3 de 48Kb, heredada vía materna, con este único gen involucrado. Manifiesta una estenosis pulmonar y ductus arterioso persistente además de hipoacusia, inmunodeficiencia, fascies anormal y retraso mental.

IGF1R codifica para una proteína que presenta distintas funciones, regulando el desarrollo de tejidos específicos²⁰⁵. La vía de las IGFs, regula la proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia de la mayoría de células durante el crecimiento fetal y la vida postnatal. Se expresa en la mayoría de tejidos humanos y tipos celulares durante el desarrollo y la etapa adulta, aunque su expresión está regulada por el tipo celular y a nivel espacio-temporal. Los ligandos que se unen a IGF1R activan distintas vías de señalización (MAPK, PI3/Akt, STAT)²⁰⁶.

IGF1R, se relaciona también con defectos en la maduración del esqueleto y retraso psicomotor²⁰⁷. Mutaciones que provocan una disminución en la dosis, se manifiestan en deficiencias en la osificación de huesos de la cara y el cráneo. Además, los pacientes que presentan haploinsuficiencia muestran fenotipos más graves con mayores problemas psicomotores²⁰⁷.

Si se produce la pérdida total del receptor, se observan anomalías fenotípicas caracterizadas por retraso en el desarrollo motor y en las capacidades psicosociales y caracteres dismórficos^{170,207}. También se ha visto asociado a algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama y el de endometrio²⁰⁸.

Además, Davidsson J. *et al.* en 2008, ya describieron su posible implicación en procesos de desarrollo. Estudiaron un paciente portador de la del15q26 con un fenotipo clínico multisistémico debido a defectos en el desarrollo, que también afectaban al desarrollo cardíaco, evidenciando un defecto CIV, caracterizado por coartación de la aorta y anomalía del arco aórtico²⁰⁹.

Recientemente se ha descrito que niveles bajos de expresión de IGF1R provocan una disminución en la proliferación de cardiomiocitos, en un modelo de estrés de *zebrafish*²¹⁰.

La implicación de IGF1R en el desarrollo lo convierte en un buen candidato a causar CC.

El gen **THBS2** está duplicado en un paciente que presenta una dupl6q27 de 90Kb, con este único gen afectado. Manifiesta CIV, atrofia cerebral, hiperactividad e hipoglucemia. THBS2 codifica para la proteína trombospondina 2, una glicoproteína de matriz secretada por fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune²¹¹. Además de ser un componente de la matriz modula la interacción célula-matriz¹⁷¹. Gracias a la unión a otras proteínas, participa en diferentes procesos biológicos: angiogénesis, motilidad celular, apoptosis, organización del citoesqueleto y actúa de plataforma de interacción en la matriz intracelular²¹².

En cuanto a la angiogénesis, la regula negativamente. En ratones KO la angiogénesis se ve modificada provocando un aumento de la densidad vascular en tejidos subcutáneos y anomalías en tejido conectivo, presentando además, defectos en las fibras de colágeno²¹¹.

En cáncer, su expresión se ve disminuida, siendo menor en pacientes con mal pronóstico²¹³ y en procesos de invasión tumoral o metástasis²¹⁴.

Curiosamente THBS2 estimula la señal dependiente de Notch3, a través de la interacción con Jagged1 (ligando de Notch3), sugiriendo un papel en la comunicación célula-célula. La vía de señalización de Notch3 participa en el desarrollo de muchos sistemas orgánicos, principalmente en el neurodesarrollo²¹⁵.

La función de THBS2 sugiere que un posible fallo en la expresión de este gen pudiera estar desregulando las interacciones de unión entre células, dificultando el correcto desarrollo de los tejidos. Por otro lado, en su papel antiangiogénico, su delección podría afectar a la correcta vascularización del órgano que dificultaría de algún modo un correcto desarrollo. Soemedi R. *et al.*, 2012, asociaron también este gen a CC por estar contenido en un CNV que aumentaba el riesgo de padecer la enfermedad, aunque no explicaban a través de qué mecanismo¹⁶⁹. Por todo lo descrito anteriormente, lo consideramos un buen candidato a causar CC. Esclarecer su papel patogénico en la enfermedad podría contribuir a identificar nuevas vías implicadas. Teniendo en cuenta el fenotipo clínico del paciente, resulta curioso que la afectación de un solo gen provoque un abanico tan amplio de manifestaciones clínicas con diversos órganos afectados. Aunque el gen pudiera estar afectando a varias vías, el amplio fenotipo clínico sugiere que se están llevando a cabo otros mecanismos que pueden actuar de reguladores del proceso de desarrollo o que pueden existir otras alteraciones o variantes poco frecuentes que puedan contribuir al fenotipo clínico y que son aún desconocidas. Para desvelar dicha posibilidad cabrá aplicar nuevas aproximaciones diagnósticas, a partir de técnicas masivas de secuenciación como WES.

El gen **PRKCE** se presenta en un paciente con una translocación desequilibrada (del2p21/del7q33) que afecta además a los genes EPAS1; LOC388946; ATP6V1E2; RHOQ; PIGF; CRIPT; SOCS5; LOC100134259; MCFD2; TTC7A; C2orf61; CALM2 en el cromosoma 2 y C7orf49; WDR91; STRA8; CNOT4; NUP205; PL-5283; SLC13A4 en el cromosoma 7. Manifiesta CC con comunicación interventricular perimembranosa y foramen oval permeable, y retraso mental. PRKCE pertenece a una familia de proteínas quinasas dependientes de fosfolípidos. Presentan una función importante en la regulación del sistema nervioso, corazón y sistema inmune²¹⁶. Son dianas intracelulares claves para factores de crecimiento y en vías de señalización de adhesión celular²¹⁷.

Se ha descrito su papel en la regulación del ciclo celular de linfocitos T en las fases G0/G1 y G2¹⁷². Su actividad y localización subcelular está mediada por modificaciones postraduccionales y por la disposición de segundos mensajeros²¹⁷. PRCKE también presenta una importante función en la proliferación y diferenciación celular siendo

dependientes de sus niveles de expresión²¹⁶. Se ha descrito su papel como inhibidor en la supervivencia y progresión del cáncer. En gliomas, inhibe su progresión induciendo su apoptosis²¹⁸.

En cuanto a funciones directamente relacionadas con el corazón, se ha comprobado que una disminución en la expresión de PRCKE junto con PRKC ζ , provocan defectos en el fenotipo cardíaco, desarrollo fetal y crecimiento de cardiomiocitos²¹⁹. Se ha descrito también su efecto protector sobre el corazón por daños producidos por isquemia²²⁰. Además, regula negativamente los factores de transcripción involucrados en el desarrollo del corazón Nkx2.5 y GATA4 vía ERK sugiriendo un papel regulador importante en la expresión de genes del desarrollo temprano²¹⁶.

Esta última función asignada a PRCKE deja patente su implicación en el desarrollo cardíaco convirtiéndolo en un potencial candidato a causar CC.

Por último, el gen **HNF1B**, se encuentra duplicado en un paciente con una dup17q12 con un tamaño de 1,4Mb que afecta además a los genes ZNHIT3; MYO19; PIGW; GGNBP2; DHRS11; MRM1; LHX1; AATF; ACACA; C17orf78; TADA2A; TADA2L; DUSP14; SYNRG; DDX52; LOC284100. El paciente manifiesta únicamente una TOF. HNF1B, codifica para un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia que contiene homeodominio o dominios de unión al ADN²²¹. Se expresa en hepatocitos, células epiteliales derivadas del endodermo de varios tejidos y del mesodermo de los túbulos renales²²¹. HNF1B juega un papel relevante en la organogénesis, especialmente en el desarrollo de los riñones. Mutaciones en HNF1B, son causa de anomalías congénitas del riñón, tracto urinario y páncreas, además de malformaciones de los genitales^{222,223}. Estudios de GWAS lo han identificado como gen de mayor susceptibilidad en el cáncer de próstata²²⁴. Aunque su función no esté directamente relacionada con el corazón, su implicación en el desarrollo y en procesos cancerígenos sugiere que puede tener una implicación en el desarrollo cardíaco y se considera, por tanto, un gen candidato.

El análisis de vías, llevado a cabo mediante el software IPA, capaz de encontrar interacciones entre genes, mecanismos o funciones y vías implicadas relevantes; no demuestra una relación entre IGF1R, THBS2, PRKCE y HNF1B, aunque es posible que actúen de moduladores de otros genes que puedan influir en última instancia en el desarrollo cardíaco.

A pesar de ello, el análisis de vías ha mostrado enriquecimiento en vías de señalización celular y mantenimiento de la estabilidad celular, PGR, Jak/STAT y calmodulinas. El enriquecimiento de genes que participan en vías de señalización, sugiere que la expresión de los genes implicados en el proceso del desarrollo cardíaco no ha sido correcta.

El desarrollo, es un proceso en el que la regulación es clave para que finalice con éxito. Así pues, tanto los niveles de expresión de los genes involucrados, como el momento en que se expresan, son sumamente importantes para que el proceso se lleve a cabo correctamente. Los genes que hemos descrito como potenciales candidatos,

presentando una función sugestiva de su posible implicación en el proceso, podrían estar influenciándolo, precisamente, mediante la alteración en los niveles de expresión. Además, cabe pensar que la epigenética, podría estar jugando un papel clave en estas patologías.

Respecto a la segunda aproximación estadística para la identificación de nuevos genes asociados a CC, el análisis de ligamiento en 6 familias con elevada prevalencia de CC, hemos identificado 2 nuevas regiones que segregan con la enfermedad y cuyos genes contenidos en dichas regiones, SELS, SNRPA1, PCSK6 y TCF4, se han convertido en potenciales candidatos a causar CC.

El gen **SELS** codifica para una selenoproteína de retículo endoplasmático y de superficie celular involucrada en la respuesta a proteínas mal plegadas. Atenúa la inflamación disminuyendo los niveles de citoquinas proinflamatorias. En daño cerebral la expresión de SELS se ve aumentada. Responde a isquemia activando astrocitos en cultivo. Su supresión compromete la viabilidad de los astrocitos²²⁵. A pesar de estar asociado a inflamación se ha relacionado mayormente con el metabolismo lipídico por su relación con LDL y VDL¹⁷³. En pacientes con CC el metabolismo lipídico se ve desregulado por el aumento de los niveles de ácidos grasos libres. Este aumento provoca defectos asociados al crecimiento de mayor gravedad¹⁷⁴. Variantes genéticas se han asociado a un mayor riesgo de padecer enfermedad coronaria pudiendo afectar también a la morbilidad de pacientes con enfermedad cardiovascular, sobretodo en mujeres²²⁶. A pesar de estar asociado a riesgo cardiovascular su función no sugiere que tenga un papel fundamental en el desarrollo aunque podría actuar como agravante del fenotipo.

El gen **SNRPA1** codifica para una pequeña ribonucleoproteína esencial para la eliminación de intrones en el pre-ARNm. La regulación post-transcripcional es clave en la regulación de la expresión y la actividad de factores de transcripción esenciales en el desarrollo del órgano¹⁷⁶. No se ha visto asociado a defectos congénitos del corazón pero su función sugiere que pueda tener un papel fundamental en el proceso.

El gen **PCSK6/SPC4/PACE4** codifica para una preproteína convertasa responsable de convertir precursores latentes en productos activos. PCSK6 está involucrado en la regulación de los ejes antero-posterior e izquierdo-derechos en el embrión. Los ratones spc4+/- son normales y fértiles, aunque un 28% de los spc4-/- no nacen, por su asociación a graves malformaciones cardíacas incluyendo doble salida del ventrículo derecho junto con defectos en los septos y, en algunas ocasiones, dextrocardia (situación del corazón al lado derecho). Estos animales, presentan también defectos de lateralidad incluyendo la torsión inversa del corazón²²⁷. Este hallazgo unido a nuestros resultados confirma su idoneidad como gen candidato a causar CC.

El gen **TCF4** codifica para un factor de transcripción altamente expresado en fibroblastos de tejido conectivo involucrado en el desarrollo de fibras musculares y su maduración¹⁷⁹. Además, se ha sugerido que actúa como supresor de tumores a través del arresto del

ciclo celular vía p21 (inhibidor de ciclinas dependiente de quinasas)²²⁸. Está relacionado a su vez, con algunos tipos de cáncer. En cáncer de colon la pérdida del gen promueve el avance del desarrollo del tumor y se relaciona con menor supervivencia de los pacientes²²⁹. En cáncer de mama, su desregulación también se relaciona con un mayor crecimiento del tumor y metástasis²³⁰. Su asociación al desarrollo de fibras musculares, sugiere que un defecto en el gen podría ser el causante de un problema en el desarrollo del corazón que produjera una malformación del órgano, como consecuencia de una deficiencia en las fibras musculares, lo que lo convierte en un potencial candidato.

En esta aproximación hemos identificado 2 nuevas regiones de ligamiento que predisponen a CC. El gen SELS y PCSK6, se habían asociado anteriormente con desórdenes cardiovasculares o desarrollo del corazón, pero no el resto de genes que hemos descrito en nuestros resultados, SNRPA1 y TCF4, que consideramos nuevos genes candidatos a causar CC. Además, los genes descritos son referidos a distintos defectos anatómicos y no a uno sólo, aportando mayor interés. Futuros estudios deberían ir encaminados a realizar otros estudios de ligamiento con un mayor número de pacientes y estudios casos-control.

Interesantemente, la identificación de PCSK6 en el estudio de ligamiento, ha permitido identificar su interacción con TBX5 y Osr1, factores de transcripción asociados a CC, en la segunda línea cardiogénica, a partir estudios funcionales y de biología de sistemas²³¹.

Para conocer la implicación de los genes propuestos en ambas aproximaciones en la fisiopatología de las CC, se necesitan llevar a cabo estudios funcionales. Los futuros experimentos deberían basarse en modelos tanto KO como sobreexpresión de los genes candidatos, en líneas celulares de cardiomioblastos, capaces de diferenciarse a cardiomiocitos (células musculares cardíacas)²³², y/o en modelos animales como el *zebrafish*, ampliamente utilizado en el estudio de enfermedades de desarrollo²³³, o modelos murinos, que ayudaran a esclarecer su participación en las CC. Entender la etiología de las CC es fundamental para identificar posibles complicaciones en la cirugía, mejorar el consejo genético y determinar mejor el pronóstico.

La aproximación mediante WES en familias con elevada prevalencia EMG nos ha permitido describir variantes poco frecuentes contenidas en los genes TRIP12, RNF25 y ARHGAP19, que segregan con la enfermedad y que los convierten en potenciales candidatos a causar EMG.

La variante poco frecuente Ser205Leu encontrada en el gen **TRIP12**, tiene una frecuencia alélica de $2,473e^{-05}$. Cambia una citosina por una timina y en consecuencia el aminoácido serina, polar sin carga, pasa a una leucina, perdiendo la polaridad. La citosina está altamente conservada desde reptiles a peces y mamíferos, y la variante identificada no se ha descrito en ninguna de las bases de datos consultadas, GenomeBrowser, ExAC, y 1000genomes. El residuo de serina tiene una predicción de fosforilación del 0.777 (NetPhos 2.0). Este programa utiliza Scores de 0-1 aunque establece un límite de 0.5

para que el residuo pueda ser considerado como fosforilado y determina el valor 1, como el valor de mayor confianza de fosforilación de un residuo. Nuestra predicción muestra una confianza media-alta de fosforilación²³⁴. La fosforilación de proteínas es un proceso importante en la regulación de la actividad de las mismas y de las vías en las cuales participan, por lo que si TRIP12 es regulado por fosforilación, la afectación del residuo de serina podría inactivarla impidiendo su función.

El gen TRIP12 codifica para una proteína E3 ubiquitina ligasa, cuya función es el marcaje de proteínas que van a ser degradadas vía proteasoma. Está implicada en procesos de reparación del ADN, modulando los niveles de otra ubiquitina ligasa, RNF168¹⁸¹. También se ha descrito su participación en la regulación de la senescencia celular en procesos oncogénicos a través de su interacción con p19^{ARF}, regulando los niveles del supresor de tumores p53²³⁵ y con retraso en el ciclo celular, sugiriendo su implicación en la regulación de la expresión génica²³⁶. Aunque estas funciones ya descritas podrían estar relacionadas con su potencial modulación del neurodesarrollo, es su interacción con Sox6, lo que nos suscita un mayor interés. TRIP12 poliubiquitina Sox6, a la que se une por su dominio HECT, para ser posteriormente degradada vía proteasoma. El déficit de TRIP12 provoca un aumento en la expresión de Sox6 desregulando la expresión de genes involucrados en la diferenciación de fibras musculares²³⁷. Sox6 o SRY-box 6, es un factor de transcripción relacionado con la región de determinación del sexo. Se expresa en cerebro y médula espinal durante todas las fases del desarrollo embrionario en ratones²³⁸ y concretamente en interneuronas corticales y otras poblaciones de neuronas corticales en el telencéfalo y en la migración de interneuronas post-mitóticas²³⁹. Su función es la de controlar la diferenciación de interneuronas corticales en el telencéfalo y la heterogeneidad funcional, así pues, juega un papel importante regulando las células progenitoras neuronales (NPC), inhibiendo la salida prematura del ciclo celular y la diversidad de interneuronas durante el desarrollo neurocortical^{240,241}. Se ha descrito que la pérdida de Sox6 interrumpe la diferenciación e impide la generación de los subtipos de interneuronas corticales²⁴⁰ y produce, en algunos casos, encefalopatía epiléptica²³⁹. Ratones Trip12 KO completan su desarrollo embrionario hasta el nacimiento, pero debido a numerosos defectos no suelen superar las pocas horas de vida²⁴².

La variante poco frecuente en TRIP12 que hemos descrito en este trabajo, podría ser la causa de una desregulación de Sox6, que provocaría la desregulación en la expresión de genes involucrados en la diferenciación y, en consecuencia, afectaría al neurodesarrollo (Fig. 6.1). Además, recientemente se ha descrito que mutaciones *de novo* en el gen TRIP12 aumentan el riesgo de padecer autismo, otra EMG²⁴³. Hasta el momento, no se ha descrito su relación con las EMG y por lo tanto, conocer su posible efecto patogénico implicaría un avance en el conocimiento de la enfermedad.

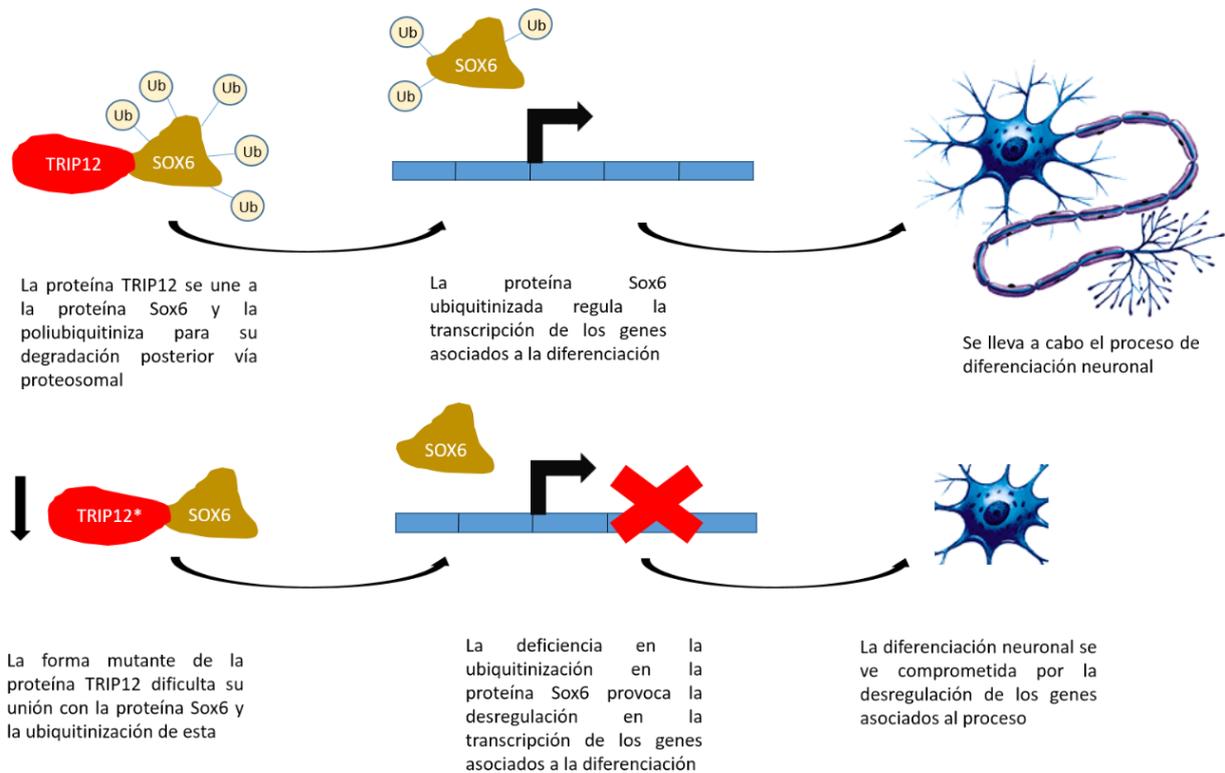


Fig. 6.1. Modelo funcional de la proteína TRIP12 en su forma WT y su forma mutante. La proteína TRIP12 promueve la diferenciación neuronal mediada por Sox6, la proteína con la que interacciona. En su forma mutante, la proteína TRIP12 no puede interaccionar con Sox6 y el proceso de diferenciación se ve afectado.

La variante poco frecuente rs138321594 encontrada en el gen **RNF25** (A07), presenta una frecuencia alélica de $7,889e^{-05}$. Dicha variante cambia una guanina por una adenina, provocando un cambio de aminoácido de arginina, polar con carga positiva, a glutamina, polar sin carga. La base está altamente conservada desde reptiles hasta humanos.

RNF25 es una E3 ubiquitina ligasa cuya función es el marcaje de proteínas que van a ser degradadas vía proteosoma²⁴⁴. Se ha descrito que ubiquitina a la proteína Naked2 haciendo que ésta tenga una supervivencia de una hora. Naked2 codifica para una proteína cuya función es regular negativamente la vía canónica de señalización Wnt a través de la interacción con Dishvelled (Dvl o Dsh)^{182,245}. La regulación negativa de la vía Wnt permite la diferenciación celular. La unión de Naked2 con Dvl provoca la ubiquitinización de ambas proteínas, que consecuentemente son degradadas vía proteosoma²⁴⁶.

RNF25 interacciona también con la subunidad p65 del factor nuclear κ B (NF- κ B), tanto *in vitro* como *in vivo*, modulando su actividad. NF- κ B juega un papel importante en procesos de inflamación, mecanismos de defensa, proliferación y supervivencia celular²⁴⁷. NF- κ B al activarse se transloca al núcleo donde estimula la expresión de genes que participan en distintos procesos biológicos.

Hasta el momento sólo se le han atribuido estas 2 interacciones y curiosamente ambas participan en procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Si bien es cierto que los análisis bioinformáticos de predicción proteica, no otorgan un alto nivel predictivo de patogenicidad a la variante genética encontrada en RNF25, esta variante poco frecuente, podría ser la causa de una desregulación de Naked2, que como se ha indicado anteriormente, actúa sobre la vía Wnt involucrada en el proceso de diferenciación. La ausencia de ubiquitinización de de Naked2 por la mutación en RNF25, permitiría que Naked2 secuestrara a Dvl, activando así la vía Wnt y promoviendo procesos de proliferación y supervivencia celular e inhibiendo el proceso de diferenciación (Fig. 6.2). Su función reguladora sobre proteínas implicadas en neurodesarrollo y ciclo celular, sugieren que es un buen candidato a contribuir a la manifestación de EMG en la familia 1 estudiada. Hasta el momento no se ha descrito su relación con las EMG y por lo tanto, conocer su posible efecto patogénico implicaría un avance en el conocimiento de la enfermedad.

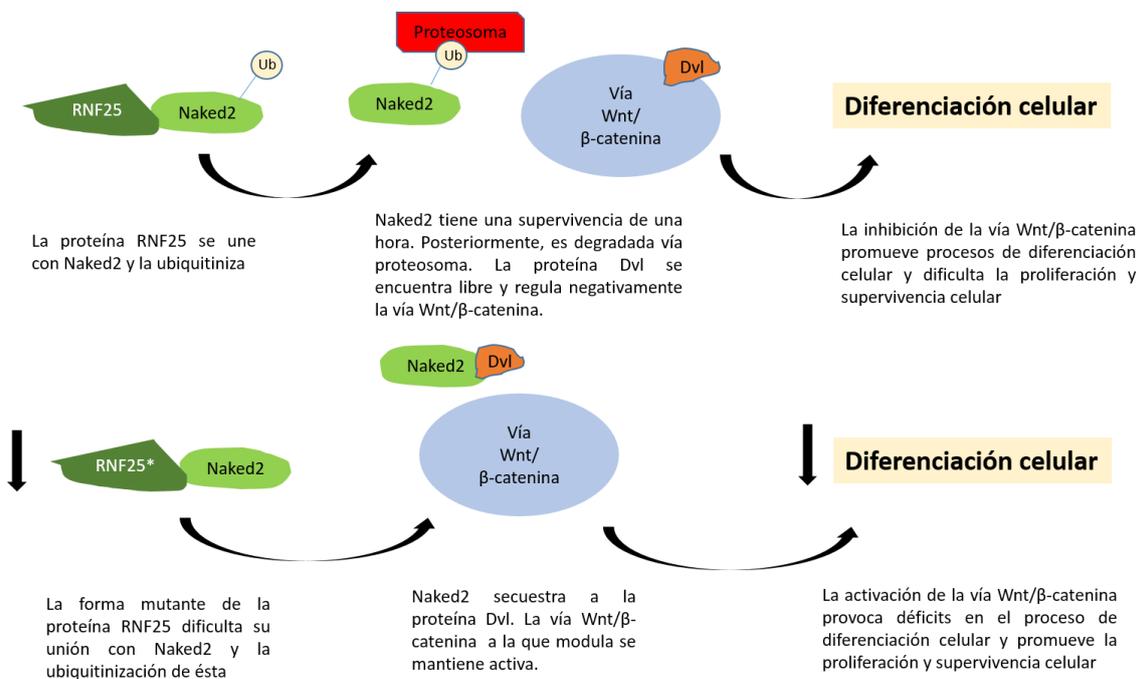


Fig. 6.2. Modelo funcional de la proteína RNF25 en su forma WT y su forma mutante. La proteína RNF25 promueve la diferenciación neuronal mediada por Naked2, la proteína con la que interacciona. Naked2 modula la vía Wnt/ β -catenina mediante su interacción con Dvl. Dvl regula negativamente la vía Wnt. En su forma mutante, la proteína RNF25 no interacciona con Naked2, por lo que ésta no se degrada vía ubiquitina-proteosoma manteniendo secuestrada a Dvl y afectando al proceso de diferenciación.

Ambos genes, que presentan variantes poco frecuentes en los miembros afectados de esta familia y no en los sanos, son E3 ubiquitinas ligasas. La ubiquitinización es un proceso que contribuye a la regulación de la migración neuronal, neuritogénesis y la formación

y eliminación de sinapsis¹⁸³. El síndrome de Angelman, caracterizado por presentar discapacidad intelectual, microcefalia y deterioro cognitivo, es causado por una alteración genética en el gen UBE3A, que codifica para la otra enzima E3 ubiquitina ligasa²⁴⁸. Defectos en la ubiquitinización de proteínas sinápticas como Arc, contribuyen al deterioro cognitivo observado en pacientes que padecen el síndrome de Angelman²⁴⁸. UBE3B, también enzima E3 ubiquitina ligasa, se encuentra asociada a otro síndrome caracterizado por presentar discapacidad intelectual, el síndrome BPID, por sus siglas en inglés *Blepharophimosis-Ptoxis-Intellectual-Disability*. Mutaciones en la región anterior o al inicio del dominio HECT, eliminan probablemente su capacidad ubiquitina ligasa²⁴⁹. Se ha observado también, que la duplicación de UBE3B predispone a TEA²⁵⁰. Además, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y Huntington, se originan por agregados proteicos que podrían producirse por una disminución en la degradación o defecto en el sistema ubiquitina-ligasa^{186,251}. Estas evidencias muestran relación con el análisis de vías (IPA) realizado con nuestros genes candidatos (ver apartado 5.3), ya que, como se ha citado anteriormente, TRIP12 y RNF25 muestran una relación indirecta a través de los genes UBE2D1 y UBE2L3, pertenecientes a la misma familia que UBE3A y UBE3B, afianzando su posible participación en la etiología de la enfermedad.

Además de las interesantes interacciones descritas y mencionadas anteriormente, la relación entre la ubiquitinización y el neurodesarrollo, sugiere que TRIP12 y RNF25 tienen un papel fundamental en el proceso. Conocer el posible efecto patogénico de estas variantes, podría esclarecer la implicación de estos genes candidatos a causar EMG. Para ello, se debería llevar a cabo mutagénesis dirigida en proteínas recombinantes de TRIP12 y RNF25 e introducir las en un modelo de diferenciación neuronal como SH-SY5Y. Además, mediante otra proteína ubiquitina ligasa recombinante se podría modular la vía y comprobar si el efecto de las mutaciones puede ser revertido, mostrando su implicación en la neuritogénesis.

En último lugar, la variante poco frecuente identificada con el rs145032100 y con una frecuencia alélica de $4,184 \times 10^{-3}$ encontrada en el gen **ARHGAP19**, es un cambio de una citosina por una timina que provoca un cambio aminoacídico de una histidina, aminoácido polar con carga negativa, a una tirosina, aminoácido polar sin carga.

ARHGAP19 codifica para una proteína que regula negativamente a las Rho GTPasas. Éstas, actúan a modo de “interruptor” en la progresión del ciclo celular, expresión génica, adhesión celular, migración²⁵² y reorganización del citoesqueleto, proliferación celular y diferenciación¹⁸⁶. ARHGAP19 produce la inactivación de RhoA favoreciendo la hidrólisis de GTP a GDP al que está unido²⁵³. La inactivación de RhoA induce la expansión de neuritas. Se expresa mayoritariamente en tejido fetal, observando su presencia en cerebro. RhoA modula la reorganización del citoesqueleto, regulando la polimerización de la actina y, consecuentemente, la morfología celular, la adhesión y la movilidad.

Se ha descrito que ARHGAP19 se expresa en células hematopoiéticas siendo esencial para la citoquinesis en linfocitos T. Su expresión se ve regulada durante el ciclo celular. En sobreexpresión, causa cambios morfológicos a nivel celular y su déficit afecta a la segregación cromosómica. Además, mutaciones en ARHGAP19 se han relacionado con la disminución en los niveles de expresión de RhoA²⁵⁴.

La función que se le asigna a ARHGAP19 nos sugiere que la variante poco frecuente identificada, podría inducir una actividad constitutiva de RhoA ya que se vería afectada la hidrólisis de GTP a GDP. La activación de RhoA induce retracción y arresto de neuritas en líneas celulares neuronales, inhibiendo los procesos de neuritogénesis²⁵⁵ sugiriendo que podría provocar problemas en el neurodesarrollo (Fig. 6.3). Esta teoría seguiría la hipótesis de la reducción del neuropilo descrita por Selemon LD. & Goldman-Rakic S., 1999²⁵⁶; en la que sugieren que la SZ no es debida a una disminución de la densidad neuronal sino a la reducción de las prolongaciones neuronales que impiden la interconexión neuronal. Debido a este empobrecimiento de conectividad neuronal se produciría la disfunción cognitiva. El modelo describe que la densidad neuronal es mayor en cerebros de pacientes con SZ respecto a controles, debido a una disminución de la distancia entre neuronas y a una reducción de prolongaciones neuronales, perdiendo la conectividad.

Al igual que RNF25, los análisis bioinformáticos de predicción proteica, no otorgan a la variante poco frecuente identificada en ARHGAP19 un alto nivel de patogenicidad. Sin embargo, considerando que es la única variante poco frecuente contenida en un gen candidato que segrega en todos los miembros afectados de este amplio linaje estudiado, su función en la regulación de RhoA y considerando la teoría de la reducción del neuropilo, es lógico pensar que ARHGAP19 puede tener un papel fundamental en el correcto neurodesarrollo. Conocer el posible efecto patogénico de esta variante podría esclarecer la implicación de este gen candidato a causar EMG. Al igual que TRIP12 y RNF25, se debería llevar a cabo mutagénesis dirigida en la proteína recombinante y comprobar en un modelo celular de neuritogénesis si el proceso esta afectado por la mutación.

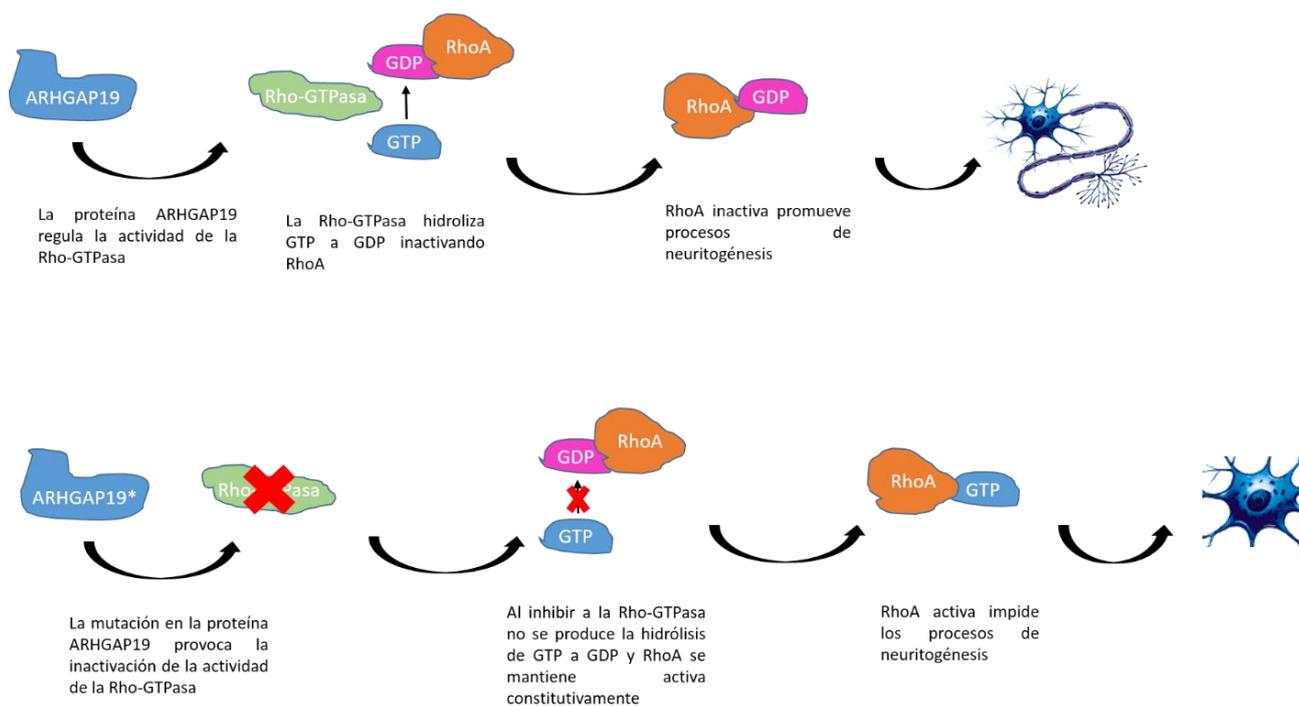


Fig. 6.3. Modelo funcional de la proteína ARHGAP19 en su forma WT y su forma mutante. Se observa como en su forma WT, la proteína ARHGAP19 promueve la diferenciación neuronal y la neuritogénesis regulando la proteína Rho-GTPasa, implicada en el proceso de formación del citoesqueleto. En su forma mutante, la proteína ARHGAP19 desregula la actividad Rho-GTPasa y el proceso de diferenciación se ve afectado.

Nuestras aproximaciones técnicas y estadísticas han mostrado ser útiles en el estudio de genes candidatos en enfermedades del desarrollo. Estas estrategias nos han permitido identificar nuevos genes y nuevas variantes poco frecuentes que pueden estar implicadas en la etiología de estas enfermedades (CC y EMG), ayudando a la predicción y/o prognosis y aportando una nueva visión de las vías biológicas implicadas. Ha permitido además, identificar nuevas dianas potenciales de intervención terapéutica.

Evidencias recientes sugieren una base genética compartida entre las CC y las EMG. Se ha determinado que hasta un 43% de los nacidos vivos con CC, afectados mayormente por trasposición de grandes vasos y síndrome de hipoplasia de ventrículo izquierdo, presentan también un defecto en el neurodesarrollo antes de ser intervenidos quirúrgicamente²⁵⁷. Además, mediante técnicas de imagen en pacientes con CC, tales como, defectos en los septos, hipoplasia del corazón derecho y defectos conotruncales; han desvelado que existen deficiencias en el tamaño del cerebro²⁵⁸ y en prácticamente toda su anatomía²⁵⁹, evidenciando un desequilibrio en el desarrollo neuroaxonal y en el metabolismo^{260,261}. Este hecho se atribuye a una alteración en el aporte de oxígeno y de sustratos en el período prenatal debido a problemas hemodinámicos como

consecuencia de la CC, provocando hipoxia que, a su vez, afecta a la maduración del cerebro, provocando lesiones a nivel de sustancia blanca^{262,263}.

Recientemente Homsy J. *et al.* 2015, han realizado un estudio en el que han descrito mutaciones comunes entre CC y desórdenes del neurodesarrollo (DND)²⁶⁴. En una aproximación puramente estadística han realizado comparativas entre distintas bases de datos que contienen mutaciones y/o genes asociados a cada patología, con la finalidad de identificar solapamientos entre ambas entidades clínicas. Se han encontrado hasta 69 mutaciones de novo perjudiciales compartidas entre CC y DND. Entre ellas se incluyen 19 que provocan modificaciones de la cromatina, incluyendo genes responsables de metilación, acetilación o ubiquitinización. Además, también incluyen 32 genes involucrados en la regulación transcripcional, incluyendo vías de señalización como Wnt y Notch, claves en el desarrollo de corazón y cerebro. Los investigadores sugieren con estos resultados que existe una base genética compartida entre las CC y los DND, confirmando la existencia de efectos pleiotrópicos de las mutaciones en estos genes.

A partir de nuestras aproximaciones no hemos encontrado genes comunes afectados en CC y EMG, pero si hemos descrito 2 genes, THBS2 en CC y RNF25 en EMG, que actúan indirectamente sobre vías de señalización Wnt y Notch, adquiriendo mayor importancia como candidatos a causar CC y EMG, respectivamente. Cabe destacar que 4 de los 27 pacientes con CC analizados mediante SNP-Array, presentan además retraso mental, sugiriendo que la alteración de un gen puede provocar ambos defectos o que entre los genes identificados en estos pacientes, alguno de ellos puede estar implicado en el neurodesarrollo. Por ello, las futuras líneas de investigación deberían ir encaminadas a llevar a cabo aproximaciones comunes en pacientes con CC y/o EMG, con tal de esclarecer las bases compartidas de estas enfermedades, y por tanto, contribuir a elucidar los mecanismos involucrados en el complejo proceso del desarrollo.

6.2 Estudio de la estructura y función de Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) en la mitocondria

DISC1 fue descrito en el año 2000 en una familia escocesa con elevada prevalencia de SZ que presentaba una translocación equilibrada (1;11)(q42.1;q14.3) por la cual se interrumpía la pauta de lectura de este gen¹⁰⁹. DISC1 codifica para una proteína ubicua en líneas celulares estables, como en las estudiadas SH-SY5Y, U373 MG, y HEK293, aunque se encuentra enriquecida en la mitocondria¹³⁴. Su topología y función en este organelo aún no han sido descritas.

En el presente trabajo hemos confirmado su enriquecimiento en la mitocondria y hemos descrito por primera vez su localización submitocondrial y función en el orgánulo.

Nuestros resultados han mostrado que la isoforma de 70kDa de DISC1 se localiza en el EIM anclada a la MI y consta de una región insoluble y una soluble.

Park Y. *et al.* en 2010 describieron la interacción entre DISC1 y Mic60/mitofilina¹⁴⁶, una proteína de MI con la que colocaliza en la mitocondria. Nosotros hemos confirmado esta interacción FL-hDISC1-Mic60/mitofilina mediante Co-IP. La reducción de DISC1 afecta a la estabilidad de Mic60/mitofilina y se ha observado que la reducción tanto de Mic60/mitofilina como de DISC1 provoca defectos bioenergéticos estudiados mediante medición de NADH deshidrogenasa y contenido total de ATP en células CAD (células neuronales tumorales catecolaminérgicas de ratón). La naturaleza de la interacción Mic60/mitofilina-DISC1 era hasta el momento desconocida.

Hemos mostrado que DISC1 interacciona con la Mic60/mitofilina en un complejo multiproteico de la MI, el complejo MICOS, en células humanas y en cerebro de ratón. MICOS está conservado desde levaduras hasta humanos. En levaduras se compone de 6 subunidades: Mic60, Mic27, Mic26, Mic19, Mic12 y Mic10^{87,91}. En mamíferos, se han identificado hasta la fecha, 5 proteínas homólogas: Mic60/mitofilina, Mic27/APOOL, Mic26/APOO, Mic10/MINOS1, Mic25/CHCHD6 y Mic19/CHCHD3, estas 2 últimas identificadas como Mic19 en levaduras^{81,85,88,90,265}. El peso molecular aproximado de estas subunidades es de ~200kDa, sin embargo, otros estudios y los nuestros han identificado un complejo de 700kDa mediante resolución en geles nativos^{86,266}, sugiriendo que todavía existen subunidades por identificar. De hecho, se ha identificado recientemente a QIL1/C19orf70⁸⁶, homólogo de Mic12; y nosotros también hemos identificado a CHCHD10²⁶⁶, como nuevas subunidades de MICOS. Este complejo, es responsable del mantenimiento de la arquitectura mitocondrial⁸².

Mediante análisis por BN-PAGE seguido de 2D-WB, hemos demostrado que DISC1, tanto la forma recombinante hDISC1, como la forma endógena mdisc1, se ensamblan a MICOS interaccionando con Mic60/mitofilina, Mic19/CHCHD3, Mic26/CHCHD6 y CHCHD10 (Fig. 6.4). La interacción de DISC1 con las subunidades conocidas de MICOS se refleja por la alteración en los niveles de expresión de estas proteínas en las células DISC1 KD, encontrándose en su mayoría, sobrerreguladas, sugiriendo que la maquinaria de transcripción-traducción intenta compensar esta situación. Estos resultados son contradictorios a los observados previamente donde el déficit de Mic60/mitofilina y Mic19/CHCHD3 durante 7 días induce deficiencias en el resto de las subunidades analizadas, mientras que, el déficit de Mic27/APOOL, Mic26/APOO y Mic25/CHCHD6, no producen ningún efecto sobre el resto de las subunidades de MICOS²⁶⁷. Nuestros resultados podrían deberse a que el análisis de la expresión de las subunidades de MICOS se llevó a cabo en células que presentaban un déficit estable de DISC1.

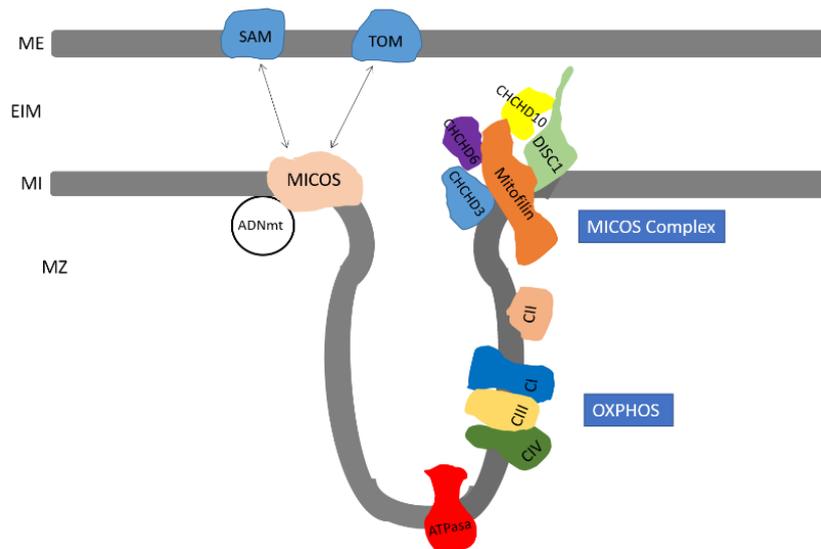


Fig. 6.4. Modelo de DISC1 formando parte del complejo MICOS. DISC1, se localiza asociada a la MI de cara al EIM junto con el resto de componentes del complejo en las CJs. Se muestra también la relación de MICOS con las translocasas SAM y TOM localizadas en la ME y su importancia en la estabilidad del ADNmt. En la cresta se muestra el sistema OXPHOS.

El déficit de DISC1 también provoca un desensamblaje parcial de MICOS. El hecho de que MICOS no presente un desensamblaje total, además de la topología descrita, sugiere que DISC1 es una proteína periférica de MICOS.

MICOS se localiza en las CJs y controla la morfología de la MI. La pérdida de las CJs separa los complejos de la cadena respiratoria de la maquinaria de importe proteico, afectando al abastecimiento de proteínas nucleares necesarias para el ensamblaje de los mismos²⁶⁸. De hecho, en las células DISC1 KD se evidencia un desequilibrio significativo en el ensamblaje de los complejos de OXPHOS y supercomplejos, y se reducen los niveles basales de las subunidades codificadas por el ADNn como NDUFA9 (CI), SDHA (CII) o Core1 (CIII). Curiosamente, también se ven afectadas las subunidades codificadas por el ADNmt como se observa en la reducción de COXI (CIV).

MICOS se ha relacionado con el importe de proteínas nucleares a la mitocondria a través de la interacción de Mic60/mitofilina con los complejos de ME, TOM y SAM²⁶⁹. De hecho, MICOS interactúa con la maquinaria de SAM para formar el complejo MIB (*Mitochondrial Intermembrane space Briding complex*), un gran complejo que se sugiere también responsable del mantenimiento de la morfología mitocondrial²⁷⁰. Las células DISC1 KD presentan una reducción significativa de las subunidades de OXPHOS codificadas por el ADNn, sugiriendo que existen deficiencias en la maquinaria de importe de proteínas nucleares a la mitocondria debidas a la inestabilidad de MICOS.

Se conoce además que MICOS juega un papel importante en la organización de los nucleoides²⁷¹ y que defectos en las subunidades de MICOS se traducen en la desorganización de los nucleoides dando lugar a daños en el ADNmt por estrés oxidativo²⁶⁶. Las células DISC1 KD presentan una reducción significativa en los niveles de ADNmt que podrían explicar el déficit de COXI, observado en las células DISC1 KD. Este

déficit también podría ser causado por defectos en la transcripción del ADNmt. Yang y col. han publicado recientemente que el déficit de Mic60/mitofilina afecta a la transcripción del ADNmt por su interacción con los factores de transcripción TFAM, TFB2M y TFB1M¹⁸⁸. La deficiencia de Mic60/mitofilina reduce la interacción de TFAM y el reclutamiento de la RNA polimerasa a los promotores del ADNmt, contribuyendo a una regulación deficiente de la transcripción del ADNmt y de la actividad de OXPPOS. Se deberá estudiar en futuras investigaciones si la deficiencia de DISC1 ejerce un efecto sobre la transcripción del ADNmt modulando la interacción Mic60/mitofilina-TFAM¹⁸⁸. Curiosamente, pacientes con TBP presentan una reducción en los niveles de ADNmt plasmático²⁷².

Las crestas mitocondriales incrementan el área disponible para OXPPOS y juegan un papel relevante en la organización de los dímeros de la ATPasa, que se ha relacionado con una mayor eficiencia en la síntesis de ATP²⁷³⁻²⁷⁵. La desestructuración de MICOS causa un desensamblaje de OXPPOS y una deficiencia del sistema con el consecuente déficit bioenergético. Además, la disfunción de OXPPOS es un fenotipo común en células deficitarias de las subunidades de MICOS^{84,265,276,277}. En este sentido, estudios recientes basados en resonancia magnética de cerebro sugieren que la actividad de OXPPOS se ve alterada en pacientes psiquiátricos^{278,279}.

La disfunción mitocondrial ha sido ampliamente asociada a desórdenes psiquiátricos y hDISC1 es uno de los genes de susceptibilidad identificados hasta la fecha⁹⁶. Aunque hDISC1 está enriquecida en mitocondria¹³⁴, la relación de su función mitocondrial y la patogénesis de la enfermedad son aún objeto de debate.

Nuestros datos apoyan un rol patogénico de DISC1 en la mitocondria mediada por su función en MICOS, ya que la forma truncada $\Delta 597$ -hDISC1-V5 identificada en la familia escocesa no se ensambla a MICOS y por lo tanto, no es capaz de rescatar el déficit de $\Delta\Psi_m$ observado en las células DISC1 KD.

Recientemente, se ha descrito la posible regulación de OXPPOS sobre MICOS posibilitando una modulación mútua y sugiriendo posibles mecanismos que influyeran en el fenotipo observado.

Cox17, una proteína de EIM identificada en levaduras como reguladora de la estabilidad de MICOS, es también esencial para el ensamblaje de la citocromo c oxidasa vía Sco1. Las cepas que presentaban deficiencia de Cox17 muestran niveles de expresión de las subunidades de MICOS óptimos en medio suplementado con glucosa, aunque la interacción de Mic60/mitofilina con el resto de subunidades se ve severamente afectada. No ocurría este desequilibrio en las cepas deficitarias de Sco1 sugiriendo que la desestabilización de MICOS puede ser causada, de manera indirecta, por defectos en el ensamblaje de CIV y por lo tanto, por el déficit causado en la respiración²⁸⁰. Nuestros resultados han mostrado un déficit en el ensamblaje del complejo IV en las células DISC1 KD sugiriendo que la inestabilidad del complejo MICOS también podría ser mediada por la inestabilidad de CIV.

Del mismo modo, se ha descrito también en levaduras, que en ausencia del complejo MICOS, la expresión de los complejos de la cadena respiratoria provocan una desorganización de la MI, y en consecuencia, se dan morfologías anormales de la mitocondria. Así pues, se ha sugerido que la morfología mitocondrial presente en las cepas deficitarias de MICOS es causada por distintos factores. El desensamblaje del CIII y CIV provocado por el déficit de MICOS da lugar también a defectos morfológicos y energéticos²⁸¹. Así pues, hemos mostrado desensamblaje de los complejos OXPHOS en las células DISC1 KD y un consecuente déficit bioenergético sugiriendo que los complejos OXPHOS podrían también actuar como moduladores de la estructura mitocondrial y como consecuencia, en el déficit bioenergético observado.

En último lugar, se ha descrito también que las curvas características de las crestas mitocondriales están controladas por la oligomerización de las subunidades F_1F_0 de la ATPasa y del ensamblaje de los dímeros a lo largo de la cresta²⁸². Las deficiencias en la síntesis de ATP observada en las células DISC1 KD, por tanto, podría estar también influenciada por el déficit en la dimerización de las subunidades que forman la ATPasa.

Estas aportaciones sugieren que el déficit bioenergético mostrado por las células DISC1 KD puede ser causado además de por las causas ya descritas, por esta modulación cruzada con OXPHOS, por lo que esta interacción deberá ser estudiada con mayor detalle en el futuro.

La diferenciación neuronal implica un cambio en la fuente de obtención de energía. Las células progenitoras pasan de ser puramente glicolíticas a depender casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa a medida que se van diferenciando a neuronas¹⁹⁵. Nuestros resultados demuestran que DISC1 mitocondrial es indispensable para una correcta función de OXPHOS y que la forma trunca identificada en la familia escocesa compromete dicha función. Estos resultados sugieren que la patogénesis de la SZ presentada en la familia puede ser causada por deficiencias en el neurodesarrollo debidas a un déficit bioenergético que no permite la proliferación y diferenciación neuronal.

Con la finalidad de afianzar esta hipótesis, realizamos experimentos de diferenciación en células SH-SY5Y, gracias a los cuales hemos demostrado que la reducción de DISC1 afecta al proceso de diferenciación reduciendo la capacidad de proyectar neuritas. Este proceso puede verse afectado por el déficit bioenergético que hemos descrito con anterioridad y que podría afectar a la capacidad neuritogénica, ya que las mitocondrias tienen un papel fundamental en el proceso.

Se ha descrito ampliamente el efecto neuroprotector de los estrógenos en distintos tipos de neuronas como las mesencefálicas, las corticales, de hipocampo y de amígdala, frente a situaciones donde se compromete su funcionalidad, como el estrés oxidativo²⁸³ o la privación de suero en el medio²⁸⁴. En ratones, los estrógenos también son capaces de modular la pérdida de neuronas en modelos de daño isquémico cerebral²⁸⁵.

Los estrógenos, también han mostrado un efecto protector frente a EMG. Las mujeres presentan una incidencia menor que los hombres a edades comprendidas entre los 25-30 años, pero estos valores se invierten en edades superiores a los 40 años, mostrando que los estrógenos pueden ser un factor importante en la etiología de la enfermedad.

Además, en mujeres, la sintomatología se suele agravar durante la menstruación, en el período post-parto y post-menopausia, en los que los niveles de estrógenos descienden considerablemente (^{286,287}). Actualmente hay evidencias de la mejora de los síntomas positivos en pacientes con SZ tratados con estrógenos^{288,289}. En mujeres post-meupáusicas también se ha visto que la terapia hormonal con estrógenos se asocia con un menor riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o disminuir su avance²⁹⁰, además de mejorar sus capacidades cognitivas²⁹¹.

La neuroprotección por parte de los estrógenos puede ser mediada por la mitocondria, ya que se ha visto que el tratamiento con 17 β -estradiol muestra neuroprotección frente a la apoptosis. Además, previene de la reducción de ATP y preserva el $\Delta\Psi_m$ ¹⁹⁸.

DISC1, al igual que los estrógenos, juega un papel importante en la regulación de la diferenciación neuronal a través de la vía GSK3 β / β -catenina¹⁹¹. Ambos activan la vía Wnt inhibiendo la actividad de GSK3 β . GSK3 β juega un papel importante en el desarrollo neuronal y regeneración²⁹². Se ha sugerido que la inhibición de esta enzima puede ser una diana importante en el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas, incluidas las EMG, en las que está adquiriendo especial importancia^{293,294}.

A partir de estos datos pensamos que los estrógenos podrían ser posibles moduladores de la actividad de DISC1. Nuestros resultados han mostrado la recuperación parcial en la síntesis de ATP en células DISC1 KD con el tratamiento de 17 β -estradiol a concentraciones de 20nM y 200nM. Estos resultados nos sugieren que los estrógenos permiten cierta recuperación funcional de la actividad mitocondrial. Así pues, esta vía debe ser estudiada en profundidad ya que podría convertirse en una terapia útil para el tratamiento de EMG en la subpoblación de pacientes mujeres que debutan en la post-menopausia o post-parto²⁹⁵.

En esta tesis, hemos descrito por primera vez que DISC1 forma parte del complejo MICOS. Además, hemos demostrado su papel en el mantenimiento de la estructura mitocondrial y su función en la regulación del sistema OXPHOS. En último lugar, hemos mostrado el posible papel regulador de los estrógenos sobre la recuperación de la capacidad funcional mitocondrial, abriendo un campo de estudio en la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de EMG.

Cabe destacar, que además de DISC1, hemos identificado otra subunidad de MICOS, CHCHD10. En nuestra publicación²⁶⁶ se describe por primera vez una relación causal entre mutaciones en un gen que codifica para una subunidad de MICOS y una patología, DFT-Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). El desensamblaje de MICOS causado por

mutaciones en CHCHD10 provoca una disfunción mitocondrial caracterizada por la pérdida de las crestas mitocondriales, deficiencias en la cadena respiratoria, desorganización de nucleoides con afectación de la reparación del ADNmt e inhibición de la apoptosis. La desestabilización de los nucleoides y del ADNmt, lo hace más vulnerable al estrés oxidativo. La reparación del genoma mitocondrial se ve afectado por el estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes con mutaciones en CHCHD10, lo que podría explicar la miopatía que presentan, causada por una acumulación de mutaciones en el ADNmt.

La manifestación patológica asociada a mutaciones en CHCHD10 proporciona una oportunidad única para avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la disfunción mitocondrial y su relación con los desórdenes neurodegenerativos.

7. Conclusiones

1. Se han identificado los genes IGFR1, THBS2 y PRKCE como buenos genes candidatos a causar CC debido a su función y su localización en regiones genómicas con deleciones/duplicaciones (CNVs) de pacientes afectados de CC.
2. Los genes SELS, SNRPA1 y PCSK6 son buenos genes candidatos a causar CC por contenerse en la región 15q26.3 y el gen TCF4 en la región 18q21.2-18q21.3, ambas regiones que segregan con la enfermedad.
3. Se han identificado variantes genéticas poco frecuentes en los genes TRIP12, RNF25 y ARHGAP19 que segregan con enfermedad mental grave en familias con elevada prevalencia, sugestivas de ser causales de la patología.
4. Se ha identificado la topología mitocondrial de la proteína *Disrupted in Schizophrenia 1* (DISC1), localizada en el espacio intermembrana asociada a la membrana mitocondrial interna.
5. La proteína DISC1, tanto en su forma endógena como en su forma recombinante, forma parte del complejo *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System* (MICOS) junto con las proteínas Mic60/mitofilina, Mic19/CHCHD3, Mic25/CHCHD6 y CHCHD10.
6. La reducción de DISC1 provoca un desensamblaje parcial del complejo MICOS que conlleva una desestructuración de la morfología mitocondrial.
7. La reducción de DISC1 afecta a la transducción de las subunidades del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y en consecuencia de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria.
8. Como consecuencia funcional, la reducción de DISC1 en células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, conduce a un defecto bioenergético, evidenciado por un marcado déficit de crecimiento celular en medio de cultivo suplementado con galactosa como fuente de carbono, y disminución en la tasa de consumo de oxígeno, en la síntesis de ATP y en el potencial de membrana.
9. La reducción de DISC1 en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y afecta a su diferenciación, bloqueando su capacidad neuritogénica en respuesta al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o a la ausencia de suero bovino fetal (FBS).
10. La proteína CHCHD10 es una subunidad del complejo MICOS. Mutaciones en CHCHD10 en pacientes con demencia frontotemporal y esclerosis lateral amiotrófica, provocan un desensamblaje de MICOS que desestabiliza a los nucleoides y dificulta la reparación del ADNmt.

Bibliografía

1. Haller CS, Padmanabhan JL, Lizano P, Torous J, Keshavan M. Recent advances in understanding schizophrenia. *F1000Prime Rep*. 2014;6:57-57. eCollection 2014.
2. Craig J. Complex diseases: Research and applications. *Nature Education*. 2008;1(1):184.
3. Mitchell KJ. What is complex about complex disorders? *Genome Biol*. 2012;13(1):237-2012-13-1-237.
4. Kilpinen H, Barrett JC. How next-generation sequencing is transforming complex disease genetics. *Trends Genet*. 2013;29(1):23-30.
5. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008;26(10):1135-1145.
6. Casals F, Idaghdour Y, Hussin J, Awadalla P. Next-generation sequencing approaches for genetic mapping of complex diseases. *J Neuroimmunol*. 2012;248(1-2):10-22.
7. McCarroll SA, Kuruville FG, Korn JM, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet*. 2008;40(10):1166-1174.
8. Tadros S, Morrogh D, Scott RH. What is array CGH? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(4):134-135.
9. Kharbanda M, Tolmie J, Joss S. How to use... microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2015;100(1):24-29.
10. Greshock J, Feng B, Nogueira C, et al. A comparison of DNA copy number profiling platforms. *Cancer Res*. 2007;67(21):10173-10180.
11. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization: A rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol*. 1993;4(1):41-46.
12. Conrad DF, Pinto D, Redon R, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464(7289):704-712.
13. Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med*. 2013;15(6):478-481.
14. Tyson C, Harvard C, Locker R, et al. Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet A*. 2005;139(3):173-185.
15. Mikhail FM. Copy number variations and human genetic disease. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(6):646-652.

16. Gohlke JM, Thomas R, Zhang Y, et al. Genetic and environmental pathways to complex diseases. *BMC Syst Biol*. 2009;3:46-0509-3-46.
17. Plomin R, Haworth CM, Davis OS. Common disorders are quantitative traits. *Nat Rev Genet*. 2009;10(12):872-878.
18. Pulst SM. Genetic linkage analysis. *Arch Neurol*. 1999;56(6):667-672.
19. Ott J, Wang J, Leal SM. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*. 2015;16(5):275-284.
20. Bentham J, Vyse TJ. The development of genome-wide association studies and their application to complex diseases, including lupus. *Lupus*. 2013;22(12):1205-1213.
21. Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet*. 2005;6(4):287-298.
22. Botto LD, Khoury MJ. Commentary: Facing the challenge of gene-environment interaction: The two-by-four table and beyond. *Am J Epidemiol*. 2001;153(10):1016-1020.
23. Ottman R. An epidemiologic approach to gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*. 1990;7(3):177-185.
24. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(12):1890-1900.
25. Brand T. Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol*. 2003;258(1):1-19.
26. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*. 2008;451(7181):943-948.
27. Thiene G, Frescura C. Anatomical and pathophysiological classification of congenital heart disease. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(5):259-274.
28. Leong FT, Freeman LJ, Keavney BD. Fresh fields and pathways new: Recent genetic insights into cardiac malformation. *Heart*. 2009;95(6):442-447.
29. Avolio E, Caputo M, Madeddu P. Stem cell therapy and tissue engineering for correction of congenital heart disease. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:39.
30. Andelfinger G. Genetic factors in congenital heart malformation. *Clin Genet*. 2008;73(6):516-527.
31. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *Circ Res*. 2013;112(4):707-720.
32. Nemer M. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovasc Pathol*. 2008;17(1):48-54.

33. Tranchevent LC, Barriot R, Yu S, et al. ENDEAVOUR update: A web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W377-84.
34. Bentham J, Bhattacharya S. Genetic mechanisms controlling cardiovascular development. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:10-19.
35. Xu H, Baldini A. Genetic pathways to mammalian heart development: Recent progress from manipulation of the mouse genome. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(1):77-83.
36. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Jr, et al. Genetic basis for congenital heart defects: Current knowledge: A scientific statement from the american heart association congenital cardiac defects committee, council on cardiovascular disease in the young: Endorsed by the american academy of pediatrics. *Circulation.* 2007;115(23):3015-3038.
37. Gelb BD, Chung WK. Complex genetics and the etiology of human congenital heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(7):a013953.
38. Wren C, Birrell G, Hawthorne G. Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart.* 2003;89(10):1217-1220.
39. Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Corpeleijn E, et al. Combined adverse effects of maternal smoking and high body mass index on heart development in offspring: Evidence for interaction? *Heart.* 2012;98(6):474-479.
40. Meyer KD, Zhang L. Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009;3(1):7-16.
41. Madsen NL, Schwartz SM, Lewin MB, Mueller BA. Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: A population-based study. *Congenit Heart Dis.* 2013;8(2):131-141.
42. Smedts HP, van Uiter EM, Valkenburg O, et al. A derangement of the maternal lipid profile is associated with an elevated risk of congenital heart disease in the offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(6):477-485.
43. Bloom FE. Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1993;50(3):224-227.
44. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(4):327-348.
45. Innocenti GM, Price DJ. Exuberance in the development of cortical networks. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(12):955-965.
46. Lenroot RK, Giedd JN. Brain development in children and adolescents: Insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(6):718-729.

47. Costa e Silva JA. Autism, a brain developmental disorder: Some new pathophysiological and genetics findings. *Metabolism*. 2008;57 Suppl 2:S40-3.
48. Bailey A, Luthert P, Bolton P, Le Couteur A, Rutter M, Harding B. Autism and megalencephaly. *Lancet*. 1993;341(8854):1225-1226.
49. Arnone D, Cavanagh J, Gerber D, Lawrie SM, Ebmeier KP, McIntosh AM. Magnetic resonance imaging studies in bipolar disorder and schizophrenia: Meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009;195(3):194-201.
50. Geschwind DH, Levitt P. Autism spectrum disorders: Developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(1):103-111.
51. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2008 Principal Investigators, Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders--autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, united states, 2008. *MMWR Surveill Summ*. 2012;61(3):1-19.
52. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009;374(9701):1627-1638.
53. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2005;2(5):e141.
54. Bhugra D. The global prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2005;2(5):e151; quiz e175.
55. Van Meter AR, Moreira AL, Youngstrom EA. Meta-analysis of epidemiologic studies of pediatric bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(9):1250-1256.
56. Flint J, Kendler KS. The genetics of major depression. *Neuron*. 2014;81(3):484-503.
57. Abou-Setta AM, Mousavi SS, Spooner C, et al. . 2012.
58. Kohler S, Gaus S, Bschor T. The challenge of treatment in bipolar depression: Evidence from clinical guidelines, treatment recommendations and complex treatment situations. *Pharmacopsychiatry*. 2014;47(2):53-59.
59. Doherty JL, Owen MJ. Genomic insights into the overlap between psychiatric disorders: Implications for research and clinical practice. *Genome Med*. 2014;6(4):29.
60. Niculescu AB, 3rd. Schizophrenia: From genetics to biology to predictive medicine. *J Clin Psychiatry*. 2014;75 Suppl 2:4-7.
61. Carroll LS, Owen MJ. Genetic overlap between autism, schizophrenia and bipolar disorder. *Genome Med*. 2009;1(10):102.
62. McGue M, Gottesman II. The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1991;240(3):174-181.

63. Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry*. 2009;66(9):947-956.
64. Kerner B. Genetics of bipolar disorder. *Appl Clin Genet*. 2014;7:33-42.
65. Pardo CA, Eberhart CG. The neurobiology of autism. *Brain Pathol*. 2007;17(4):434-447.
66. Yildiz-Yesiloglu A, Ankerst DP. Neurochemical alterations of the brain in bipolar disorder and their implications for pathophysiology: A systematic review of the in vivo proton magnetic resonance spectroscopy findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006;30(6):969-995.
67. Valvezan AJ, Klein PS. GSK-3 and wnt signaling in neurogenesis and bipolar disorder. *Front Mol Neurosci*. 2012;5:1.
68. Gao Y, Galante M, El-Mallakh J, et al. BDNF expression in lymphoblastoid cell lines carrying BDNF SNPs associated with bipolar disorder. *Psychiatr Genet*. 2012;22(5):253-255.
69. Sinclair D, Webster MJ, Wong J, Weickert CS. Dynamic molecular and anatomical changes in the glucocorticoid receptor in human cortical development. *Mol Psychiatry*. 2011;16(5):504-515.
70. Andreatza AC, Wang JF, Salmasi F, Shao L, Young LT. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *J Neurochem*. 2013;127(4):552-561.
71. Haroutunian V, Katsel P, Roussos P, Davis KL, Altshuler LL, Bartzokis G. Myelination, oligodendrocytes, and serious mental illness. *Glia*. 2014;62(11):1856-1877.
72. Schmitt A, Malchow B, Hasan A, Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci*. 2014;8:19.
73. Schuurmans C, Kurrasch DM. Neurodevelopmental consequences of maternal distress: What do we really know? *Clin Genet*. 2013;83(2):108-117.
74. Uher R. Gene-environment interactions in severe mental illness. *Front Psychiatry*. 2014;5:48.
75. Chadwick B, Miller ML, Hurd YL. Cannabis use during adolescent development: Susceptibility to psychiatric illness. *Front Psychiatry*. 2013;4:129.
76. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-465.
77. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(5-6):542-548.

78. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: Three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol.* 1997;119(3):260-272.
79. Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: Tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech.* 1994;27(4):278-283.
80. Zerbes RM, Bohnert M, Stroud DA, et al. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture: Cristae morphology and outer membrane interactions differentially depend on mitofilin domains. *J Mol Biol.* 2012;422(2):183-191.
81. John GB, Shang Y, Li L, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1543-1554.
82. von der Malsburg K, Muller JM, Bohnert M, et al. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell.* 2011;21(4):694-707.
83. Bohnert M, Zerbes RM, Davies KM, et al. Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab.* 2015;21(5):747-755.
84. Ding C, Wu Z, Huang L, et al. Mitofilin and CHCHD6 physically interact with Sam50 to sustain cristae structure. *Sci Rep.* 2015;5:16064.
85. Weber TA, Koob S, Heide H, et al. APOOL is a cardiolipin-binding constituent of the mitofilin/MINOS protein complex determining cristae morphology in mammalian mitochondria. *PLoS One.* 2013;8(5):e63683.
86. Guarani V, McNeill EM, Paulo JA, et al. QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife.* 2015;4:10.7554/eLife.06265.
87. Harner M, Korner C, Walther D, et al. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 2011;30(21):4356-4370.
88. An J, Shi J, He Q, et al. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 2012;287(10):7411-7426.
89. Ott C, Ross K, Straub S, et al. Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol.* 2012;32(6):1173-1188.
90. Xie J, Marusich MF, Souda P, Whitelegge J, Capaldi RA. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett.* 2007;581(18):3545-3549.
91. Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, et al. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol.* 2011;195(2):323-340.

92. Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C, Lithgow T. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(11):1044-1048.
93. Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:723-749.
94. Moreno-Lastres D, Fontanesi F, Garcia-Consuegra I, et al. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab.* 2012;15(3):324-335.
95. Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell.* 2008;32(4):529-539.
96. Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(3):311-324.
97. Oexle K, Zwirner A. Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Hum Mol Genet.* 1997;6(6):905-908.
98. Prayson RA, Wang N. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS) syndrome: An autopsy report. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122(11):978-981.
99. Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *Eur Psychiatry.* 2011;26(1):45-56.
100. Altar CA, Jurata LW, Charles V, et al. Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol Psychiatry.* 2005;58(2):85-96.
101. Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet.* 2005;14(2):241-253.
102. Karry R, Klein E, Ben Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: A postmortem study. *Biol Psychiatry.* 2004;55(7):676-684.
103. Cavelier L, Jazin EE, Eriksson I, et al. Decreased cytochrome-c oxidase activity and lack of age-related accumulation of mitochondrial DNA deletions in the brains of schizophrenics. *Genomics.* 1995;29(1):217-224.
104. Maurer I, Zierz S, Moller H. Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001;48(1):125-136.
105. Volz HR, Riehemann S, Maurer I, et al. Reduced phosphodiesterases and high-energy phosphates in the frontal lobe of schizophrenic patients: A ³¹P chemical shift spectroscopic-imaging study. *Biol Psychiatry.* 2000;47(11):954-961.
106. Faizi M, Salimi A, Rasoulzadeh M, Naserzadeh P, Pourahmad J. Schizophrenia induces oxidative stress and cytochrome C release in isolated rat brain mitochondria: A

possible pathway for induction of apoptosis and neurodegeneration. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(Suppl):93-100.

107. Regenold WT, Thapar RK, Marano C, Gavirneni S, Kondapavuluru PV. Increased prevalence of type 2 diabetes mellitus among psychiatric inpatients with bipolar I affective and schizoaffective disorders independent of psychotropic drug use. *J Affect Disord.* 2002;70(1):19-26.

108. Newcomer JW. Abnormalities of glucose metabolism associated with atypical antipsychotic drugs. *J Clin Psychiatry.* 2004;65 Suppl 18:36-46.

109. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, et al. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2000;9(9):1415-1423.

110. Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci.* 2009;29(41):12768-12775.

111. Millar JK, Christie S, Anderson S, et al. Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of disrupted in schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2001;6(2):173-178.

112. Sanchez-Pulido L, Ponting CP. Structure and evolutionary history of DISC1. *Hum Mol Genet.* 2011;20(R2):R175-81.

113. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: Clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet.* 2001;69(2):428-433.

114. Ekelund J, Hovatta I, Parker A, et al. Chromosome 1 loci in finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet.* 2001;10(15):1611-1617.

115. Knickmeyer RC, Wang J, Zhu H, et al. Common variants in psychiatric risk genes predict brain structure at birth. *Cereb Cortex.* 2014;24(5):1230-1246.

116. Carless MA, Glahn DC, Johnson MP, et al. Impact of DISC1 variation on neuroanatomical and neurocognitive phenotypes. *Mol Psychiatry.* 2011;16(11):1096-104, 1063.

117. Kahler AK, Rimol LM, Brown AA, et al. Effect of DISC1 SNPs on brain structure in healthy controls and patients with a history of psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012;159B(6):722-730.

118. Brauns S, Gollub RL, Roffman JL, et al. DISC1 is associated with cortical thickness and neural efficiency. *Neuroimage.* 2011;57(4):1591-1600.

119. Raznahan A, Lee Y, Long R, et al. Common functional polymorphisms of DISC1 and cortical maturation in typically developing children and adolescents. *Mol Psychiatry.* 2011;16(9):917-926.

120. Bora E, Fornito A, Radua J, et al. Neuroanatomical abnormalities in schizophrenia: A multimodal voxelwise meta-analysis and meta-regression analysis. *Schizophr Res.* 2011;127(1-3):46-57.
121. Szczepankiewicz A. Evidence for single nucleotide polymorphisms and their association with bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2013;9:1573-1582.
122. Maeda K, Nwulia E, Chang J, et al. Differential expression of disrupted-in-schizophrenia (DISC1) in bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2006;60(9):929-935.
123. Crepel A, Breckpot J, Fryns JP, et al. DISC1 duplication in two brothers with autism and mild mental retardation. *Clin Genet.* 2010;77(4):389-394.
124. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004;305(5683):525-528.
125. Kvajo M, McKellar H, Arguello PA, et al. A mutation in mouse Disc1 that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(19):7076-7081.
126. Gomez-Sintes R, Kvajo M, Gogos JA, Lucas JJ. Mice with a naturally occurring DISC1 mutation display a broad spectrum of behaviors associated to psychiatric disorders. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:253.
127. Koike H, Arguello PA, Kvajo M, Karayiorgou M, Gogos JA. Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3693-3697.
128. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, et al. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron.* 2007;54(3):387-402.
129. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, et al. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science.* 2005;310(5751):1187-1191.
130. Hennen W, Thomson P, McQuillin A, et al. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2009;14(9):865-873.
131. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry.* 2008;13(1):36-64.
132. Soares DC, Carlyle BC, Bradshaw NJ, Porteous DJ. DISC1: Structure, function, and therapeutic potential for major mental illness. *ACS Chem Neurosci.* 2011;2(11):609-632.
133. Taylor MS, Devon RS, Millar JK, Porteous DJ. Evolutionary constraints on the disrupted in schizophrenia locus. *Genomics.* 2003;81(1):67-77.
134. James R, Adams RR, Christie S, Buchanan SR, Porteous DJ, Millar JK. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. *Mol Cell Neurosci.* 2004;26(1):112-122.

135. Brandon NJ, Schurov I, Camargo LM, et al. Subcellular targeting of DISC1 is dependent on a domain independent from the nudel binding site. *Mol Cell Neurosci*. 2005;28(4):613-624.
136. Schurov IL, Handford EJ, Brandon NJ, Whiting PJ. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry*. 2004;9(12):1100-1110.
137. Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, et al. DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) regulates differentiation of oligodendrocytes. *PLoS One*. 2014;9(2):e88506.
138. Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, et al. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*. 2005;7(12):1167-1178.
139. Dranovsky A, Hen R. DISC1 puts the brakes on neurogenesis. *Cell*. 2007;130(6):981-983.
140. Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, et al. DISC1 regulates cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion and neurite outgrowth. *Mol Psychiatry*. 2010;15(8):778, 798-809.
141. Kang E, Burdick KE, Kim JY, et al. Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron*. 2011;72(4):559-571.
142. Namba T, Kaibuchi K. Switching DISC1 function in neurogenesis: Dixdc1 selects DISC1 binding partners. *Dev Cell*. 2010;19(1):7-8.
143. Wang Q, Charych EI, Pulito VL, et al. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNIK interact to regulate synapse composition and function. *Mol Psychiatry*. 2011;16(10):1006-1023.
144. Singh KK, Ge X, Mao Y, et al. Dixdc1 is a critical regulator of DISC1 and embryonic cortical development. *Neuron*. 2010;67(1):33-48.
145. Atkin TA, MacAskill AF, Brandon NJ, Kittler JT. Disrupted in schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons. *Mol Psychiatry*. 2011;16(2):122-4, 121.
146. Park YU, Jeong J, Lee H, et al. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with mitofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(41):17785-17790.
147. Ogawa F, Malavasi EL, Crummie DK, et al. DISC1 complexes with TRAK1 and Miro1 to modulate anterograde axonal mitochondrial trafficking. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):906-919.
148. Norkett R, Modi S, Birsa N, et al. DISC1-dependent regulation of mitochondrial dynamics controls the morphogenesis of complex neuronal dendrites. *J Biol Chem*. 2016;291(2):613-629.

149. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):W305-11.
150. Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991;199(2):223-231.
151. Soderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, et al. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods.* 2008;45(3):227-232.
152. Manfredi G, Yang L, Gajewski CD, Mattiazzi M. Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods.* 2002;26(4):317-326.
153. Marques SM, Esteves da Silva JC. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life.* 2009;61(1):6-17.
154. Li Z, Graham BH. Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol Biol.* 2012;837:63-72.
155. Hofhaus G, Johns DR, Hurko O, Attardi G, Chomyn A. Respiration and growth defects in trans-mitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with leber's hereditary optic neuropathy. *J Biol Chem.* 1996;271(22):13155-13161.
156. Scaduto RC, Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999;76(1 Pt 1):469-477.
157. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. *BioTechniques.* 2011;50(2):98-115.
158. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(7-8):518-529.
159. Podlesniy P, Figueiro-Silva J, Llado A, et al. Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2013;74(5):655-668.
160. Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology.* 2009;150(7):3392-3400.
161. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(8):597-608.
162. Erdemir HH, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 binds to estrogen receptor- α and modulates its function. *J Biol Chem.* 2014;289(13):9100-9112.
163. Pathmanathan S, Hamilton E, Atcheson E, Timson DJ. The interaction of IQGAPs with calmodulin-like proteins. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):694-699.

164. Chan SR, Vermi W, Luo J, et al. STAT1-deficient mice spontaneously develop estrogen receptor alpha-positive luminal mammary carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R16.
165. Imada K, Leonard WJ. The jak-STAT pathway. *Mol Immunol.* 2000;37(1-2):1-11.
166. Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors.* 2009;35(1):76-81.
167. Flory MR, Moser MJ, Monnat RJ, Jr, Davis TN. Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5919-5923.
168. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet.* 2008;45(11):704-709.
169. Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, et al. Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet.* 2012;91(3):489-501.
170. Bedzhov I, Liszewska E, Kanzler B, Stemmler MP. Igf1r signaling is indispensable for preimplantation development and is activated via a novel function of E-cadherin. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002609.
171. Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):189-200.
172. Black AR, Black JD. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front Immunol.* 2013;3:423.
173. Gao Y, Pagnon J, Feng HC, et al. Secretion of the glucose-regulated selenoprotein SEPS1 from hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(3):636-641.
174. Lundell KH, Sabel KG, Eriksson BO. Plasma metabolites after a lipid load in infants with congenital heart disease. *Acta Paediatr.* 1999;88(7):718-723.
175. Sillekens PT, Beijer RP, Habets WJ, van Verooij WJ. Molecular cloning of the cDNA for the human U2 snRNA-specific A' protein. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(5):1893-1906.
176. Zhou P, He A, Pu WT. Regulation of GATA4 transcriptional activity in cardiovascular development and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2012;100:143-169.
177. Creemers JW, Groot Kormelink PJ, Roebroek AJ, Nakayama K, Van de Ven WJ. Proprotein processing activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS Lett.* 1993;336(1):65-69.
178. Gu HM, Zhang DW. Hypercholesterolemia, low density lipoprotein receptor and proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9. *J Biomed Res.* 2015;29(5):356-361.

179. Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, et al. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development*. 2011;138(2):371-384.
180. Gianfrancesco F, Esposito T, Penco S, et al. ZPLD1 gene is disrupted in a patient with balanced translocation that exhibits cerebral cavernous malformations. *Neuroscience*. 2008;155(2):345-349.
181. Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, et al. TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell*. 2012;150(4):697-709.
182. Ding W, Li C, Hu T, et al. EGF receptor-independent action of TGF- α protects Naked2 from A07-mediated ubiquitylation and proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13433-13438.
183. Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(11):826-838.
184. Knutson M, Menzies S, Connor J, Wessling-Resnick M. Developmental, regional, and cellular expression of SFT/Ubch5A and DMT1 mRNA in brain. *J Neurosci Res*. 2004;76(5):633-641.
185. Fiesel FC, Moussaud-Lamodièrè EL, Ando M, Springer W. A specific subset of E2 ubiquitin-conjugating enzymes regulate parkin activation and mitophagy differently. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 16):3488-3504.
186. Basseres DS, Tizzei EV, Duarte AA, Costa FF, Saad ST. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal rho-GTPase activating protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294(3):579-585.
187. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*. 2014;137(Pt 8):2329-2345.
188. Yang RF, Sun LH, Zhang R, et al. Suppression of Mic60 compromises mitochondrial transcription and oxidative phosphorylation. *Sci Rep*. 2015;5:7990.
189. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: A screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;48(2):122-126.
190. Aguer C, Gambarotta D, Mailloux RJ, et al. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28536.
191. Mao Y, Ge X, Frank CL, et al. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 β /beta-catenin signaling. *Cell*. 2009;136(6):1017-1031.

192. Agholme L, Lindstrom T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1069-1082.
193. Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* 2001;76(1):1-10.
194. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.* 1995;270(25):14843-14846.
195. Schneider L, Giordano S, Zelickson BR, et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(11):2007-2017.
196. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6(5):513-519.
197. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol.* 2001;63(1):29-60.
198. Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(4):305-319.
199. Seeman MV. The role of estrogen in schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 1996;21(2):123-127.
200. Meinhard N, Kessing LV, Vinberg M. The role of estrogen in bipolar disorder, a review. *Nord J Psychiatry.* 2014;68(2):81-87.
201. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
202. Lango H, Weedon MN. What will whole genome searches for susceptibility genes for common complex disease offer to clinical practice? *J Intern Med.* 2008;263(1):16-27.
203. Jayaraman A, Jamil K, Khan HA. Identifying new targets in leukemogenesis using computational approaches. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(5):610-622.
204. Zhan Y, Zhang R, Lv H, et al. Prioritization of candidate genes for periodontitis using multiple computational tools. *J Periodontol.* 2014;85(8):1059-1069.
205. Allan GJ, Flint DJ, Patel K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction.* 2001;122(1):31-39.
206. Lopez IP, Rodriguez-de la Rosa L, Pais RS, et al. Differential organ phenotypes after postnatal Igf1r gene conditional deletion induced by tamoxifen in UBC-CreERT2; Igf1r fl/fl double transgenic mice. *Transgenic Res.* 2015;24(2):279-294.

207. Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE. Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (review). *Mol Med Rep*. 2014;10(2):579-584.
208. Farabaugh SM, Boone DN, Lee AV. Role of IGF1R in breast cancer subtypes, stemness, and lineage differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:59.
209. Davidsson J, Collin A, Bjorkhem G, Soller M. Array based characterization of a terminal deletion involving chromosome subband 15q26.2: An emerging syndrome associated with growth retardation, cardiac defects and developmental delay. *BMC Med Genet*. 2008;9:2-2350-9-2.
210. Sallin P, Jazwinska A. Acute stress is detrimental to heart regeneration in zebrafish. *Open Biol*. 2016;6(3):10.1098/rsob.160012.
211. Bornstein P, Kyriakides TR, Yang Z, Armstrong LC, Birk DE. Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):61-66.
212. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):961-968.
213. Sun R, Wu J, Chen Y, et al. Down regulation of Thrombospondin2 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Mol Cancer*. 2014;13:225-4598-13-225.
214. Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics*. 2010;3:51-8794-3-51.
215. Meng H, Zhang X, Hankenson KD, Wang MM. Thrombospondin 2 potentiates notch3/jagged1 signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(12):7866-7874.
216. Galli D, Gobbi G, Carrubbi C, et al. The role of PKCepsilon-dependent signaling for cardiac differentiation. *Histochem Cell Biol*. 2013;139(1):35-46.
217. Dowling CM, Kiely PA. Targeting protein kinase C downstream of growth factor and adhesion signalling. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1271-1291.
218. Xu Y, Li Z, Zhang C, Zhang S, Ji Y, Chen F. Knockdown of PKCepsilon expression inhibits growth, induces apoptosis and decreases invasiveness of human glioma cells partially through Stat3. *J Mol Neurosci*. 2015;55(1):21-31.
219. Song M, Matkovich SJ, Zhang Y, Hammer DJ, Dorn GW, 2nd. Combined cardiomyocyte PKCdelta and PKCepsilon gene deletion uncovers their central role in restraining developmental and reactive heart growth. *Sci Signal*. 2015;8(373):ra39.
220. Budas G, Costa HM, Jr, Ferreira JC, et al. Identification of epsilonPKC targets during cardiac ischemic injury. *Circ J*. 2012;76(6):1476-1485.

221. Tronche F, Yaniv M. HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays*. 1992;14(9):579-587.
222. Raaijmakers A, Corveleyn A, Devriendt K, et al. Criteria for HNF1B analysis in patients with congenital abnormalities of kidney and urinary tract. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(5):835-842.
223. Heidet L, Decramer S, Pawtowski A, et al. Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(6):1079-1090.
224. Hu YL, Zhong D, Pang F, et al. HNF1b is involved in prostate cancer risk via modulating androgenic hormone effects and coordination with other genes. *Genet Mol Res*. 2013;12(2):1327-1335.
225. Fradejas N, Serrano-Perez Mdel C, Tranque P, Calvo S. Selenoprotein S expression in reactive astrocytes following brain injury. *Glia*. 2011;59(6):959-972.
226. Alanne M, Kristiansson K, Auro K, et al. Variation in the selenoprotein S gene locus is associated with coronary heart disease and ischemic stroke in two independent finnish cohorts. *Hum Genet*. 2007;122(3-4):355-365.
227. Constam DB, Robertson EJ. SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev*. 2000;14(9):1146-1155.
228. Herbst A, Helferich S, Behrens A, Goke B, Kolligs FT. The transcription factor ITF-2A induces cell cycle arrest via p21(Cip1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(4):736-740.
229. Shin HW, Choi H, So D, et al. ITF2 prevents activation of the beta-catenin-TCF4 complex in colon cancer cells and levels decrease with tumor progression. *Gastroenterology*. 2014;147(2):430-442.e8.
230. Appaiah H, Bhat-Nakshatri P, Mehta R, Thorat M, Badve S, Nakshatri H. ITF2 is a target of CXCR4 in MDA-MB-231 breast cancer cells and is associated with reduced survival in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(6):600-614.
231. Zhang KK, Xiang M, Zhou L, et al. Gene-network and familial analyses uncover a gene network involving Tbx5/Osr1/Pcsk6 interaction in the second heart field for atrial septation. *Hum Mol Genet*. 2016.
232. Jain R, Li D, Gupta M, et al. HEART DEVELOPMENT. integration of bmp and wnt signaling by hopx specifies commitment of cardiomyoblasts. *Science*. 2015;348(6242):aaa6071.
233. Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2011;91(2):279-288.

234. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999;294(5):1351-1362.
235. Chio II, Sasaki M, Ghazarian D, et al. TRADD contributes to tumour suppression by regulating ULF-dependent p19Arf ubiquitylation. *Nat Cell Biol.* 2012;14(6):625-633.
236. Kajiro M, Tsuchiya M, Kawabe Y, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PLoS One.* 2011;6(10):e25871.
237. An CI, Ganio E, Hagiwara N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet Muscle.* 2013;3(1):11-5040-3-11.
238. Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. The sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(17):3365-3372.
239. Batista-Brito R, Rossignol E, Hjerling-Leffler J, et al. The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development. *Neuron.* 2009;63(4):466-481.
240. Azim E, Jabaudon D, Fame RM, Macklis JD. SOX6 controls dorsal progenitor identity and interneuron diversity during neocortical development. *Nat Neurosci.* 2009;12(10):1238-1247.
241. Lee KE, Seo J, Shin J, et al. Positive feedback loop between Sox2 and Sox6 inhibits neuronal differentiation in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2794-2799.
242. Smits P, Li P, Mandel J, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* 2001;1(2):277-290.
243. O'Roak BJ, Stessman HA, Boyle EA, et al. Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat Commun.* 2014;5:5595.
244. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11364-11369.
245. Rousset R, Mack JA, Wharton KA, Jr, et al. Naked cuticle targets dishevelled to antagonize wnt signal transduction. *Genes Dev.* 2001;15(6):658-671.
246. Hu T, Li C, Cao Z, et al. Myristoylated Naked2 antagonizes wnt-beta-catenin activity by degrading dishevelled-1 at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13561-13568.
247. Asamitsu K, Tetsuka T, Kanazawa S, Okamoto T. RING finger protein AO7 supports NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of the p65 subunit. *J Biol Chem.* 2003;278(29):26879-26887.

248. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, et al. The angelman syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*. 2010;140(5):704-716.
249. Basel-Vanagaite L, Dallapiccola B, Ramirez-Solis R, et al. Deficiency for the ubiquitin ligase UBE3B in a blepharophimosis-ptosis-intellectual-disability syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;91(6):998-1010.
250. Smith SE, Zhou YD, Zhang G, Jin Z, Stoppel DC, Anderson MP. Increased gene dosage of Ube3a results in autism traits and decreased glutamate synaptic transmission in mice. *Sci Transl Med*. 2011;3(103):103ra97.
251. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004;10 Suppl:S10-7.
252. Malliri A, Collard JG. Role of rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):583-589.
253. Lv L, Xu J, Zhao S, et al. Sequence analysis of a human RhoGAP domain-containing gene and characterization of its expression in human multiple tissues. *DNA Seq*. 2007;18(3):184-189.
254. David MD, Petit D, Bertoglio J. The RhoGAP ARHGAP19 controls cytokinesis and chromosome segregation in T lymphocytes. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 2):400-410.
255. Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol*. 2003;162(7):1267-1279.
256. Selemon LD, Goldman-Rakic PS. The reduced neuropil hypothesis: A circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1999;45(1):17-25.
257. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: Systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43(1):14-24.
258. Masoller N, Sanz-CorteS M, Crispi F, et al. Mid-gestation brain doppler and head biometry in fetuses with congenital heart disease predict abnormal brain development at birth. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(1):65-73.
259. Clouchoux C, du Plessis AJ, Bouyssi-Kobar M, et al. Delayed cortical development in fetuses with complex congenital heart disease. *Cereb Cortex*. 2013;23(12):2932-2943.
260. Miller SP, McQuillen PS, Hamrick S, et al. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1928-1938.
261. Limperopoulos C, Tworetzky W, McElhinney DB, et al. Brain volume and metabolism in fetuses with congenital heart disease: Evaluation with quantitative magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Circulation*. 2010;121(1):26-33.

262. Licht DJ, Shera DM, Clancy RR, et al. Brain maturation is delayed in infants with complex congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(3):529-36; discussion 536-7.
263. Miller SP, Ferriero DM, Leonard C, et al. Early brain injury in premature newborns detected with magnetic resonance imaging is associated with adverse early neurodevelopmental outcome. *J Pediatr.* 2005;147(5):609-616.
264. Homsy J, Zaidi S, Shen Y, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science.* 2015;350(6265):1262-1266.
265. Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2011;286(4):2918-2932.
266. Genin EC, Plutino M, Bannwarth S, et al. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med.* 2015;8(1):58-72.
267. Ott C, Dorsch E, Fraunholz M, Straub S, Kozjak-Pavlovic V. Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120213.
268. Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M. Mitofilin complexes: Conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol Chem.* 2012;393(11):1247-1261.
269. Bohnert M, Wenz LS, Zerbes RM, et al. Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell.* 2012;23(20):3948-3956.
270. Huynen MA, Muhlmeister M, Gotthardt K, Guerrero-Castillo S, Brandt U. Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(1):91-101.
271. Li H, Ruan Y, Zhang K, et al. Mic60/mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ.* 2016;23(3):380-392.
272. Chang CC, Jou SH, Lin TT, Liu CS. Mitochondrial DNA variation and increased oxidative damage in euthymic patients with bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2014;68(7):551-557.
273. Bornhovd C, Vogel F, Neupert W, Reichert AS. Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem.* 2006;281(20):13990-13998.

274. Davies KM, Strauss M, Daum B, et al. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(34):14121-14126.
275. Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR, Kuhlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*. 2008;27(7):1154-1160.
276. Koob S, Barrera M, Anand R, Reichert AS. The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(7):1551-1563.
277. Yang RF, Zhao GW, Liang ST, et al. Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;428(1):93-98.
278. Shi XF, Kondo DG, Sung YH, et al. Frontal lobe bioenergetic metabolism in depressed adolescents with bipolar disorder: A phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy study. *Bipolar Disord*. 2012;14(6):607-617.
279. Goh S, Dong Z, Zhang Y, DiMauro S, Peterson BS. Mitochondrial dysfunction as a neurobiological subtype of autism spectrum disorder: Evidence from brain imaging. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(6):665-671.
280. Chojnacka M, Gornicka A, Oeljeklaus S, Warscheid B, Chacinska A. Cox17 protein is an auxiliary factor involved in the control of the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Biol Chem*. 2015;290(24):15304-15312.
281. Friedman JR, Mourier A, Yamada J, McCaffery JM, Nunnari J. MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife*. 2015;4:10.7554/eLife.07739.
282. Paumard P, Vaillier J, Couлары B, et al. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J*. 2002;21(3):221-230.
283. Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216(2):473-482.
284. Green PS, Bishop J, Simpkins JW. 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci*. 1997;17(2):511-515.
285. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, et al. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(11):1253-1258.
286. Gogos A, Sbisà AM, Sun J, Gibbons A, Udawela M, Dean B. A role for estrogen in schizophrenia: Clinical and preclinical findings. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:615356.
287. Weickert TW, Allen KM, Weickert CS. Potential role of oestrogen modulation in the treatment of neurocognitive deficits in schizophrenia. *CNS Drugs*. 2016;30(2):125-133.

288. Ritsner MS, Gibel A, Ratner Y, Tsinovoy G, Strous RD. Improvement of sustained attention and visual and movement skills, but not clinical symptoms, after dehydroepiandrosterone augmentation in schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Psychopharmacol*. 2006;26(5):495-499.
289. Weickert TW, Weinberg D, Lenroot R, et al. Adjunctive raloxifene treatment improves attention and memory in men and women with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2015;20(6):685-694.
290. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol*. 1994;140(3):256-261.
291. Maki PM. Potential importance of early initiation of hormone therapy for cognitive benefit. *Menopause*. 2006;13(1):6-7.
292. Seira O, Del Rio JA. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) at the tip of neuronal development and regeneration. *Mol Neurobiol*. 2014;49(2):931-944.
293. Cole AR. Glycogen synthase kinase 3 substrates in mood disorders and schizophrenia. *FEBS J*. 2013;280(21):5213-5227.
294. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 inhibitors: Preclinical and clinical focus on CNS. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:32.
295. Kulkarni J, Gavrilidis E, Worsley R, Hayes E. Role of estrogen treatment in the management of schizophrenia. *CNS Drugs*. 2012;26(7):549-557.
296. Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, et al. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J Pediatr*. 2010;156(5):810-7, 817.e1-817.e4.
297. Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, et al. Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135(3-4):251-259.
298. Serra-Juhe C, Rodriguez-Santiago B, Cusco I, et al. Contribution of rare copy number variants to isolated human malformations. *PLoS One*. 2012;7(10):e45530.
299. Zhao W, Niu G, Shen B, et al. High-resolution analysis of copy number variants in adults with simple-to-moderate congenital heart disease. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(12):3087-3094.
300. Osoegawa K, Iovannisci DM, Lin B, et al. Identification of novel candidate gene loci and increased sex chromosome aneuploidy among infants with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(2):397-406.
301. Schmid M, Stary S, Blaicher W, Gollinger M, Husslein P, Streubel B. Prenatal genetic diagnosis using microarray analysis in fetuses with congenital heart defects. *Prenat Diagn*. 2012;32(4):376-382.

302. Priest JR, Girirajan S, Vu TH, Olson A, Eichler EE, Portman MA. Rare copy number variants in isolated sporadic and syndromic atrioventricular septal defects. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(6):1279-1284.
303. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, et al. Rare copy number variations in adults with tetralogy of fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002843.
304. Payne AR, Chang SW, Koenig SN, Zinn AR, Garg V. Submicroscopic chromosomal copy number variations identified in children with hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2012;33(5):757-763.
305. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J*. 2007;28(22):2778-2784.
306. Warburton D, Ronemus M, Kline J, et al. The contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart disease. *Hum Genet*. 2014;133(1):11-27.
307. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of fallot. *Nat Genet*. 2009;41(8):931-935.
308. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Struble CA, et al. Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations. *Physiol Genomics*. 2012;44(9):518-541.
309. Glessner JT, Wang K, Cai G, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*. 2009;459(7246):569-573.
310. Goldmuntz E, Paluru P, Glessner J, et al. Microdeletions and microduplications in patients with congenital heart disease and multiple congenital anomalies. *Congenit Heart Dis*. 2011;6(6):592-602.
311. Hitz MP, Lemieux-Perreault LP, Marshall C, et al. Rare copy number variants contribute to congenital left-sided heart disease. *PLoS Genet*. 2012;8(9):e1002903.
312. Fakhro KA, Choi M, Ware SM, et al. Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2915-2920.