

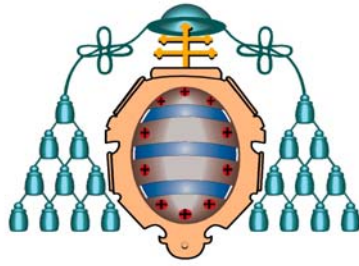
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado de Neurociencias

***Espectro mutacional de los genes ATL1, SPAST y SPG7 e  
influencia de la variación genética mitocondrial en pacientes  
españoles con paraparesia espástica hereditaria***

Elena Sánchez Ferrero





UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado de Neurociencias

***Espectro mutacional de los genes *ATL1*, *SPAST* y *SPG7* e influencia de la variación genética mitocondrial en pacientes españoles con paraparesia espástica hereditaria***

Elena Sánchez Ferrero



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Espectro mutacional de los genes <i>ATL1</i> , <i>SPAST</i> y <i>SPG7</i> e influencia de la variación genética mitocondrial en pacientes españoles con paraparesia espástica hereditaria	Inglés: Mutational spectrum of <i>ATL1</i> , <i>SPAST</i> and <i>SPG7</i> genes and mitochondrial genetics variation influence in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia
2.- Autor	
Nombre: Elena Sánchez Ferrero	
Programa de Doctorado: Neurociencias	
Órgano responsable: Departamento de Morfología y Biología Celular	

### RESUMEN (en español)

La Paraparesia Espástica Hereditaria (PEH) agrupa un conjunto de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por una dificultad insidiosa, progresiva, en ocasiones severa, para la marcha. Todos ellos están relacionados, clínica y patológicamente, y su rasgo común es la degeneración retrógrada de los axones más largos del tracto corticoespinal (TCE) y las columnas dorsales de la médula espinal. Esto ocasiona un síndrome piramidal caracterizado por la aparición de paresia y espasticidad crecientes en los miembros inferiores. Algunos pacientes desarrollan además síntomas adicionales, neurológicos o no, como ictiosis, neuropatía periférica o síndrome cerebeloso. También existe una gran variabilidad en cuanto al grado de afectación, la edad de inicio de los síntomas y la velocidad de progresión de la enfermedad.

Esta heterogeneidad clínica se debe, en parte, a las bases genéticas de la enfermedad ya que hasta el momento se han descrito 48 *loci* asociados a la enfermedad, para los que se han descubierto 27 genes. Sus mutaciones afectan a diversas funciones intracelulares como el transporte intracelular, la biogénesis de los orgánulos membranosos o la función mitocondrial. El patrón de herencia puede ser autosómico dominante (PEH-AD), autosómico recesivo (PEH-AR) o ligado al cromosoma X en función del *locus*, e incluso se ha descrito una forma de herencia materna ligada a una mutación en el genoma mitocondrial. Las formas dominantes son las más frecuentes en los países occidentales, donde comprenden casi el 80% de los casos; mientras que las formas recesivas constituyen alrededor del 15% y el 5% restante correspondería al resto de patrones de herencia (ligada al sexo, mitocondriales). También se ha descrito que aproximadamente un 5-10% pacientes sin antecedentes familiares o esporádicos son portadores de mutaciones en alguno de los genes ya identificados. Destacan los genes *SPAST/SPG4* y *ATL1/SPG3A*, pues en conjunto se encuentran mutados en alrededor del 50% de las formas dominantes. El gen *SPAST* se asocia al 40% de los casos de PEH-AD y codifica para la proteína espastina, una ATPasa de la familia de las AAA, con diversas isoformas e implicada en el corte de microtúbulos, el transporte intracelular y el remodelado de ciertos orgánulos. El gen *ATL1* codifica para la atlastina-1, una GTPasa que participa en la biogénesis del retículo endoplásmico y resulta esencial en el desarrollo de nuevas neuritas. Se estima que sus mutaciones afectan al 10% de los casos dominantes y suele asociarse a una edad de inicio juvenil inferior a los 20 años. Un gen mutado tanto en formas recesivas como esporádicas es *SPG7*. Éste codifica para la paraplegina que forma parte del complejo mAAA y participa en la síntesis y degradación de algunos componentes de los complejos respiratorios y los ribosomas mitocondriales.

Por otro lado, la elevada frecuencia de casos aparentemente esporádicos y el hallazgo de familias con una gran heterogeneidad fenotípica, sugieren la existencia de factores ambientales



o genéticos capaces de modular el desarrollo de la enfermedad. La genética mitocondrial podría ser una fuente de heterogeneidad clínica ya que numerosas mutaciones asociadas a la PEH se encuentran en genes codificantes de proteínas mitocondriales (*SPG7*, *Hsp60* y *ATP6*) y muchos casos de fenotipo complicado presentan similitudes con ciertos desórdenes mitocondriales. Además numerosos estudios han relacionado diferentes haplogrupos, o combinaciones de polimorfismos del genoma mitocondrial, con la etiología de otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o de Huntington.

En base a estos datos establecimos como objetivo general de este estudio determinar la frecuencia, tipo y correlación con el fenotipo clínico de las mutaciones en los genes *SPAST/SPG4*, *ATL1/SPG3A* y *SPG7* en una cohorte de pacientes españoles con PEH, y establecer si los haplogrupos mitocondriales pueden actuar como factor de riesgo y/o modular el fenotipo de la enfermedad.

En el estudio se incluyeron 511 pacientes españoles diagnosticados de PEH y no emparentados entre sí. También se incluyó una población control de 400 individuos sin historial de enfermedad neurológica. Para cada individuo se recopiló la información clínica relevante así como una muestra de ADN extraída a partir de sangre periférica. Cada gen fue analizado, en un conjunto de pacientes seleccionados por sus características clínicas, mediante secuenciación automática y MLPA. En aquellos casos en que se halló una variante potencialmente patogénica se procedió a su caracterización mediante el estudio de la segregación con la enfermedad en los familiares disponibles y el análisis de la población control. También se utilizaron herramientas bioinformáticas para realizar predicciones del efecto de estas nuevas variantes en la estructura y función del ARN mensajero o la proteína codificados por el gen. Para analizar la influencia de la variación mitocondrial seleccionamos los polimorfismos mitocondriales determinantes de los haplogrupos más comunes y los analizamos mediante digestión enzimática. El análisis de las frecuencias de las diferentes variantes halladas y su correlación con las diferentes variables clínicas se realizó mediante el paquete estadístico SPSS, recurriendo a los tests de Chi-cuadrado y ANOVA en función de las necesidades.

Entre los resultados de este estudio cabe destacar que, aunque nuestra serie de pacientes es similar a otras poblaciones caucásicas en cuanto a su estructura genética y características clínicas, presenta un porcentaje de casos juveniles y de casos con herencia recesiva y fenotipo puro mayores que en otras poblaciones. El gen *SPAST* fue el más frecuentemente mutado en la población española y presentó una mayor penetrancia entre los hombres. Las mutaciones en el gen *ATL1* se asociaron a una edad de inicio juvenil y destacó la mutación p.Arg239Cys como punto caliente mutacional. El análisis de los genes *SPAST* y *SPG7* mediante la técnica de MLPA es imprescindible en casos con claros antecedentes familiares, dada la frecuencia relativamente alta de grandes reordenamientos hallados. Hallamos una asociación entre las mutaciones en *SPG7* y un patrón de herencia dominante con penetrancia incompleta mientras que su asociación al desarrollo de fenotipo complicado fue menor a la descrita en otras poblaciones. Además confirmamos el efecto deletéreo del alelo p.510Val del gen *SPG7* en presencia de otras mutaciones y su papel como factor de riesgo para el desarrollo de PEH. Un 9% de los pacientes esporádicos o de historia familiar desconocida fueron portadores de mutaciones en uno de los 3 genes analizados, por lo que sería recomendable abordar su estudio molecular aún en ausencia de antecedentes familiares. Finalmente, los haplogrupos mitocondriales europeos más comunes no contribuirían a la patogenia de la PEH en la población española. Sin embargo, tanto el haplogrupo J como el polimorfismo mitocondrial que lo define (m.A10398G) parecieron relacionarse con desarrollo de síntomas adicionales.



## RESUMEN (en Inglés)

Hereditary Spastic Paraplegia (HSP) englobes a group of neurodegenerative disorders characterized by a progressive –can become severe- difficulty in walking. These disorders are clinically and pathologically related and their common feature is the “dying-back” axonopathy that affects the longest axons of the corticospinal tract and the dorsal columns of the spinal cord. This retrograde degeneration causes a pyramidal syndrome characterized by an insidiously progressive weakness of the lower-extremities and spasticity in the legs. Some patients present additional neurological or non-neurological symptoms such as ichthyosis, peripheral neuropathy or cerebellar syndrome. Besides, the age of the patient, speed and degree of the patient’s symptoms vary greatly.

This clinical heterogeneity is partly due to the genetics of the disorder. At this moment 48 *loci* had been related to HSP and 27 genes have been discovered. Mutations in these genes affect different intracellular functions such as intracellular cargo transport, membranous organelles biogenesis or mitochondrial function. HSP may be transmitted in an autosomal dominant (AD-HSP), autosomal recessive (AR-HSP) or X-linked manner depending on the *locus*. Even maternally inherited form, related to a mutation on mitochondrial genome, has been described. Dominant forms are most frequent on occidental countries, accounting for almost 80% of cases; while recessive forms and other inherited patterns correspond to 15% and 5% of cases (X-linked and mitochondrial forms), respectively. Some data point out that around 5-10% of sporadic cases or patients without a family history of the disease present a mutation in any of the already known genes. Overall, *SPAST/SPG4* y *ATL1/SPG3A* genes related cases correspond to 50% of AD-HSP. *SPAST* is associated to 40% of dominant cases and encodes spastin protein, an AAA family ATPase, with several isoforms and implicated in microtubules severing, intracellular transport and certain organelles shaping. *ATL1* encodes atlastin-1 protein, a GTPase participating in endoplasmic reticulum biogenesis that is critical for new neurites growing. Mutations in *ATL1* are associated to the 10% of dominant cases in our cohort and are related to a juvenile onset, under 20 years-old. *SPG7* is mutated among recessive and sporadic cases. It encodes paraplegin, a component of the mAAA complex that takes part in the synthesis and degradation of some respiratory complex and mitochondrial ribosomes proteins.

However, the high frequency of apparently sporadic cases and the existence of phenotypically heterogeneous families suggest the influence of different environmental and genetic factors on the progression of the disease. Mitochondrial genetics could be a source of such clinical heterogeneity as several HSP associated mutations had been found in genes encoding mitochondrial proteins (*SPG7*, *Hsp60* y *ATP6*) and many additional symptoms resemble those present in patients with mitochondrial disorders. Besides, several studies had yet related some haplogroups, or mitochondrial polymorphisms combinations, with different neurodegenerative disorders etiology, like Parkinson’s or Huntington’s diseases.

Based on these data we decide to determine *SPAST/SPG4*, *ATL1/SPG3A* and *SPG7* genes mutation frequency, type and correlation to clinical phenotype in a Spanish cohort of HSP patients, and to establish the influence of mitochondrial haplogroups on the disease by acting as a risk factor or modulating the phenotype.

The study included 511 HSP Spanish non-related patients and a control population of 400 individuals without a history of neurologic disease. We obtained the clinical information and a peripheral blood purified DNA sample of each individual. We analyzed each gene, in a group of patients selected by their clinical characteristics, by means of automatic sequencing and MLPA. We analyzed the familial segregation and the control population for every potentially pathogenic variant found. We also utilized bioinformatic tools to predict the effect of those new variants on the structure and function of the messenger ARN and the protein encoded by the affected gene. To analyze the influence of mitochondrial variation we selected the mitochondrial polymorphisms that determined the most common European haplogroups and analyzed it by enzymatic digestion. The analysis of each variant frequency and its correlation to the different clinical variables was performed using the SPSS statistics program, using the Chi-squared and ANOVA tests.



Although the genetic structure and clinical characteristics of our HSP patients resemble those described in other Caucasian populations, the percentage of juvenile cases and patients with recessive inheritance and pure phenotype is higher than in other cohorts. *SPAST* gene is the most frequently mutated gene in Spanish patients and presents a higher penetrance among men. *ATL1* mutations are associated to a juvenile age at onset and p.Arg239Cys is highlighted as a mutational hotspot. *SPAST* and *SPG7* analysis by MLPA technique seems to be essential in cases with a clear family history, due to the relatively high frequency of rearrangements found. There is an association among *SPG7* mutations and AD-HSP with an incomplete penetrance while its association to complicated phenotype development is lower than that observed in other populations. Furthermore, we confirmed the deleterious effect of p.510Val allele in *SPG7* in presence of other mutations and its paper as a risk factor for HSP development. 9% of the sporadic patients or cases with an unknown family history carry a mutation in one of the three studied genes, pointing to the necessity of addressing their molecular study even in the absence of a family history. Finally, the mitochondrial haplogroups most common in Europe do not seem to contribute to HSP pathogeny in the Spanish population. However, both haplogroup J and the mitochondrial polymorphism that defines it (m.A10398G) seem to be related with the development of additional symptoms.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA CELULAR

Lo que sabemos es una gota de agua,  
lo que ignoramos es el océano.

Sir Isaac Newton





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha supuesto mi iniciación en el mundo de la investigación científica y un proceso de aprendizaje constante. Por ello quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que me han acompañado y que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de este trabajo.

Antes de nada quiero dar las gracias a mi directora de tesis la Dra. Victoria Álvarez y al Dr. Eliecer Coto, por darme la oportunidad de iniciar con ellos mi carrera profesional, permitiéndome participar en este y en otros estudios, y por su contribución a la elaboración de la presente tesis.

Tampoco puedo ni quiero olvidarme de los miembros de la “Asociación Parkinson Asturias”, no solo porque su beca de investigación supuso el comienzo de mi labor en el Laboratorio de Genética Molecular, sino por la calidad humana de sus miembros.

A los componentes del laboratorio, aunque algunos ya no están: Maria José, Nacho, Pelayo, Cecilia, Mónica, Blanca, Vero, Loli, Antonio, Cristina, Ana Miar, Sara, Katia y, sobre todo, Ana Corao, Marta y Belén por contribuir directa o indirectamente a este trabajo y por acompañarme en el día a día. No puedo evitar hacer una mención especial para aquellos a quienes he tenido más cerca y que más ayuda me han brindado: Isabel, Cristina, María, Lorena, Beatriz, Lucía y Juan. Ha sido un auténtico placer trabajar con ellos a mi lado.

A toda la familia y los amigos que me ha apoyado de principio a fin. Por suerte es una lista interminable pero no puedo dejar de mencionar a Elena, Lorena, Ester, Patricia y Jhudit. Por último, gracias a mis padres pues sin ellos habría sido imposible llegar hasta aquí.



## ABREVIATURAS

3'UTR: *3' untranslated region*

°C: grados centígrados

μl: microlitro

AAA: ATPasas asociadas a diversas actividades celulares

AD: autosómico dominante

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ANOVA: Análisis de la Varianza

AR: autosómico recesivo

ARN: ácido ribonucleico

AFG3L2: *ATPase family gene 3-like 2*

AG: Aparato de Golgi

ATP: Adenosín trifosfato

BMP: *Bone morphogenetic proteins*

BMPRII: *Bone morphogenetic proteins receptor type 2*

cDNA: ADN complementario

CHMP1B: *Charged multivesicular body protein 1B*

DT: desviación típica

ED: edad al diagnóstico de la PEH

EI: edad de inicio de los síntomas

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

ERLIN2: *Endoplasmic reticulum lipid raft associated 2*

GABA: Ácido gama-amino butírico

GBP1: *Guanilate binding protein 1*

GDP: *Guanosín difosfato*

GMP: *Guanosín monofosfato*

GTP: *Guanosín trifosfato*

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

HR: *Hydrophobic region*

Hsp60: *Heat-shock protein 60 KDa*

KIF5A: *Kinesin heavy chain isoform 5A*

l: litro

LHON: *Leber hereditary optic neuropathy*

L1CAM: *L1 cell adhesion molecule*

M1: Isoforma larga de la proteína espastina con inicio de traducción en la Metionina1

M87: Isoforma corta de la proteína espastina con inicio de traducción en la Metionina87

m-AAA: Complejo AAA mitocondrial

Mb: Megabases

mg: miligramos

MIT: *Domain contained within microtubule-interacting and trafficking molecules*

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MrpL32: *Mitochondrial ribosomal protein L32*

MTBD: *Microtubule binding domain*

NA14: *Nuclear autoantigen of 14 kDa*

NIPA1: *Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome region protein 1*

NES: *Nuclear exportation signal*

NLS: *Nuclear localization signal*

pb: pares de bases

PEH: Paraparesia espástica hereditaria

PCR: *polymerase chain reaction*

PCR-RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

PLP1: *Proteolipid protein 1*

RE: Retículo endoplásmico

REEP1: *Receptor expression-enhancing protein 1*

RMN: Resonancia magnética nuclear

SP: aparentemente esporádico

SSCA: *Single Strand Conformation Analysis*

SNC: Sistema nervioso central

SPG: *Spastic gait locus*

TCE: Tracto corticoespinal

U: unidad de actividad enzimática

VAC: valor del área bajo la curva

## ÍNDICE

1.	Introducción.....	3
1.1.	Paraparesia Espástica Hereditaria: Características generales, diagnóstico y tratamiento.....	3
1.2.	Fisiopatología.....	8
1.3.	Genética de la PEH.....	14
1.4.	Genética Mitocondrial y PEH.....	23
2.	Objetivos.....	26
3.	Pacientes y métodos.....	29
3.1.	Pacientes y controles.....	29
3.2.	Extracción de ADN de sangre periférica.....	30
3.3.	Estudio de los genes <i>SPAST</i> , <i>ATL1</i> y <i>SPG7</i> .....	30
3.4.	Estudio de los haplogrupos mitocondriales.....	37
3.5.	Caracterización de nuevas mutaciones.....	38
3.6.	Análisis estadístico.....	40
4.	Resultados.....	43
4.1.	Características demográficas.....	43
4.2.	Estudio del gen <i>SPAST</i> .....	44
4.3.	Estudio del gen <i>ATL1</i> .....	52
4.4.	Estudio mediante MLPA de los genes <i>SPAST</i> y <i>ATL1</i> .....	55
4.5.	Polimorfismos en los genes <i>SPAST</i> y <i>ATL1</i> .....	56
4.6.	Correlación genotipo-fenotipo.....	57
4.7.	Estudio del gen <i>SPG7</i> .....	58
4.8.	Algoritmo de diagnóstico.....	69
4.9.	Estudio de los haplogrupos mitocondriales.....	70
5.	Discusión.....	77
5.1.	Estudio del gen <i>SPAST</i> .....	78
5.2.	Estudio del gen <i>ATL1</i> .....	80
5.3.	Estudio del gen <i>SPG7</i> .....	81
5.4.	Correlación genotipo-fenotipo.....	83
5.5.	Estudio de los haplogrupos mitocondriales.....	85
6.	Conclusiones.....	89
	Bibliografía.....	93



# *INTRODUCCIÓN*





## **1. Introducción**

### **1.1. Paraparesia Espástica Hereditaria: Características generales, diagnóstico y tratamiento**

El término Paraparesia Espástica Hereditaria (PEH [MIM 182601]) agrupa un conjunto de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por una dificultad insidiosa, progresiva, en ocasiones severa, para la marcha<sup>1</sup>. Todos ellos están relacionados, clínica y patológicamente, y su rasgo común es la degeneración retrógrada de los axones más largos del tracto corticoespinal (TCE) y las columnas dorsales de la médula espinal. Esto ocasiona un síndrome piramidal caracterizado por la aparición de paresia y espasticidad crecientes en los miembros inferiores<sup>2</sup>.

#### **1.1.1. Epidemiología**

Se trata de una patología relativamente poco frecuente cuya prevalencia en Cantabria fue fijada por Polo y colaboradores (1991) en 9,6 pacientes por cada 100.000 individuos, por lo que podría haber unos 4000 casos en todo el país<sup>3</sup>. Sin embargo se ha descrito que la prevalencia varía con el origen étnico y geográfico, así como con el subtipo considerado. Según diferentes estudios, se estima que la PEH puede afectar a entre 1 y 20 individuos por cada 100.000 habitantes en función de la población analizada, aunque la mayoría de los autores lo sitúan entre 3 y 6 casos. Las tasas de prevalencia tienden a ser mayores en las regiones con mayor tasa de consanguinidad, y la gran variabilidad descrita podría explicarse, en parte, por la elevada proporción de portadores asintomáticos que genera una subestimación de la frecuencia real<sup>3-8</sup>.

#### **1.1.2. Antecedentes históricos**

En 1880, Ernst Adolf Strümpell realizó la primera descripción fiable de un caso de PEH al mencionar a dos hermanos con una “pseudo-parálisis progresiva espasmódica de las piernas”, con preponderancia de la espasticidad dinámica sobre la debilidad y la hipertonía en reposo. Incluso fue capaz de circunscribir la neurodegeneración a la médula espinal, afectando especialmente al tracto corticoespinal y a las columnas dorsales. Su trabajo fue continuado por el neurólogo francés Maurice Lorrain, quien en 1894 escribió una tesis sobre el tema. Ya a principios del siglo XX, Pratt fue el primero en sugerir la división entre los casos que exhibían únicamente una paraparesia espástica

y aquellos en los que se observaban síntomas adicionales, y que él dio en llamar “PEH más síndromes”<sup>9-10</sup>. Dada la gran variedad de síntomas que podían presentar los pacientes, durante años no se reconoció la PEH como una entidad clínica y patológica bien definida. Schwarz y Liu (1956) y Behan y Maia (1974) revisaron la escasa literatura existente y realizaron estudios histopatológicos detallados, sugiriendo la inclusión de este conjunto de patologías bajo el término epónimo “paraplejia espástica familiar de Strümpell-Lorrain”<sup>11-12</sup>. En 1981, Anita Harding estableció una clasificación de la PEH, según la cual se determinaba la existencia de un fenotipo puro o complicado en función de la ausencia o presencia de síntomas adicionales al síndrome piramidal. Propuso además la clasificación de la enfermedad en función de la edad de debut en PEH tipo I y tipo II<sup>13</sup>. En el momento actual, las clasificaciones de PEH se hacen en función de criterios clínicos, pero también genéticos.

### **1.1.3. Cuadro clínico y prognosis**

La PEH es una enfermedad heterogénea, tanto a nivel clínico como genético. La edad de inicio considerada como el momento en que aparecen los primeros síntomas y/o signos oscila entre la primera infancia y la octava década. En los casos de presentación más temprana puede manifestarse como un retraso psicomotor en el inicio de la sedestación, la bipedestación o en el inicio de la deambulación<sup>14-16</sup>. No obstante, los primeros síntomas suelen aparecer más tarde, a modo de rigidez en las piernas y torpeza al caminar, con tropiezos y caídas recurrentes seguidas de un deterioro de la marcha lento pero progresivo. La progresión parece ser más rápida cuanto más tardío es el inicio de la enfermedad mientras que en los casos con inicio antes de los 20 años la evolución es más lenta<sup>17</sup>.

Se estima que al menos el 65% los individuos presentan la forma pura de la enfermedad cuyo rasgo distintivo es la presencia de espasticidad en los músculos de los miembros inferiores debida a hipertonía e hiperreflexia, es decir, un tono muscular excesivo acompañado de una exaltación de los reflejos<sup>18</sup>. Las respuestas plantares suelen ser extensoras (signo o reflejo de Babinski positivo). Otros posibles síntomas son debilidad muscular, urgencia urinaria asociada a la hipertonía del esfínter urinario, disminución de la sensación vibratoria en el extremo distal de las extremidades inferiores (hipopalestesia) y en ocasiones, deterioro de la propiocepción. Con el tiempo, es común que el sujeto desarrolle escoliosis, deformaciones de los pies y “paso de tijera”, consistente en cruzar una pierna por delante de la otra durante la marcha a causa de un

espasmo del músculo aductor extenso<sup>14,19</sup>. Aunque los miembros superiores no suelen verse afectados ocasionalmente puede detectarse cierta hiperreflexia<sup>20</sup>.

En los casos de PEH complicada se suman otros síntomas, neurológicos o no, como ictiosis, neuropatía periférica, ataxia, nistagmo, distonía, epilepsia, retinopatía, amiotrofia, retraso mental o demencia entre otros. Pueden aparecer aislados, combinados o incluso en forma de síndromes comúnmente asociados a un tipo genético de PEH concreto, como son los síndromes de Kjellin (SPG15) o Silver (SPG17)<sup>21-22</sup>.

La enorme variabilidad inter e intrafamiliar impide pronosticar el curso de la enfermedad. Algunos autores han señalado que el fenotipo puro se asocia por lo general a una prognosis más benigna al no verse afectadas la fuerza y la destreza en los miembros superiores, las funciones cognitivas o la deglución; mientras que las formas complicadas suelen tener un peor pronóstico<sup>17,23</sup>.

### **Variabilidad fenotípica**

En general, las familias con patrón de herencia dominante suelen presentar fenotipo puro, pero se han descrito numerosas excepciones en pacientes portadores de mutación en algunos de los *loci* más comunes como SPG3A, SPG4 y SPG10<sup>24-25</sup>. Por el contrario, las familias con patrón de herencia recesiva tienden a desarrollar síntomas adicionales, pero se han hallado casos con fenotipo puro asociados a mutación en los genes *SPG7* y *SPG11*<sup>26-27</sup>. Además, las formas ligadas al cromosoma X más comunes, SPG1 y SPG2, suelen cursar con un cuadro complicado y con frecuencia muy severo<sup>28</sup>. Sin embargo, se han descrito familias con ligamiento a los *loci* SPG16 y SPG34, localizados en el cromosoma X, que manifestaron fenotipo puro incluso tras décadas de evolución<sup>29-31</sup>.

También existe variabilidad intrafamiliar de modo que pacientes de una misma familia y portadores de la misma mutación pueden manifestar diferentes fenotipos. Además, se han descrito mutaciones con penetrancia incompleta o expresividad variable dependientes de la edad<sup>14,32-33</sup>.

Esta gran heterogeneidad dificulta el diagnóstico genético pues, aunque la presentación clínica pueda dar indicios de la causa genética subyacente, no es posible predecir el *locus* mutado. El asesoramiento genético permite estimar el riesgo de herencia de una determinada mutación y se pueden realizar diagnósticos presintomáticos y prenatales, pero no se puede predecir la edad de inicio o la evolución de la enfermedad.

### **Factores modificadores del fenotipo**

La elevada frecuencia de casos aparentemente esporádicos, así como la existencia de familias con una gran heterogeneidad fenotípica, sugiere la existencia de factores ambientales o genéticos capaces de modular el desarrollo de la enfermedad<sup>2</sup>.

En los últimos años se han descrito familias con PEH ligada al *locus* SPG4 en las que los hombres presentaban una mayor penetrancia y expresividad de la enfermedad con una prevalencia aparentemente mayor entre los hombres (ratio hombres:mujeres de 1,29; p-valor < 0,001)<sup>34-35</sup>. Por ello, se ha planteado la hipótesis de que el papel neuroprotector de los estrógenos podría reducir la penetrancia de las mutaciones en las mujeres. El consumo de alcohol o la exposición a neurotoxinas se han postulado como factores ambientales moduladores del fenotipo<sup>36-37</sup>.

Entre los factores genéticos moduladores destacan las variantes p.Ser44Leu y p.Pro45Gln en el gen *SPAST/SPG4* que se han asociado a variaciones en la edad de inicio y la agresividad de la enfermedad<sup>16,38</sup>. Ambas se encuentran en sitios de fosforilación y se cree que podrían modular la actividad o el nivel de expresión o degradación de la espastina, la proteína codificada por este gen<sup>39-40</sup>.

Por otra parte, la variante p.Gly563Ala hallada en la Hsp60 (SPG13), se asoció a una disminución significativa de la edad de inicio en pacientes portadores de mutaciones en *SPAST*<sup>41</sup>.

Se ha observado en algunas familias el fenómeno de anticipación o disminución de la edad de inicio con las generaciones, característico de otras enfermedades neurodegenerativas y relacionado con la expansión de ciertos tripletes de nucleótidos<sup>42</sup>. Sin embargo, no se han detectado expansiones de tripletes en los *loci* SPG y hay quien considera los casos descritos son fruto de un sesgo, ya que es más sencillo detectar a los niños con antecedentes familiares<sup>43-45</sup>.

La genética mitocondrial podría ser una fuente de heterogeneidad clínica más ya que numerosas mutaciones asociadas a la PEH se encuentran en genes codificantes de proteínas mitocondriales y muchos casos de fenotipo complicado presentan similitudes con ciertos desórdenes mitocondriales<sup>46-47</sup>.

#### **1.1.4. Diagnóstico**

La sospecha clínica de PEH se basa en la existencia de signos o síntomas característicos de la enfermedad como la alteración de la marcha, hipertonía e hiperreflexia en las piernas, debilidad muscular, presencia de reflejos patológicos como Babinski, etc.

Además, la sospecha diagnóstica puede apoyarse en estudios neurofisiológicos, estudios de neuroimagen, existencia o no de antecedentes familiares y un diagnóstico diferencial con otras causas de paraparesia espástica como la esclerosis múltiple, la ataxia de Friedrich o los traumatismos y neoplasias en la médula espinal. En el caso de formas complicadas, también se debe excluir la posibilidad de la coexistencia de PEH con otra enfermedad neurológica<sup>14</sup>.

El diagnóstico definitivo de PEH se establece una vez identificada la mutación causante de la enfermedad. En los últimos años y gracias a los avances en el campo de la genómica se han descrito muchos *loci*/genes nuevos, documentándose hasta el momento más de 48 *loci* asociados a la enfermedad para los que ya se han identificado 27 genes<sup>83</sup>. Aunque el solapamiento clínico entre muchos de estos *loci* hace difícil predecir la causa genética en un paciente concreto, el tipo de fenotipo y el patrón de herencia pueden ser útiles en la aplicación de una estrategia racional para el diagnóstico molecular<sup>48</sup>. Además, el diagnóstico genético permite realizar estudios genéticos presintomáticos y prenatales en aquellas familias en las que se ha identificado la mutación causante de la enfermedad facilitando, así, el asesoramiento genético<sup>49</sup>.

### **1.1.5. Tratamiento**

En la actualidad, el tratamiento de la PEH es puramente paliativo ya que no existen fármacos capaces de curar la enfermedad o frenar su evolución. Así, el procedimiento ante esta enfermedad se basa en el control médico de los síntomas complementado con medidas y equipamiento de apoyo como férulas o muletas. Los fármacos empleados atenúan la sintomatología para aumentar la calidad de vida del paciente. La mayoría son antiespasmódicos o relajantes musculares que ayudan a reducir la espasticidad como el baclofeno (un depresor del sistema GABAérgico a nivel medular), el dantrolene (un relajante directo del músculo esquelético) o las inyecciones intramusculares de toxina botulínica (con acción anticolinérgica en la unión neuromuscular). En casos avanzados, estos fármacos pueden llegar a suministrarse por vía intratecal. La urgencia urinaria es debida a una hiperreflexia del músculo detrusor que puede ser mitigada mediante oxibutinina, un antiespasmódico que ejerce un efecto anticolinérgico sobre el músculo liso de un modo selectivo, aumentando la capacidad de la vejiga y retrasando el deseo inicial del vaciado. La fisioterapia no puede detener la degeneración del tracto corticoespinal pero mantiene y aumenta la fuerza y la amplitud de movimiento de los músculos, facilitando la marcha<sup>17</sup>.

Gracias al mayor conocimiento de la patología molecular de la enfermedad se está investigando en modelos animales el posible uso de nuevas terapias como la vinblastina, un fármaco capaz de desestabilizar los microtúbulos; o la inyección de copias normales del gen mutado. Sin embargo, estas alternativas terapéuticas se encuentran aún en fases iniciales del estudio<sup>50-51</sup>.

## **1.2. Fisiopatología**

La principal característica neuropatológica de la PEH es la degeneración del TCE, la vía descendente encargada de la iniciación de los movimientos voluntarios finos y hábiles, cuya disfunción genera debilidad, torpeza y dificultad en la iniciación de los movimientos voluntarios<sup>12,20</sup>. El TCE también se conoce como vía piramidal pues se compone de los axones de las motoneuronas superiores o de primer orden, que son neuronas piramidales de la corteza motora. La vía piramidal atraviesa la cápsula interna y el tronco encefálico, para formar las pirámides de la médula donde el 75-95% de las fibras cruzan o “decusan” al lado opuesto formando el haz piramidal cruzado que inerva la musculatura del lado contrario del cuerpo. El resto de las fibras, el haz piramidal directo, acabarán decusando a la altura del cuello y el tórax. Una vez que el terminal axónico alcanza el segmento medular correspondiente, cada motoneurona superior contacta con una motoneurona inferior o de segundo orden por mediación de una interneurona. Finalmente, la motoneurona inferior lleva el impulso nervioso desde el asta anterior de la médula hasta el músculo correspondiente. La degeneración de los axones de las motoneuronas superiores entorpece o impide la inhibición del arco reflejo miotático medular por lo que el tono muscular se eleva y aparece la espasticidad. También, parece ser el origen de la urgencia urinaria por hipertonía del esfínter urinario<sup>9,52</sup>(Figura 1).

En la PEH también pueden degenerar algunas vías ascendentes o sensitivas que transportan la información captada por propioceptores como los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi. En condiciones normales permiten conocer la posición relativa de las articulaciones y la tensión ejercida por cada músculo, una información esencial para realizar los movimientos con destreza. Normalmente se ve afectado el *fasciculus gracilis* o tracto de Goll, cuyas neuronas reciben sinapsis de los receptores sensoriales situados en los miembros inferiores y del tronco hasta la vértebra T6, transmitiendo la información al tálamo donde será filtrada antes de pasar a la corteza sensorial. Su degeneración podría estar implicada en la aparición de algunos de

los síntomas iniciales más frecuentes como son la inestabilidad, los tropiezos y las caídas. Aunque en menor medida, también puede degenerar el *fasciculus cuneatus* o tracto de Burdach, que lleva al tálamo la información sensorial de la parte superior del cuerpo, incluyendo el tronco por encima de la vértebra T6 y las extremidades superiores. Estos tractos transportan también parte de la información del tacto profundo, la vibración y el dolor visceral, pudiendo ser la base de trastornos de la sensibilidad como son la hipopalestesia (disminución de la sensibilidad a la vibración) y las disestesias (trastorno de la sensibilidad, que suele dar sensación de hormigueo e incluso dolor). Por otra parte, alrededor de un cuarto de los casos tienen afectado el tracto espinocerebeloso dorsal. Este lleva la información sensorial al cerebelo y es básico en el control de la posición de las articulaciones, afectando al mantenimiento de la postura corporal y el equilibrio. Es más, se cree que el daño en estas vías propioceptivas es la causa de que la PEH tenga un efecto más acusado durante la marcha que en reposo<sup>14,53-54</sup>.

Es notable el hecho de que los dos tractos afectados de modo constante en los pacientes de PEH sean los compuestos por las fibras más largas del sistema nervioso central (SNC) y que, a pesar de la duración de la enfermedad, las células de origen de estos tractos se conserven prácticamente intactas en la mayoría de los casos<sup>12</sup>. Esto sería consecuencia de que el proceso de degeneración de las vías nerviosas es retrógrado (fenómeno “dying-back”), iniciándose en los extremos finales de los axones<sup>55</sup>.

En los casos de fenotipo complicado pueden verse lesionadas otras partes del sistema nervioso, tanto central como periférico. Por ejemplo, la degeneración axonal puede extenderse al sistema nervioso periférico causando neuropatía periférica y a la materia blanca en otras regiones del SNC observándose lesiones difusas de la materia blanca o el adelgazamiento del cuerpo calloso o TCC (del inglés *thin corpus callosum*). En ocasiones se produce degeneración de la retina o atrofia del nervio óptico. También hay casos con atrofia cortical tanto del cerebro, relacionada con retraso mental o deterioro cognitivo; como del cerebelo, que genera signos cerebelosos como ataxia, nistagmo, disartria, dismetría, temblor, etc. Se han descrito algunos casos con distonía, lo que sugiere que también puede existir afectación de los ganglios basales. Además, puede producirse amiotrofia aunque probablemente sea secundaria debida a la degeneración de las motoneuronas inferiores. Algunos pacientes presentan ictiosis, una enfermedad cutánea en la que la piel aparece seca y escamosa<sup>12,52</sup>.



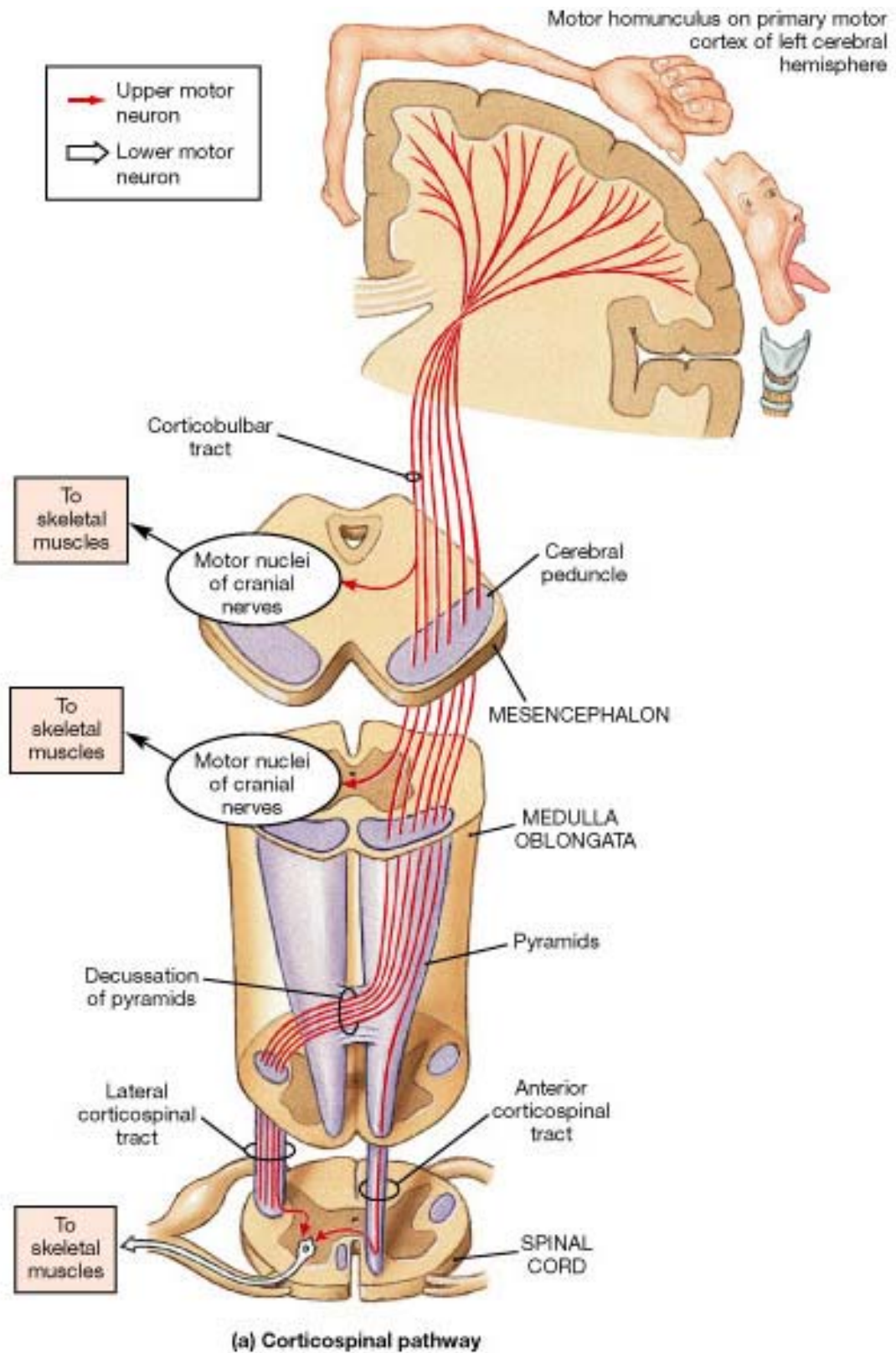


Figura 1. Tracto corticoespinal (Extraído del sitio web <http://iupucbio2.iupui.edu>).

### 1.2.1. Anatomía patológica

La degeneración de los axones se puede detectar en las regiones correspondientes a las vías descendentes (motoras) y ascendentes (sensitivas) de la médula espinal al teñir cortes histológicos de la médula espinal observándose desmielinización y gliosis en las regiones con degeneración axonal<sup>11-12,55</sup>.

La degeneración del TCE concuerda con los resultados de las pruebas de neuroimagen, como la resonancia magnética nuclear (RMN), en las que se observa un adelgazamiento de la médula precisamente en la región cervical inferior y explica que las extremidades inferiores sean las primeras y, normalmente, las únicas afectadas<sup>56</sup>. Entre las vías ascendentes o sensitivas el *fasciculus gracillis* es el más afectado por la degeneración y por ello se cree que es el responsable de la disminución del área transversal medular observada en la región torácica superior<sup>11,55</sup>.

También, se ha descrito pérdida de células del asta anterior y de células de Betz en la capa V de la corteza motora y pérdida de mielina concomitante con la degeneración axonal<sup>11-12,54</sup>.

En algunos casos se han observado dilatación ventricular, aparición de lesiones difusas en diferentes zonas de la materia blanca (hiperintensidades en RMN e hipodensidades en tomografía axial computerizada), incluido el cuerpo caloso, y atrofia leve a moderada de regiones de la corteza cerebral, el cerebelo o los ganglios basales<sup>57-58</sup>.

### 1.2.2. Patología molecular

Los genes/*loci* cuyas mutaciones se han asociado a PEH codifican para proteínas de funciones muy diversas, aunque parecen converger en un número limitado de vías como son el transporte intracelular, la actividad mitocondrial o el desarrollo embrionario. Todas ellas están estrechamente ligadas al desarrollo y mantenimiento de los axones (Figura 2).

#### **Transporte intracelular y tráfico de membranas**

Las motoneuronas superiores transmiten la información motora a gran velocidad desde la corteza motora hasta el asta anterior de la médula espinal gracias a que su extraordinaria longitud, de hasta 1 metro, evita la necesidad de disponer de sinapsis intermedias. El mantenimiento de sus largos axones implica una compleja maquinaria intracelular en la que intervienen citoesqueleto, proteínas motoras y diversos orgánulos

membranosos. La gran variedad de mecanismos y componentes implicados en todo el proceso, así como la especificidad del mismo, lo hacen muy vulnerable y, quizá por ello, sea una de las funciones celulares más frecuentemente afectada en los casos de PEH. Al menos 8 de los 48 *loci* / 27 genes asociados a la enfermedad, están relacionados con esta función y las mutaciones en éstos suponen aproximadamente, un 60% del total de los casos<sup>59-60</sup>.

Así, el gen *KIF5A* (SPG10) codifica la cadena pesada de la kinesina, una proteína motora implicada en el transporte axonal anterógrado rápido dependiente de los microtúbulos<sup>61</sup>. La espastina, codificada por el gen *SPAST* (SPG4), interviene en el remodelado y reciclaje de los microtúbulos que actúan a modo de vías de transporte para las kinesinas y otras proteínas motoras<sup>62</sup>.

En otros casos, las proteínas afectadas participan en el modelado de estructuras membranosas. La interacción entre atlastina-1 (codificada por el gen *ATL1/SPG3A*), la espastina y la proteína REEP1 (del inglés *receptor expression-enhancing protein 1*, SPG31), es fundamental en el modelado del RE<sup>63</sup>. La estrumpelina (SPG8) y la maspardina (SPG21) intervienen en el tráfico de vesículas endosómicas hacia el *trans*-Golgi<sup>64-65</sup>.

Por último, estarían las moléculas implicadas en la regulación de la señalización mediada por receptores. La atlastina-1 (SPG3A), la espastina (SPG4), la espartina (SPG20) y la proteína transportadora de magnesio NIPA1 (SPG6) inducen normalmente la degradación del receptor tipo II de BMP (BMPRII) inhibiendo la vía de señalización BMP (proteínas morfogenéticas óseas), implicada en numerosos procesos del desarrollo<sup>66-67</sup>. Este hecho sugiere que el efecto patogénico de las mutaciones en estas proteínas podría revertirse mediante drogas capaces de inhibir esta vía. Además, la espartina (SPG20) media la degradación del EGFR (del inglés *epidermal growth factor receptor*) mientras que la alsina (*ALS2*), implicada en caso de esclerosis lateral amiotrófica con cuadros clínicos muy similares a la PEH, se ha relacionado con la vía de señalización Ras<sup>68-69</sup>.

### **Función mitocondrial**

Las neuronas del tracto corticoespinal y las columnas dorsales son grandes y tienen un gran consumo energético por lo que, a fin de compensar la lenta difusión del ATP en el citoplasma, presentan mitocondrias en las regiones más alejadas del soma o con mayor demanda energética. La distribución de estos orgánulos y su correcto funcionamiento

son fundamentales para el mantenimiento neuronal. Al menos cuatro de las proteínas ligadas a la PEH actúan como chaperonas que intervienen en el correcto plegamiento y ensamblaje de diversos péptidos mitocondriales: REEP1 (SPG31), paraplegina (SPG7), Hsp60 (del inglés *Heat shock protein 60 KDa*, SPG13) y espartina (SPG20)<sup>70-73</sup>. También se ha descrito una familia con una mutación en el gen mitocondrial *ATP6*, que codifica una subunidad de la ATPsintasa o Complejo V de la cadena respiratoria<sup>37</sup>.

### **Desarrollo neuronal**

Se han descrito dos genes cuyas mutaciones están asociadas a formas de PEH en las que los pacientes presentan defectos en el desarrollo neuronal. El gen *LICAM* (SPG1) codifica para la molécula de adhesión celular L1, una glicoproteína implicada en la migración neuronal y la extensión de las neuritas<sup>74</sup>. Por otro lado, el gen *PLP1* (SPG2) codifica para la lipoproteína-1, que es expresada por los oligodendrocitos y resulta esencial en el mantenimiento de los axones<sup>75</sup>.

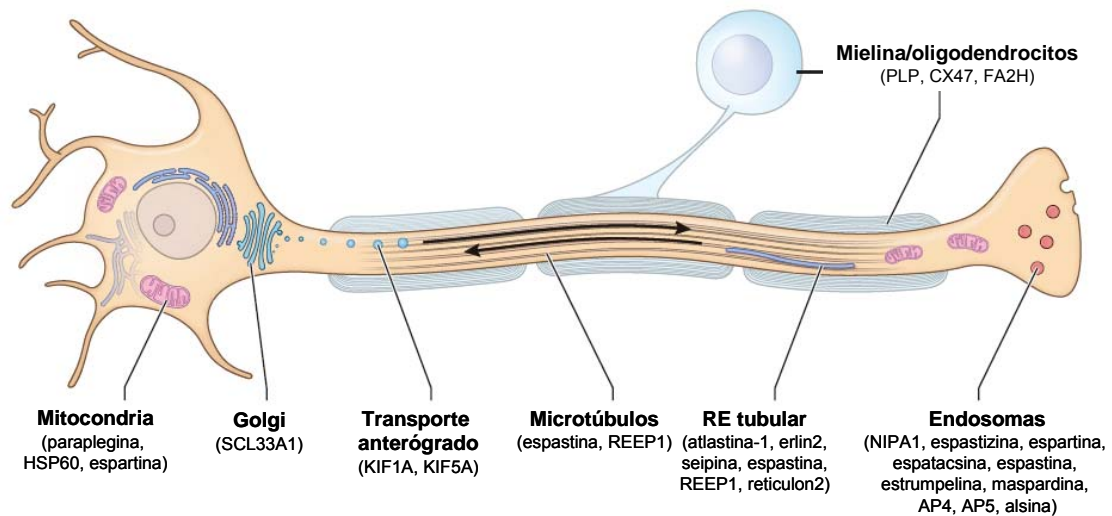
También, la atlastina-1 participa en el desarrollo de las sinapsis y el crecimiento axonal, probablemente a través de la vía de señalización BMP y de la morfogénesis del RE y el aparato de Golgi (AG), lo que podría explicar su frecuente asociación al inicio infantil de la enfermedad<sup>67,76-77</sup>.

### **Otras funciones**

El gen *CYP7B1* (SPG5) codifica un miembro de la familia de citocromos P450 monooxigenasas implicado en el metabolismo del colesterol en diversos órganos, incluido el cerebro donde parece estar implicado en la síntesis de neuroesteroides<sup>78</sup>.

Las mutaciones en la espartina (SPG20) y la seipina (SPG17) también afectan al metabolismo lipídico, ya que regulan la biogénesis y reciclaje de los cuerpos lipídicos o adiposomas<sup>79-80</sup>. Además, las mutaciones en la seipina también parecen causar la acumulación de la proteína aberrante en el RE con el consiguiente estrés para el orgánulo, por lo que podría considerarse un caso de agregación proteica<sup>81</sup>.

La proteína ERLIN2 (del inglés *endoplasmic reticulum lipid raft associated 2*, SPG18) media la degradación de los receptores activados del inositol trifosfato. Por este motivo su mutación altera la homeostasis del calcio, un mecanismo esencial en funciones como el aprendizaje motor, la transmisión sináptica o la expresión génica entre otras muchas<sup>82</sup>.



**Figura 2. Patología molecular de la PEH. Resumen de algunas de las proteínas y vías o funciones intracelulares afectadas en la PEH (Figura extraída de Blackstone 2012)**

### 1.3. Genética de la PEH

La PEH es una enfermedad genéticamente compleja pues se sabe de, al menos, 48 *loci* asociados a alguna de las formas de la enfermedad para los que se han identificado 27 genes (Tabla 1) (HGNC [www.genenames.org](http://www.genenames.org), consultado el 8 de agosto de 2012)<sup>83</sup>. Los patrones de herencia pueden ser autosómico dominante (PEH-AD), autosómico recesivo (PEH-AR) o ligado al cromosoma X, e incluso se ha descrito una forma de herencia materna<sup>83</sup>. Las formas de PEH-AD son las más frecuentes en los países occidentales, donde comprenden casi el 80% de los casos; mientras que las formas recesivas constituyen alrededor del 15% y el 5% restante correspondería al resto de patrones de herencia (ligada al sexo, mitocondriales). También se ha descrito que aproximadamente un 5-10% de los pacientes sin antecedentes familiares o esporádicos son portadores de mutación en algunos de los genes ya identificados<sup>17</sup>.

**Tabla 1. Loci/genes implicados en la patogenia de la PEH.**

Locus	Localización	Gen	Proteína	Función afectada	Frecuencia	Fenotipo	Referencia
<b>Herencia autosómica dominante</b>							
SPG3	14q21.3	<i>ATL1</i>	atlastin-1	Tráfico ER-Golgi. Estructura ER	10%	Puro/Complicado	102
SPG4	2p24-p21	<i>SPAST</i>	spastin	Microtúbulos. Transporte intracelular.	40%	Puro/Complicado	125
SPG6	15q11.2	<i>NIPA1</i>	NIPA1	Transporte de Mg <sup>2+</sup> . Tráfico endosómico.	9 familias	Puro/Complicado	126
SPG8	8q24.13	<i>KIAA0196</i>	strumpellin	Tráfico de vesículas endosómicas	5 familias	Puro	127
SPG9	10q23.2-q24.2	-	-	-	2 familias	Complicado	128
SPG10	12q13.13	<i>KIF5A</i>	KIF5A	Transporte anterógrado rápido	7 familias	Puro/Complicado	129
SPG12	19q13	<i>RTN2</i>	reticulon-2	Estructura ER	2 familias	Puro	130
SPG13	2q33.1	<i>HSPD1</i>	Hsp60	Biogénesis mitocondrial	1 familia	Puro	131
SPG17	11q13	<i>BSCL2</i>	seipin	Metabolismo lipídico	16 familias	Sind. de Silver	22
SPG19	9q33-q34	-	-	-	1 familia	Puro	132
SPG29	1p31.1-p21.1	-	-	-	1 familia	Complicado	133
SPG31	2p11.2	<i>REEP1</i>	REEP1	Estructura ER	2.3%-6.5%	Puro/complicado	134
SPG33	10q24.2	<i>ZFYVE27</i>	Protrudin	Crecimiento de neuritas	1 familia	Puro	135
SPG36	12q23-q24	-	-	-	1 familia	Puro	136
SPG37	8p21.2-q13.3	-	-	-	1 familia	Puro	137
SPG38	4p16-p15	-	-	-	1 familia	Complicado	138
SPG40	-	-	-	-	1 familia	Puro	139
SPG41	11p14.1-p11.2	-	-	-	1 familia	Puro	140
SPG42	3q	<i>SLC33A1</i>	SLC33A1	¿Transportador de acetyl-CoA?	1 familia	Complicado	141
<b>Herencia autosómica recesiva</b>							
SPG5A	8q21.3	<i>CYP7B1</i>	CYP7B1	Metabolismo neuroesteroideo	5 familias	Puro/Complicado	142
SPG7	16q24.3	<i>SPG7</i>	paraplegin	Biogénesis mitocondrial	1-4%	Complicado	110
SPG11	15q13-q15	<i>KIAA1840</i>	spatacsin	¿Expresión génica?	21%	Complicado	143
SPG14	3q27-q28	-	-	-	1 familia	Complicado	144
SPG15	14q23.3	<i>ZFYVE26</i>	spastizin	Trafico endosómico	10 familias	Complicado	21
SPG18	8p11.23	<i>ERLIN2</i>	ERLIN2	Degradación del receptores activados de IP3	3 familias	Complicado	145

(Continuación tabla 1)

Locus	Localización	Gen	Proteína	Función afectada	Frecuencia	Fenotipo	Referencia
<b>Herencia autosómica recesiva</b>							
SPG20	13q13.1	<i>KIAA0610</i>	spartin	Homeostasis mitocondrial. Tráfico endosómico	1 familia	Sind. de Troyer	146
SPG21	15q21-q22	<i>ACP33</i>	maspardin	Tráfico endosoma-Golgi	1 familia	Sind. de Mast	65
SPG23	1q24-q32	-	-	-	5 familias	Sind. de Lison	147
SPG24	13q14	-	-	-	1 familia	Puro	148
SPG25	6q23-q24.1	-	-	-	1 familia	Complicado	149
SPG26	12p11.1-q14	-	-	-	1 familia	Complicado	150
SPG27	10q22.1-q24.1	-	-	-	1 familia	Complicado	151
SPG28	14q21.3-q22.3	-	-	-	1 familia	Puro	152
SPG30	2q37.3	<i>KIF1A</i>	-	Transportador axonal de vesículas sinápticas	1 familia	Puro/Complicado	153
SPG32	14q12-q21	-	-	-	1 familia	Complicado	154
SPG35	16q21-q23.1	<i>FA2H</i>	FA2H	Mielinización	2 familias	Complicado	155
SPG39	19p13	<i>PNPLA6</i>	NTE	Desarrollo embrionario. Mantenimiento axonal	1 familia	Complicado	156
SPG43	19p13.11-q12	-	-	-	1 familia	Complicado	157
SPG44	1q41-q42	<i>GJC2</i>	GJC2	Conexina expresada en ciertas células gliales	1 familia	Complicado	158
SPG45	10q24.3-q25.1	-	-	-	1 familia	Complicado	159
SPG46	9p21.1-q21.11	-	-	-	1 familia	Complicado	160
SPG47	1p13.2-1p12	<i>AP4B1</i>	-	-	1 familia	Complicado	161
SPG48	7p22.1	<i>KIAA0415</i>	-	¿Reparación del ADN?	2 familias	Puro	162
<b>Herencia ligada al sexo</b>							
SPG1	Xq28	<i>LICAM</i>	L1CAM	Mielinización	Raro	complicado	163
SPG2	Xq22	<i>PLP1</i>	PLP1	Mielinización	Raro	Complicado	164
SPG16	Xq11.2	-	-	-	1 familia	Puro	165
SPG22	Xq21	<i>SLC16A2</i>	MCT8	-	-	Sind. de Allan-Herndon-Dudley	119
SPG34	Xq24-q25	-	-	-	1 familia	Puro	31

### 1.3.1. Formas Autosómicas Dominantes

Se han identificado 19 *loci* con herencia autosómica dominante para los que se han descrito, hasta el momento, 11 genes. Tres de ellos, *SPAST/SPG4*, *ATLI/SPG3A* y *REEPI/SPG31*, comprenden alrededor del 50% de los casos de PEH-AD, lo que corresponde aproximadamente al 40% de los casos totales<sup>84</sup>. Sin embargo, se cree que el número de *loci* es mucho mayor ya que hay familias en las que aún no se ha identificado el gen/*loci* asociado a la enfermedad. Esta forma de herencia suele asociarse a fenotipo puro aunque cada vez se describen más casos complicados con mutaciones en estos genes<sup>85</sup>.

#### Gen *SPAST (SPG4)*

La PEH de tipo 4 (SPG4) (MIM #182601) es con diferencia la forma más frecuente ya que comprende alrededor del 40% de los casos de PEH-AD, lo que equivale aproximadamente al 30% de los casos totales; si bien en algunas poblaciones se han descrito frecuencias menores cercanas al 15%<sup>48,86</sup>.

El gen *SPAST/SPG4* es de expresión ubicua aunque es más abundante en ciertos subtipos neuronales de la corteza o el estriado como las células de Purkinje o las neuronas piramidales<sup>53,87</sup>. Se encuentra en la región cromosómica 2p22-p21, se expande a lo largo de 95 Mb y comprende 17 exones<sup>88</sup>. Presenta dos inicios de transcripción situados en los codones 1 y 87, a partir de los cuales se generan una isoforma larga (M1) y una corta (M87), respectivamente<sup>89</sup>. Además, como un proceso no patogénico, se puede producir el procesamiento alternativo del exón 4.

Este gen codifica para la proteína espastina una proteína cortadora de microtúbulos. Al igual que el resto de proteínas de la familia AAA (ATPasas asociadas a diversas actividades celulares), presenta una región muy conservada que contiene un dominio de unión e hidrólisis de ATP. Este se sitúa en la región carboxilo-terminal, entre los aminoácidos 342 y 599, que son codificados por los exones 6 a 17 del gen. En el extremo amino-terminal se encuentran otros dominios importantes como el dominio transmembrana putativo o HR (del inglés *hidrofobic region*), el dominio MIT (*domain contained within microtubule-interacting and trafficking molecules*) y el dominio MTBD (*microtubule binding domain*) (Figura 3). Éstos median la unión de la espastina a otras moléculas como la atlastina-1, el NA14 o el CHMP1B, y le permiten anclarse a los microtúbulos. Se cree que de este modo reclutan a la espastina localizando su acción



en zonas de remodelado de microtúbulos o transporte intracelular. En el extremo aminoterminal también se encuentran dos señales de localización nuclear (NLS) y dos señales de exportación nuclear (NES). Dado que la isoforma corta carece de los 86 primeros aminoácidos no presenta la HR, las NES y la primera NLS, lo que modifica su patrón de distribución y su capacidad de interactuar con otras proteínas<sup>39,60,89-90</sup>.

No existe un consenso sobre cuál de las isoformas tiene mayor relevancia patológica. La isoforma corta es la más abundante en todos los tejidos, se asocia a los microtúbulos y aparece en el núcleo y asociada a proteínas centrosómicas. En cambio, la isoforma larga se expresa casi exclusivamente en el SNC y es activamente expulsada del núcleo hacia el citoplasma gracias a las señales de exportación nuclear, coincidiendo con la localización mayoritariamente citoplásmica de la espastina en las neuronas<sup>53,89,91</sup>. Otra evidencia a favor de la importancia de la isoforma larga es la existencia de mutaciones situadas en los codones iniciales y el aparente efecto modificador del fenotipo de los polimorfismos p.Ser44Leu y p.Pro45Gln. Sin embargo, hay quienes sugieren que en realidad podrían afectar a la expresión de la isoforma corta a partir del promotor crítico situado en el primer exón<sup>38,92</sup>.

Las mutaciones en *SPG4* se han asociado clásicamente al desarrollo de PEH pura aunque en los últimos años se han descrito varias familias con formas complicadas<sup>10,93-94</sup>. Hay descritas más de 400 mutaciones de diferentes tipos: mutaciones de cambio de sentido, mutaciones sin sentido, mutaciones que afectan a la pauta de lectura, y mutaciones que afectan al proceso de ajuste del ADN (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SPAST>, consultado el 8 de agosto de 2012). La frecuencia de mutaciones recurrentes es baja y la mayor parte de ellas son familia-específicas<sup>92,95-96</sup>. Dado que las mutaciones tienden a concentrarse en el dominio AAA y la espastina se reúne formando hexámeros activos, se ha propuesto que provocan la pérdida de función de la proteína con efecto dominante negativo<sup>97-98</sup>. Sin embargo, muchas de las mutaciones generan una proteína truncada o incluso un mensajero inestable que se degrada antes de traducirse. En este caso se podría postular como mecanismo patológico la haploinsuficiencia o disminución de la espastina activa por debajo de un umbral determinado<sup>44,99</sup>. Esta hipótesis encajaría mejor con la penetrancia incompleta y variable expresividad de algunas de las mutaciones asociadas a *SPG4*, pero no se excluye que el mecanismo patológico difiera en función del tipo de mutación y de la función afectada.

La secuencia del gen *SPAST* está muy conservada a lo largo de la escala evolutiva lo que concuerda con el bajo número de polimorfismos descritos. Destacan las variantes p.Ser44Leu y p.Pro45Gln que aparecen tanto en la población control como en la de pacientes, si bien parecen actuar como modificadores del fenotipo clínico condicionando edades de inicio más precoces<sup>38</sup>.

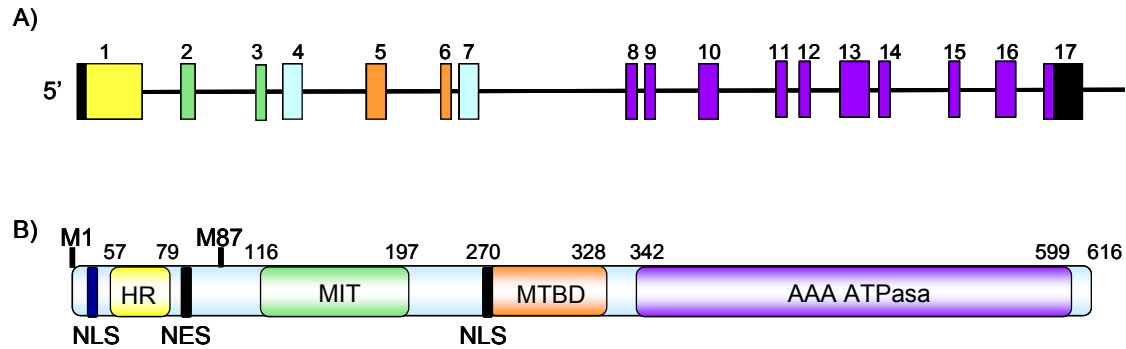


Figura 3. A) Gen *SPAST/SPG4*. B) Estructura de la proteína espastina.

### Gen *ATLI (SPG3A)*

Las mutaciones en el gen *ATLI/SPG3A* (MIM #182600) aparecen en alrededor del 10% de las familias con patrón de herencia autosómico dominante y están asociadas a edades de inicio muy temprano (<10 años)<sup>100</sup>. Aunque tradicionalmente se ha considerado un *locus* ligado a fenotipo puro, en los últimos años se han descrito varias familias con fenotipo complicado<sup>101</sup>.

El *locus* *SPG3A* se encuentra en la región 14q11-q21 y se expande a lo largo de unas 75 kb. Contiene el gen *ATLI*, de 14 exones, que se transcribe para dar un ARN mensajero de 2528 pb. y se traduce generando la proteína atlastina-1, de 553 aminoácidos. Esta proteína es homóloga en secuencia, estructura y función a la familia de las dinaminas, a la proteína de unión a guanilato 1 (GBP1) y a las mitofusinas, todas ellas GTPasas implicadas en procesos de tráfico intracelular de membranas (Figura 4)<sup>102</sup>.

En la región amino terminal de la atlastina-1 se encuentra el dominio de unión a guanilato llamado dominio G o GBP que adquiere una estructura globular y permite a la atlastina-1 aprovechar la energía generada en la hidrólisis de GTP a GDP y GMP<sup>102-103</sup>. Además, presenta dos dominios transmembrana situados en la región carboxilo-terminal, que adquieren una conformación en horquilla permitiendo la inserción en la cara externa de la bicapa lipídica de las vesículas y haciendo que los dos extremos de la proteína se encuentren orientados hacia el citoplasma. Entre el dominio G y los dominios transmembrana se sitúa el dominio M (del inglés *middle domain*), que

contiene dos motivos denominados “coiled-coils” capaces de formar un haz de  $\alpha$ -hélices entrelazadas que participan tanto en la dimerización, pues la atlastina-1 forma homotetrámeros activos, como en la interacción con otras proteínas<sup>104</sup>.

Aunque es una proteína de expresión ubicua, la atlastina-1 se halla en mayor concentración en el cerebro, en especial en las neuronas piramidales de la lámina V del córtex motor, las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, la amígdala y los núcleos talámicos. Este hecho concuerda con la disfunción selectiva del TCE en los pacientes con mutaciones en el gen *SPG3A*<sup>105</sup>. Su distribución varía en función del estadio celular. Durante el desarrollo neuronal se encuentra principalmente en los conos de crecimiento axonal y de hecho, se ha comprobado que su déficit durante este estadio inhibe la elongación de los axones, lo que podría estar relacionado con su asociación a formas precoces de PEH<sup>76</sup>. Sin embargo, en las neuronas ya maduras se encuentra tanto en las neuritas como en el soma, generalmente en asociación con orgánulos membranosos como el Endosoma, el RE y el AG<sup>105</sup>.

Hasta el momento actual, se han descrito casi 50 mutaciones, tanto de cambio de aminoácido como deleciones e inserciones en el gen *ATL1* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ATL1>, consultado el 8 de agosto de 2012). Las mutaciones tienden a concentrarse en los exones 4, 7, 8 y 12, los cuales codifican los dominios citoplásmico y transmembrana, y se cree que interfieren en la oligomerización y en la interacción con otras proteínas. El predominio de mutaciones que generan cambios de aminoácido sugiere que el efecto patogénico podría ser debido a una ganancia de función de efecto tóxico o a una pérdida de función, si bien la haploinsuficiencia no puede ser descartada. Por ejemplo, se cree que las mutaciones que afectan a la actividad GTPasa actúan de modo negativo dominante al promover la formación de oligómeros disfuncionales compuestos tanto por formas mutantes como normales de la proteína<sup>76</sup>. Se han propuesto diversas actividades celulares que podrían verse alteradas por las mutaciones en la atlastina. Inicialmente, se apostó por el tráfico vesicular por su similitud con las dinaminas. Sin embargo, en los últimos años ha ganado importancia su papel en el modelado de la red tubular del RE y en la formación y maduración del AG, pues parece promover la formación y tráfico de vesículas desde el RE hacia el AG<sup>106-107</sup>.

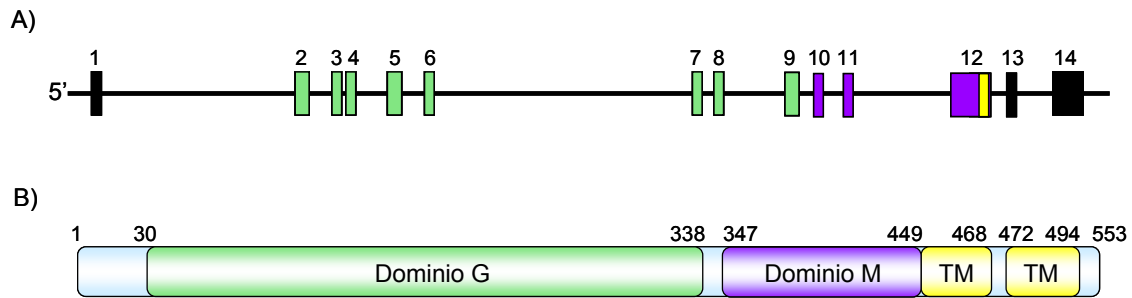


Figura 4. A) Gen *SPG3A/ALT-1*. B) Estructura de la proteína atlastina-1.

### 1.3.2. Formas Autosómicas Recesivas

Esta forma de herencia es especialmente frecuente en regiones con altas tasas de endogamia y que, por lo tanto, presentan una mayor tasa de consanguinidad<sup>4,108</sup>. En Túnez se ha estimado que el 97.3% de las familias presentaban un patrón de herencia recesivo<sup>109</sup>. Por otro lado, los síndromes de Troyer y MAST, dos raras formas de PEH-AR asociadas a mutaciones en las proteínas espartina y maspardina (*SPG20* y *SPG21*), respectivamente, son especialmente frecuentes entre las familias de la etnia Amish<sup>22,65</sup>.

Hasta el momento, se han descrito 24 *loci* y 13 genes asociados a las formas recesivas de PEH entre los que destacan: *SPG5A*, *SPG7*, *SPG11* y *SPG15*<sup>85</sup>. El resto de *loci*/genes sólo se han encontrado en una ó 2 familias y, junto al hecho de que en más de un 50% de los casos no se haya identificado el *loci*/gen causal, sugiere que este tipo de herencia presenta un elevado grado de heterogeneidad genética.

Los fenotipos complicados son habituales en las familias con PEH-AR, siendo el más frecuente el adelgazamiento del cuerpo caloso, que se ha estimado aparece en un 28-35% de los casos recesivos<sup>58,109</sup>.

#### Gen *SPG7*

El *locus* *SPG7* (MIM \*602783) contiene el gen *SPG7*, que fue el primero que se asoció a PEH-AR. Se localiza en la región cromosómica 16q24.3, se compone de 17 exones que abarcan 52 kb y codifica una proteína de 795 aminoácidos llamada paraplegina<sup>110</sup> (Figura 5).

La paraplegina es una metaloproteasa mitocondrial perteneciente a la familia de las AAA, y además del dominio AAA característico, presenta dos dominios peptidasa denominados FtSH y M41. Junto a su proteína homóloga AFG3L2 forma los complejos m-AAA, unos heterotetrámeros situados en la membrana mitocondrial interna, donde ejercen su función chaperona y proteasa, interviniendo en el ensamblaje y degradación

de los complejos de la cadena respiratoria. Se ha demostrado que la disfunción de sus proteínas homólogas en levaduras dificulta el ensamblaje de los complejos respiratorios induciendo un déficit de actividad de la cadena respiratoria<sup>111-112</sup>. Además, los análisis en fibras musculares de pacientes portadores de mutación en *SPG7*, revelaron una reducción de la actividad del Complejo I y un aumento de la sensibilidad al estrés oxidativo, un fenotipo que pudo ser rescatado gracias a la expresión exógena de paraplegina normal<sup>47</sup>. Por otra parte, se observó en levaduras y ratones que el complejo m-AAA participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial a través del procesamiento del péptido MrpL32, una de las subunidades de las partículas ribosomales mitocondriales<sup>113</sup>.

Esta forma de PEH representa aproximadamente el 1,5%-4,5% de los casos totales de PEH-AR, aunque ha sido asociado a un número creciente de casos aparentemente esporádicos<sup>26,47,114</sup>. Por el momento se han descrito 40 mutaciones de todo tipo en el gen *SPG7* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SPG7>, consultado el 8 de agosto de 2012). Algunos autores han sugerido que la herencia en PEH asociada a *SPG7* podría seguir un patrón AD con penetrancia reducida pues abundan las familias que presentan una sola mutación en heterocigosis segregante con la enfermedad<sup>26,115-116</sup>.

A diferencia de los genes *SPAST* y *ATL1*, el gen *SPG7* es muy polimórfico y se han hallado numerosos cambios no sinónimos que aún no han podido ser clasificados como variantes neutras, factores de susceptibilidad o mutaciones causales, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos<sup>85</sup>. Destaca la variante p.Ala510Val cuya frecuencia parece menor en la población general que entre los pacientes y para la que se ha postulado un papel patogénico que se pondría de manifiesto al aparecer en “*trans*” con una mutación<sup>26,116</sup>. Esta hipótesis estaría avalada por los estudios de complementación realizados en levaduras que indican un efecto deletéreo de esta variante sobre la función de la proteína<sup>117</sup>.

Las mutaciones en este gen suele asociarse a fenotipo complicado con neuropatía periférica o signos de afectación cerebelosa pero también se han descrito casos de PEH pura<sup>47,116,118</sup>.

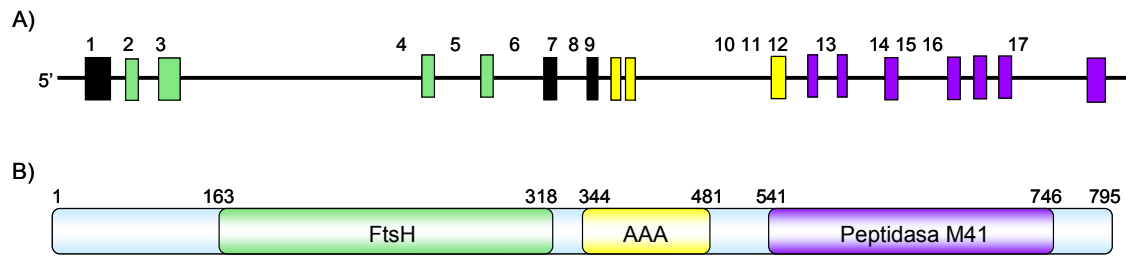


Figura 5. Estructura A) del gen *SPG7* y B) de la proteína paraplegina.

### 1.3.3. Formas de herencia ligada al cromosoma X

Son formas raras pero ya se han descrito 5 *loci* para los que se conocen 3 genes: *LI-CAM* (SPG1), *PLP* (SPG2) y *SLC16A2* (SPG22)<sup>74-75,119</sup>. Son relativamente fáciles de reconocer en la práctica clínica por su fenotipo y modo de herencia. Las mutaciones en *LI-CAM* suelen dar lugar a retraso mental, disgenesia del cuerpo caloso e hidrocefalia, solapándose con la clínica de los síndromes de MASA y CRASH. La PEH asociada a mutaciones en *PLP* cursa con anomalías en la materia blanca que pueden generar desde un fenotipo leve de inicio adulto hasta uno más severo, conocido como enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher. Las mutaciones en *SLC16A2* dan lugar al síndrome de Allan-Herndon-Dudley, caracterizado por retraso mental, hipotonía y atrofia muscular<sup>85</sup>.

### 1.3.4. PEH idiopática o esporádica

En la práctica clínica se detectan casos aparentemente esporádicos o idiopáticos de paraparesia espástica que comprenden alrededor del 8% de los casos totales<sup>59,120</sup>. La ausencia de antecedentes familiares puede deberse a factores tan diversos como la muerte prematura del transmisor, la existencia de portadores asintomáticos o la ocurrencia de mutaciones *de novo* o mosaicismos germinales. En algunos casos, el diagnóstico inicial de paraparesia espástica aparentemente esporádica es transitorio, pudiendo cambiar cuando se profundiza en la historia familiar o la enfermedad evoluciona identificándose otra enfermedad como por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica<sup>18</sup>.

Aproximadamente un 2%-15% de los casos esporádicos son portadores de mutaciones en alguno de los genes más frecuentemente mutados<sup>114,116,121-124</sup>.

## 1.4. Genética Mitocondrial y PEH

Numerosas evidencias sugieren la existencia de una relación entre la función mitocondrial y la PEH ya que al menos 2 de los genes asociados a PEH codifican

proteínas mitocondriales: *SPG7* y *Hsp60*<sup>166-167</sup>. Además, se ha observado un déficit de la actividad de los complejos I y II/III en pacientes con PEH, independientemente de la presencia de mutaciones en los genes asociados a las proteínas mitocondriales paraplegina y *Hsp60*<sup>46,168</sup>. También se ha descrito una gran familia, que presentaba un cuadro clínico tipo PEH de inicio tardío y herencia por vía materna, en la que finalmente se detectó la mutación m.9176T>C en el gen mitocondrial *ATP6* que codifica para un componente del Complejo V de la cadena respiratoria o ATP Sintasa<sup>37</sup>. Algunos autores incluso han señalado las similitudes entre algunos fenotipos complicados de PEH y la clínica asociada a algunas enfermedades mitocondriales, como son la presencia de demencia, ataxia, atrofia óptica, sordera o neuropatía periférica, entre otras<sup>46,59</sup>.

La disfunción mitocondrial parece un factor determinante en la etiología de numerosas enfermedades degenerativas multisistémicas humanas. La función de estos orgánulos se relaciona, en parte, con las diferentes combinaciones de polimorfismos presentes en el ADN mitocondrial (ADNmt), comúnmente denominadas haplogrupos mitocondriales (Figura 6). Esta relación parece deberse a que los haplogrupos generan sutiles diferencias tanto en las tasas de transcripción y traducción de la molécula de ADNmt como en los niveles de actividad de las proteínas polimórficas que codifican, lo que finalmente se traduce en variaciones en el ratio de producción de ATP, calor y especies de oxígeno reactivas<sup>169-171</sup>. Así, algunos haplogrupos actuarían como factores de susceptibilidad para el desarrollo de diversas patologías y/o como modificadores del fenotipo o de la agresividad con que se manifiesta la enfermedad. Por ejemplo, los haplogrupos J y U se han asociado a un menor riesgo de padecer enfermedad de Parkinson y demencia tipo Alzheimer, respectivamente; mientras que el haplogrupo H se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar esclerosis múltiple. La edad de inicio de la enfermedad de Huntington podría estar condicionada por el haplogrupo H, mientras que ciertos haplogrupos y subhaplogrupos influyen en la penetrancia de algunas mutaciones del ADNmt asociadas a la neuropatía óptica hereditaria de Leber o LHON<sup>172-176</sup>.

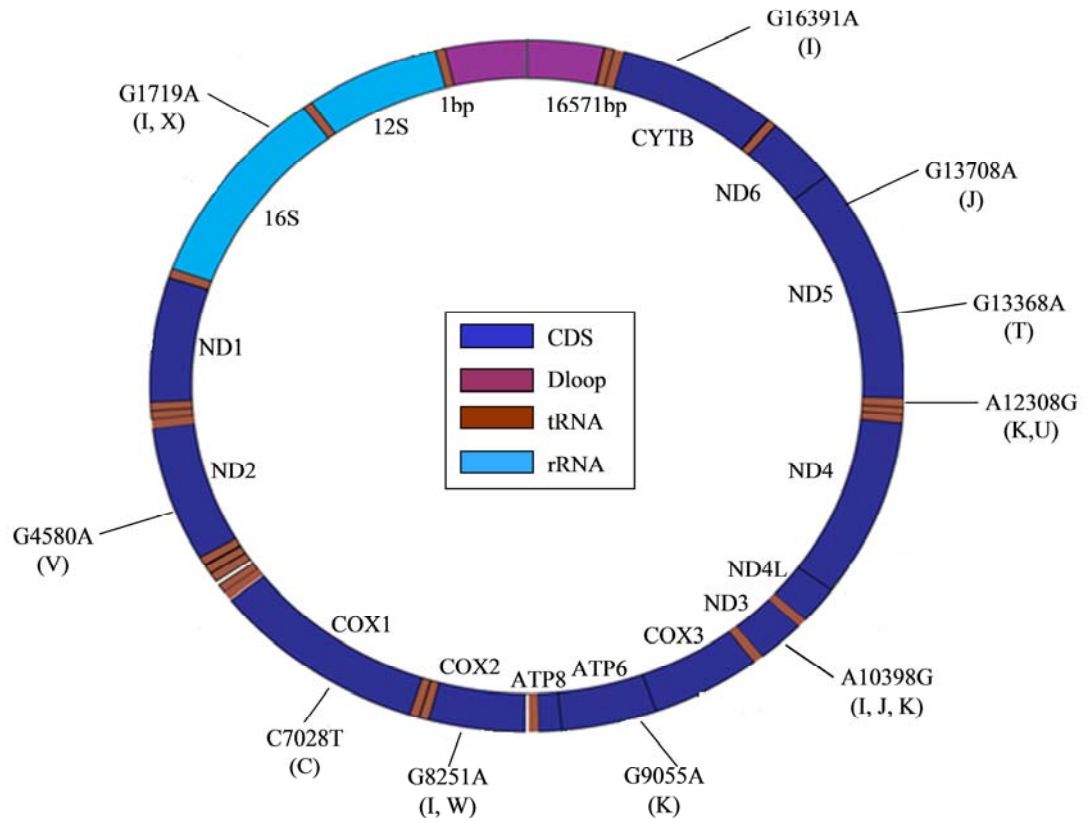


Figura 6. Representación del genoma mitocondrial con los polimorfismos que determinan los haplogrupos mitocondriales europeos más frecuentes (indicados entre paréntesis).



## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es determinar la frecuencia, tipo y correlación con el fenotipo clínico de las mutaciones en los genes *SPAST/SPG4*, *ATLI/SPG3A* y *SPG7* en una cohorte de pacientes españoles con PEH, y establecer si los haplogrupos mitocondriales pueden actuar como factor de riesgo y/o modular el fenotipo de la enfermedad.

Los objetivos concretos fueron los siguientes:

1. Obtener información clínica de una serie de 511 pacientes diagnosticados de PEH.
2. Estudio molecular del gen *SPAST/SPG4* en toda la cohorte de pacientes. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo.
3. Estudio molecular del gen *ATLI/SPG3A* en pacientes con PEH autosómica dominante y/o edad de inicio temprana (menor de 10 años) sin mutación en el gen *SPAST*. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo.
4. Analizar el gen *SPG7* en pacientes con PEH autosómica recesiva y en casos, aparentemente aislados, no portadores de mutación para el gen *SPAST*. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo.
5. Analizar la posible correlación entre la variabilidad fenotípica y los haplogrupos mitocondriales.
6. Elaborar en base a los resultados obtenidos un protocolo de diagnóstico genético-molecular de la PEH en nuestra población.

## ***PACIENTES Y MÉTODOS***



### **3. Pacientes y métodos**

#### **3.1. Pacientes y controles**

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y todos los participantes, tanto pacientes como controles, firmaron un consentimiento informado para su inclusión en el mismo.

En total se incluyeron en el estudio 511 pacientes españoles diagnosticados de paraparesia espástica hereditaria, siendo todos ellos casos índice no emparentados. El diagnóstico fue establecido por neurólogos cualificados pertenecientes a Servicios de Neurología de diferentes hospitales de España en base a los criterios establecidos para la PEH<sup>13</sup>. Los pacientes presentaban fundamentalmente signos piramidales en los miembros inferiores (debilidad y espasticidad) y, mediante los hallazgos clínicos, radiológicos o bioquímicos disponibles, se excluyeron otras causas de paraparesia espástica como esclerosis múltiple, tumores cerebrales, leucodistrofia, etc.

Los datos relativos a la historia clínica que fueron recogidos incluían sintomatología de inicio (retraso en hitos motores como sedestación o deambulación, rigidez, calambres, perturbación de esfínteres, depresión, etc.), signos piramidales (reflejos exaltados, respuesta plantar extensora, tono muscular), debilidad y atrofia muscular en miembros superiores e inferiores, sensibilidad vibratoria, signos y síntomas extrapiramidales (neuropatía periférica, distonía, síndrome o síntomas cerebelosos, atrofia óptica, deterioro cognitivo, retraso mental, etc.).

La presencia de historia familiar se estableció tras entrevista con el paciente y, cuando fue posible, por examen de los familiares en primero y segundo grado del probando, clasificándose como patrón de herencia autosómica dominante o recesiva según el caso. Los pacientes que carecían de antecedentes familiares se catalogaron como “aparentemente esporádicos” mientras que los casos con supuestos antecedentes familiares imposibles de comprobar o sin datos clínicos acerca de los familiares se clasificaron como “patrón de herencia desconocido”.

Por otro lado, para validar las variantes genéticas no descritas previamente, se estudiaron 400 individuos control de la población del Principado de Asturias reclutados a través del Banco de Sangre del Centro Comunitario de Transfusión del Principado de Asturias. Ninguno de ellos presentaba síntomas de PEH u otros desórdenes neurológicos.

### **3.2. Extracción de ADN de sangre periférica**

Se obtuvieron 10 ml de sangre periférica en tubos de extracción con EDTA como anticoagulante. El ADN de los linfocitos fue extraído y purificado siguiendo el método de precipitación salina (*salting out*), previamente descrito por Miller y colaboradores (1988)<sup>177</sup>. El ADN así obtenido se resuspendió en 500 µl de agua destilada con azida sódica. A partir de cada muestra obtenida se preparó un alícuota diluida a unos 50 ng/µl que se conservó a 4°C para su uso diario, reservando el resto para su conservación a –20°C.

### **3.3. Estudio de los genes SPAST, ATL1 y SPG7**

#### **3.3.1. Análisis mediante secuenciación directa**

Se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR por sus siglas en inglés) los 17 exones codificantes del gen *SPAST/SPG4* y unas 50 pb de la regiones intrónicas flanqueantes. Las amplificaciones se realizaron utilizando las parejas de cebadores indicados en la tabla 2, que se diseñaron a partir de la secuencia genómica ENSG00000021574 (<http://www.ensembl.org>).

Para el análisis del gen *ATL1/SPG3A* se amplificaron los exones codificantes 2 a 14 y a unas 50 pb de los intrones flanqueantes tomando como referencia la secuencia genómica ENSG00000198513. Los cebadores empleados se indican en la tabla 3.

Para el gen *SPG7* se amplificaron los 17 exones codificantes junto con 50 pb de los intrones flanqueantes. Además, se amplificó la región 3' no traducida (3'UTR) contenida en el exón 17 (ENSG00000197912). Los cebadores empleados se indican en la tabla 4.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo partiendo de unos 100 ng de ADN, 0.7 µM de cada cebador (sentido, también llamado *forward* o F y antisentido, *reverse* o R) (Thermo, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania), 200 µM de cada desoxirribonucleótido-trifosfato dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (BIOTOOLS B&M Labs, S.A., Madrid, España) y 1 unidad (U) de Taq ADN polimerasa (BIOTOOLS B&M Labs, S.A., Madrid, España), completando con agua destilada hasta un volumen final de reacción de entre 10 y 20 µl según las necesidades. Los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando el kit DNA Extraction Kit (BIOTOOLS B&M Labs, S.A., Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos purificados fueron secuenciados bidireccionalmente. La reacción de secuenciación se realizó utilizando 1-5 µl del producto de PCR, 3 pmol del cebador correspondiente y 5µl Terminator Ready Reaction Mix. Posteriormente, se procedió a la purificación de ésta mediante la adición de 37 µl de solución SAM™ y 9µl de la solución BigDye®XTerminator™ Applied Biosystems (California, EEUU). Los productos purificados se sometieron a electroforesis capilar en un sistema ABI PRISM® Genetic Analyzer 3130 Applied Biosystems (California, EEUU).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el programa informático SeqScape® versión 2.6 y los electroferogramas fueron comparados con la secuencia de referencia del gen correspondiente.

La nomenclatura a nivel de ADN complementario (o cDNA por sus siglas en inglés) y de proteína se realizó siguiendo las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)<sup>178</sup>. En todos los casos se nombraron las posiciones nucleotídicas considerando como la posición 1 el nucleótido A de la metionina indicada como codón de inicio de la transcripción (ATG) en las secuencias de los cDNAs de *SPAST/SPG4* (ENST00000315285), *ATLI/SPG3A* (ENST00000358385) y *SPG7* (ENST00000268704). En cuanto a la región 3'UTR, las posiciones se nombraron tomando como posición 1 el primer nucleótido después del último nucleótido del codón de parada indicado en la secuencia del cDNA.

**Tabla 2. Cebadores empleados en la amplificación del gen *SPAST/SPG4*. Se indican además el exón amplificado, la temperatura de anillamiento de cada pareja de cebadores y el tamaño del fragmento resultante.**

<b>Exón</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>Temperatura de cebamiento (°C)</b>	<b>Tamaño del amplificado (pb)</b>
1	F- GACAGCGACAGGAAGGGAG R- AGAGCCACACGAAGAGGAG	59	474
1	F- GTTTGGTCGCCTTCCACCT R- ACCCCACCGCCTTCTTCC	61	306
2	F- GATTTGCAATATTTAGTGTACTC R- AAATAAATAGATCTGAAATCTGG	54	225
3	F- TTATCGTGAAACAATATTAGTTG R- CTATTTCTTTCTACAAATTAAGTTT	54	225
4	F- TGTTCATTATCTTTTTTCTTTTT R- TAAGTAAGACTCTTACTTTGCATG	54	220
5	F- GTAAATGTTAGGTTGTATTTTCAT R- TCCTGACATGTTTTATAAGTAAA	54	315
6 y 7	F- TCATAGGGCTTAGGCTTC R- TGGATTCAGTAACAGATGGT	54	630
8	F- CTGTTTGGGAAGATGCTACTG R- CTCAAGGACAAGATAAGTTTCTT	54	260
9	F- GGCCTCATAGCTTACATTTTITAG R- ATACGACAATATTGGAAACAGAG	54	220
10 a 12	F- CTGTGTGCTAGATTTTCAACA R- TGTAAGATGGACACATGAGTAA	54	780
13	F- CTTTTCCTGTCATTTGCTGT R- GATGGTAGTTCTTGTTTCTGC	54	182
14	F- ATCATTAAATTCTGAAATTAGACTGA R- ACTCATTTCATACTTAAGATTACTTT	54	220
15	F- GATCATGCCATTGCACTC R- GGACTTCTTAAACTTCTAAGGTG	54	240
16	F- TGTATGTATTTTAAAGTGCCTGAC R- TTACAATATAGAAGACAAAGAAAAT	54	125
17	F- AACCACCATATACCTGTTGA R- GTAAGACTCTAAAAAGTCTCTGTAA	54	300

**Tabla 3. Cebadores utilizados en la amplificación del gen *SPG3A/ATL-1*. Se indican además la temperatura de anillamiento de cada pareja de cebadores, el exón amplificado y el tamaño del fragmento resultante.**

<b>Exón</b>	<b>Secuencia (5' →3')</b>	<b>Temperatura de cebamiento (°C)</b>	<b>Tamaño del amplificado (pb)</b>
2	F- AGCATAAAATGAGCATTTATAA R- AAAGCACTGAGGTTGGAAT	54	410
3+4	F- CCTTTTAACTCGAATTGGAG R- CTAATTATAACATGTATGTAGAAACAC	54	883
5	F- GTGGTAACTGATATTTTTAAAAGT R- CAGAATCAGAATCTGATTATGTT	54	246
6	F- GAAAGAAAGCCAAGAATTA R- GAGAAGGAAACATGACCCT	54	241
7+8	F- ACTGGTTTCCATATAAAGCA R- AAAATGACATTTTTATAATCAGAC	54	1200
9	F- GAGTGATGGCATTATCACTG R- GTACCTTTGCTCCCATATTAT	54	347
10	F- GGGAATTTAAGTATGAGAAAGA R- ATTCTGTCTAATATTGTTATTTGG	54	182
11	F- ATTTTGAGGACTTTGGTTTCT R- GTGTGTACAGTGTAAACATGGAA	54	270
12	F- TTTTGATACAGTTGCCAATT R- ACATTCAAATGTGTGCTGAA	54	550
13	F- AAATTAATATTGTAAGCAAAGTTG R- CACCAAAGATTGTTCTAATCTAC	54	277
14	F- TTTTACATCTGTGTGTTTAATAAA R- AGCACTTTGAATGTTTGCA	54	250



**Tabla 4. Cebadores utilizados en la amplificación del gen *SPG7*. Se indican además la temperatura de anillamiento de cada pareja de cebadores, el exón amplificado y el tamaño del fragmento resultante.**

Exón	Secuencia (5' → 3')	Temperatura de cebamiento (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
1	F- AGCTGTGGGGACCGCGCA R- GGCTGGGCCTTACAGAGCAGA	65	329
2	F- CGATTTTTAGTCTGCATTGCT R- GAGCTCTGATCACACCATTG	56	330
3	F- GATATAAGTAGGTTTTTCAGATGG R- GACTGGTTTCACCTTGCTAA	58	300
4	F- TCTGTTGCTCATGTGTTTGTT R- CCACAGCCTCACTCTCACA	54	365
5	F- TAGTTTCTGAATGGTGTCCCTCT R- CAAGCATCAACAAATACATCC	58	303
6	F- CTCATCTTGGAACATTGCC R- CTTATGGGAAAAGTATTCAGCA	58	272
7	F- GACATGAGTGAAGCCTTGG R- CACGTCATCGATGGAATTC	56	347
8	F- GACCCAGAGAGACCTTACCTC R- CCAGAGGAAGGATGTGTGA	58	317
9	F- GTACAGGAAGAGGCTTTGTTT R- TGTTCTGAAAGACATCGGAA	56	306
10	F- GGGGAAATCTGTTGTGTCA R- TCTTAGAGGAGAGGCCAGAC	58	277
11	F- TGTGGCAGTAACTAGGCTTGA R- CAGGCTTGTA CTGAGCAGA	55	293
12	F- TCCTCTTAAGCCCTGATAGC R- TTCCATCCACCTCACCTCT	58	265
13	F- CTCGAACTCCTGTCCCTCAG R- CCCAGTCAGCTACTGACACA	55	331
14	F- TAATGACGGAGACCTCTTAGTC R- ATGCACTGGAACAGAAGGA	56	320
15	F- CTGCCTCAGTGCTCTGAC R- CGACCCTTGTGTGGTAGA	55	336
16	F- GTGTTCCCAGTCTGCCATT R- CCTTGGAATACTTCACGAGA	56	259
17	F- GGACATAGAGATGCTCTGTCTG R- CTCAGCTGAAAAGCAACTCA	56	348
3'UTR-I	F- AGAAACAGGACTTGGGCGAG R- GATCCCCTTAGCATTCCGAG	65	500
3'UTR-II	F- CAGTCGTTCCCAGTGTGGC R- TGTGATCCAGGGCAAGCC	65	450

### **3.3.2. Análisis mediante MLPA**

El análisis mediante Amplificación de Múltiples Sondas dependiente de Ligación (o MLPA del inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) permite amplificar simultáneamente varias regiones del genoma, pertenecientes a uno o diferentes genes, y detectar alteraciones de dosis (duplicaciones/delecciones) que pueden afectar a uno o varios exones o a la totalidad del gen<sup>179</sup>. La detección de reordenamientos se realizó utilizando la técnica MLPA con la mezcla de sondas SALSA MLPA P165 para los genes *SPAST* y *ATL1* y con la SALSA MLPA P213 para el gen *SPG7* (MRC Holland). En ambos casos el protocolo utilizado fue el recomendado por el proveedor. Brevemente, se mezcló 1 µl de la mezcla de sondas correspondiente y 5 µl del ADN molde desnaturalizado y se incubó la mezcla a 60°C durante 16 horas para facilitar su hibridación. A continuación se agregó una ligasa capaz de unir cada pareja de sondas hibridadas en secuencias adyacentes para formar un oligonucleótido. Éste se empleó como molde para la posterior reacción de PCR realizada mediante el uso de una pareja de cebadores universales, que hibridan en secuencias consenso presentes en todas las sondas (Figura 7). El producto de esta PCR se sometió a electroforesis capilar en un equipo ABI3130 o 3130XL. El análisis de fragmentos se realizó con el programa *GeneMapper* versión 4.1 (Applied Biosystems, California, EEUU). Posteriormente, los datos numéricos se descargaron a una hoja Excel y se trataron según los métodos previamente descritos por Beetz y colaboradores (2006)<sup>180</sup>. A modo de resumen, la fluorescencia de cada banda se puede medir como una curva cuya área queda definida por la altura del pico y la amplitud del mismo. El valor del área bajo la curva (VAC) correspondiente a cada sonda de cada muestra fue normalizado mediante dos cálculos: 1) división de cada VAC entre la suma de los VAC de las cuatro sondas controles más similares en tamaño y 2) división del valor obtenido en el primer paso entre la mediana de los VAC de todas las sondas del mismo tamaño. De este modo se obtuvo un ratio para cada sonda de cada muestra que indicaba el número de dosis del fragmento correspondiente en el genoma: 0 = ninguna (delección en homocigosis), menor de 0.5 = una dosis (delección en heterocigosis), entre 0.5 y 1.5 = dos dosis, y mayor de 1.5, más de dos dosis (amplificación: duplicación, trisomía, tetraploidía, etc.).

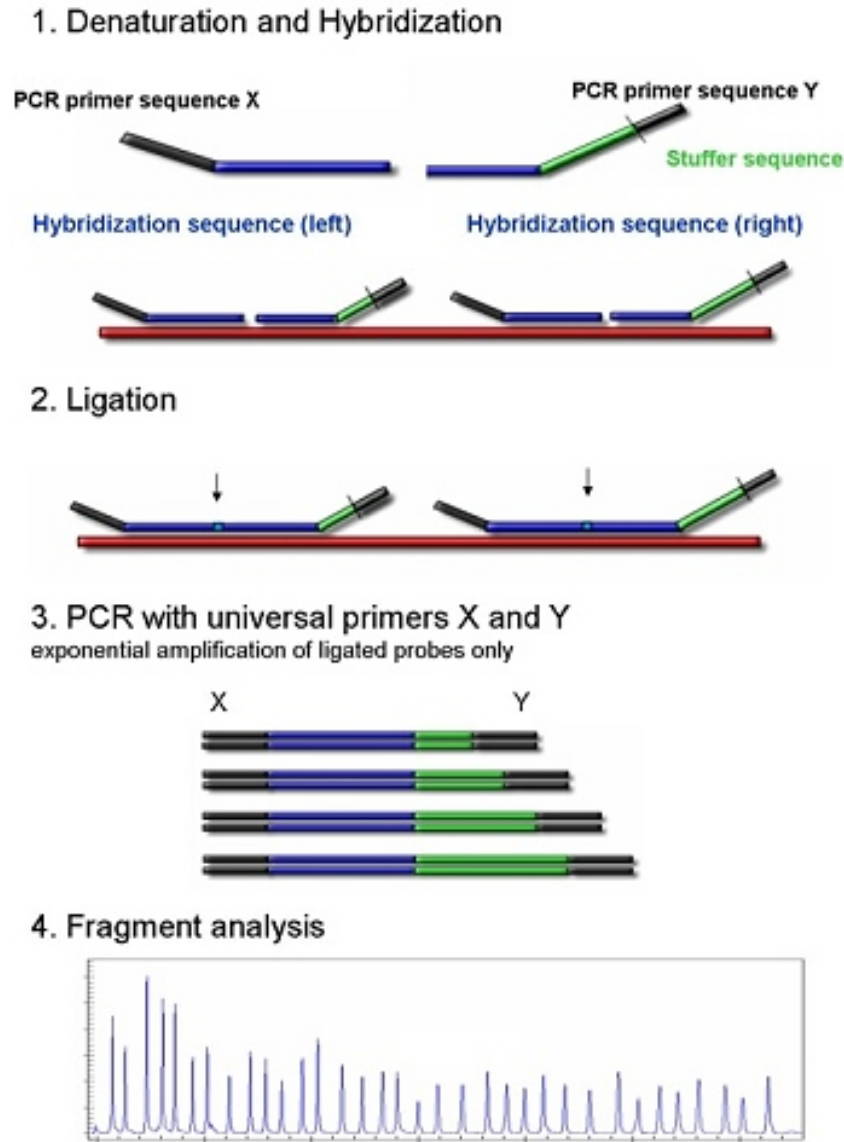


Figura 7. Esquema de la reacción de MLPA y electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar en secuenciador automático, correspondiente al perfil de MLPA de una muestra (Imagen extraída de la página web MRC-Holland <http://www.mlpa.com>).

### 3.3.3. Análisis de transcritos de los genes *SPAST* y *SPG7*

Para determinar el efecto a nivel de ARNm de algunas mutaciones en los genes *SPAST* y *SPG7*, se extrajo el ARN total de una muestra de 10 ml de sangre periférica de cada paciente mediante el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987)<sup>181</sup>. Brevemente, tras aislar los linfocitos se lisaron mediante 1 ml del reactivo TRIzol® Reagent (SIGMA), se añadieron 200 µl de cloroformo y se centrifugó la muestra. Se tomó la fase superior acuosa y se precipitó el ARN mediante 500 µl de Isopropanol frío. Tras un lavado con etanol al 75% frío se resuspendió el ARN en 12 µl de agua estéril y se midió su concentración mediante un espectrofotómetro NanoVue Plus (GE

Healthcare, New Cork, EEUU). A partir del ARN total se realizó la retrotranscripción para obtener el cDNA, empleando 1 µg de ARN como molde y usando el kit comercial QuantiTect® Revers Transcription Kit (QUIAGEN, GmbH, Hilden). Este kit contiene, además de una retrotranscriptasa apropiada, una mezcla de cebadores tanto oligo-dT como oligonucleótidos aleatorios o degenerados que permiten la síntesis de cDNA a partir de todos los transcritos presentes en la muestra incluyendo sus regiones 5' no traducidas (5'UTR por sus siglas en inglés). El cDNA obtenido fue utilizado como molde para amplificar, mediante PCR, el fragmento teóricamente afectado por cada una de las mutaciones utilizando los cebadores indicados en la tabla 5. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa para su visualización y los productos de amplificación se purificaron mediante el kit de columnas comerciales Montage Gel Extraction Kit (Millipore™, Billerica, MA, EEUU) y fueron secuenciados, utilizando el protocolo anteriormente descrito.

**Tabla 5. Cebadores empleados en la amplificación de los cDNAs de los genes *SPAST* y *SPG7*.**

Exones	Secuencia del cebador	Tª de cebamiento (°C)	Tamaño (pb)
<b><i>SPAST/SPG4</i></b>			
2 a 7	2F- 5' GCTGTGGAATGGTATAAGAA 7R- 5' CAGAGAAGGAAGAATAACAAT	54	660
7 a 17	7F- 5' AATTTGATGATATAGCTGGTCG 17R- 5' GTAAGACTCTAAAAAGTCCTGTAA	54	898
11 a 17	11*F-5' TTTTGTGTGAAAGAAGAGAAG 17R- 5' GTAAGACTCTAAAAAGTCCTGTAA	54	631
<b><i>SPG7</i></b>			
1 a 4	1F- 5' GGCCTGGAGTCCAGGGTT 4R- 5' ACAAAGTCGTTCCAGGAAAATGC	56	432
1 a 10	1F- 5' GGCCTGGAGTCCAGGGTT 10R- 5' GGCCTGGCCTCATCAGAG	56	1328

### **3.4. Estudio de los haplogrupos mitocondriales**

El genotipado de cada una de las variantes se realizó por amplificación de la región de interés con cebadores específicos y digestión de los productos de amplificación con endonucleasas de restricción (Tabla 6). La digestión se realizó en un volumen final de reacción de 12µl, incluyendo 10µl del correspondiente producto de PCR con la adición de 0,5-1U del enzima de restricción apropiado y 1µl del tampón (10X). La mezcla se incubó a la temperatura óptima para cada endonucleasa (37°C ó 60°C según el caso)

durante al menos 2 horas. Finalmente se añadieron 3µl del tampón de carga rojo cresol (0,25 mg/l) a 5µl del producto de la digestión y se cargó la mezcla en un gel de agarosa a una concentración del 2-3% según las necesidades, que se sometió a electroforesis para visualizar los fragmentos resultantes de la digestión.

**Tabla 6. Cebadores empleados en el estudio de los polimorfismos mitocondriales. Se indican además, las temperaturas de anillamiento para cada pareja de cebadores, el enzima de restricción utilizado para digerir cada fragmento y el tamaño de los fragmentos resultantes en función del alelo.**

Polimorfismo	Secuencia (5' -> 3')	Tª (°C)	Tamaño (pb)	Enzima de restricción	Alelos (pb)
G1719A	TCACCCTCCTCAAGTATACTTCA ATTTGGGTAAATGGTTTGGC	58	250	Dde I	G:148+79 +23 A: 148+102
G4580A	ACCTATCACACCCCATCCTAAA AAGGATTATGGATGCGGTT	60	300	Nhe I	G: 200+100 A: 300
C7028T	AATGATCTGCTGCAGTGCTC TCCGGATAGGCCGAGAA	60	308	Alu I	C: 156+152 T: 152+126 +30
G8251A	ATGCAATCCCGGACGTCT TTCACCTGTAAAGAGGTGTTGGTTCT	54	263	Hae III	G: 149+114 A: 263
G9055A	CCCATACTAGTTATTATCGA TAGGGGTCATGGGCGGGTT	58	300	Hha I	G: 185+115 A: 300
A10398G	AGCCCTACAAACAACCTGC AGTAGGGAGGATATGAGGTGTGAG	53	273	Dde I	A: 205+68 G: 167+68 +38
A12308G	ATTTACCGAGAAAGCTCACAAG TTTTATTTGGAGTTGCACCAAGAT	60	134	Hinf I	A: 134 G: 109+25
G13368A	TAGCCTTCTCCACTTCAAGTC AGAAACCTGTAGGAAAGGTATT	60	264	Sau96 I	G: 137+127 A: 264
G13708A	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA AAGTCCTAGGAAAGTGACAGC	57	318	Fnu4 HI	G: 197+121 A: 318
G16391A	AACCTACCCACCCTTAACAG CATCGTGATGTCTTATTTAAGGG	60	286	Sau96 I	G: 114+104 +65 A: 172+114

### 3.5. Caracterización de nuevas mutaciones

La caracterización de las variantes no descritas (polimorfismo o mutación) se realizó del siguiente modo:

1. Estudio de segregación de la nueva variante con la enfermedad en la familia en aquellos en casos en que dispuso de muestras de sangre de familiares del probando.

2. Estudio de 400 controles sanos a fin de determinar la frecuencia de la nueva variante en la población control, ya que su presencia en la población control haría pensar que se trata de una variante no patogénica. El análisis de cada una de las variantes en población control se realizó bien por PCR-RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) o por SSCA (del inglés *Single Strand Conformation Analysis*) de acuerdo a protocolos previamente descritos<sup>182-183</sup>.
3. Análisis de segregación alélica con marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del genoma para confirmar el carácter *de novo* de la mutación en aquellas familias en las que se halló una mutación no presente en los dos progenitores del paciente.
4. Análisis bioinformático de la variante:
  - a) Estimación de la conservación evolutiva del residuo mediante la alineación de las secuencias genómicas de cada gen en diferentes especies. Estas secuencias fueron descargadas de la base de datos Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Evaluación del posible efecto sobre el proceso de ajuste y empalme de aquellas variantes próximas a un sitio de ajuste y empalme, mediante los programas gratuitos NNSplice0.9 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) y Human Splicing Finder v.2.4 (<http://www.umd.be/SSF>).
  - b) El efecto de los cambios de aminoácido sobre la función y estructura de la proteína fue estimado mediante dos herramientas: PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) y SIFT (<http://sift.jcvi.org/>).
  - c) Se consultaron diversas bases de datos para estimar si las variantes halladas en la región 3'UTR podían afectar a la diana de unión de algún microARNs: Microcosm (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), miRanda y mirSVR ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)), DIANA LAB (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>), miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_40/](http://www.targetscan.org/vert_40/)) y MicroTar (<http://tiger.dbs.nus.edu.sg/microtar/>).

### **3.6. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0 (IBM, Armonk, Nueva York, EEUU). Para todos los análisis realizados el nivel de significación se estableció en 0,05.

El test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) se empleó para comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de cada variante hallada y para comparar las frecuencias de cada haplogrupo mitocondrial entre pacientes y controles. Se empleó el test exacto de Fisher cuando el valor en alguna de las casillas era inferior a 5, atendiendo al resultado del contraste bilateral. Del mismo modo se analizaron las frecuencias de otras variables cualitativas como “sexo” (hombre o mujer), “fenotipo” (puro, complicado o desconocido), “antecedentes familiares” (presencia o ausencia) o “patrón de herencia” (esporádico, autosómico dominante, autosómico recesivo o desconocido/datos insuficientes).

Las variables continuas “edad al diagnóstico”, “edad de inicio de los síntomas” y “duración de la enfermedad” fueron analizadas mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) comparando grupos de pacientes definidos en base al gen mutado, patrón de herencia, fenotipo y sexo.

Se utilizó la regresión logística multivariante para determinar el efecto de los diferentes haplogrupos y polimorfismos mitocondriales sobre el fenotipo, incluyendo como covariables la edad de inicio, el sexo y la historia familiar.

Para analizar la desviación de las frecuencias genotípicas de las variantes más comunes respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg se empleó el programa disponible en la página electrónica de *Genetic Calculations applets and other programs* (<http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/0.htm>).

## ***RESULTADOS***





## 4. Resultados

### 4.1. Características demográficas

Se estudiaron un total de 511 casos índice de PEH no emparentados entre si y procedentes de diversas regiones españolas. Las características poblacionales de esta muestra de pacientes se resumen en la tabla 7. Además, se analizaron un total de 130 muestras pertenecientes a familiares de los casos índice con mutación caracterizada.

Del total de probandos, 170 (33%) presentaban un patrón de herencia autosómico dominante (PEH-AD), 49 (10%) un patrón de herencia autosómica recesiva (PEH-AR), y 292 (57%) eran aparentemente esporádicos (PEH-SP) por carecer de antecedentes familiares de la enfermedad o de consanguinidad o con historia familiar desconocida.

Un total de 390 pacientes (76%) presentaban fenotipo puro, mientras que 121 (24%) eran casos complicados. El hallazgo clínico más frecuente en formas complicadas fue el síndrome cerebeloso, pero también había pacientes con neuropatía periférica, deterioro cognitivo, retraso mental, amiotrofia, atrofia óptica, distonía o adelgazamiento del cuerpo calloso, entre otros. Observamos una asociación significativa entre el tipo de herencia y el fenotipo, de modo que la frecuencia de casos puros era significativamente mayor entre los pacientes con PEH-AD (90%; 154/170 vs. 69%;236/341; p-valor < 0,001). No observamos diferencias en las frecuencias de fenotipo puro entre los casos AR (72%) y los aparentemente esporádicos (69%).

La edad de inicio (EI) se situó entre el primer año de vida y los 77 años, con una media de 28 años y una desviación típica de  $\pm 20$  años. Un 30% de los casos presentaron síntomas a edades inferiores a los 10 años y un 44%, antes de los 20 años. La EI media fue de 29 años ( $\pm 19$ ) en los casos de PEH-AD, 27 años ( $\pm 19$ ) en los AR y 27 años ( $\pm 21$ ) en los PEH-SP. No se hallaron diferencias significativas en la EI en función del modo de herencia (p-valor del test ANOVA = 0,554).

La EI fue significativamente menor en los casos complicados ( $22 \pm 21$  años) que en los puros ( $30 \pm 19$  años) (p-valor = 0,001). De hecho, observamos una disminución de la proporción de casos complicados al aumentar la edad de inicio pasando de un 37%, entre los pacientes con inicio antes de los 10 años (N = 155), a un 22%, cuando la EI se situaba entre los 10 y los 20 años (N = 71). Cuando la EI era posterior a los 30 años, la proporción de casos complicados se mantuvo alrededor del 18%.

La edad al diagnóstico mínima fue de 1 año y la máxima, de 86 años; obteniéndose una edad de diagnóstico media de  $42 \pm 20$  años. El 50% de los pacientes eran diagnosticados en los primeros 10 años desde el inicio de los síntomas; el 30%, en los primeros 5 años; el 20%, en los tres primeros años y el 10%, durante el primer año. Al comparar entre sí los diferentes modos de herencia observamos que la ED era mayor entre los casos de PEH-AD ( $46 \pm 18$  años) que en los casos de PEH-SP ( $41 \pm 21$  años; p-valor = 0,001). En los pacientes con PEH-AR la edad también fue inferior ( $42 \pm 17$  años; p-valor = 0,095) aunque las diferencias no llegaron a ser significativas, quizá por el menor tamaño muestral de este grupo. No se hallaron diferencias significativas en función del fenotipo. La duración media de la enfermedad fue de 15 años ( $\pm 14$ ), distribuida en un rango de entre 0 y 67 años. No se hallaron diferencias significativas en función de la herencia o el fenotipo.

La proporción de hombres y mujeres en nuestra cohorte fue equitativa con un 53% de hombres, lo que da un ratio hombres:mujeres de 1:1. No encontramos ninguna correlación entre el sexo y la presencia de antecedentes familiares, el fenotipo o la edad de inicio.

**Tabla 7. Características poblaciones de los pacientes incluidos en el estudio.**

<b>Modo de herencia (%)</b>	Autosómico dominante	170 (33)
	Autosómico recesivo	49 (10)
	Aparentemente esporádico	292 (57)
<b>Fenotipo (%)</b>	Puro	390 (76)
	Complicado	121 (24)
<b>Edad al diagnóstico (años)</b>	Media $\pm$ DT	$42 \pm 20$
	Rango	1 – 86
<b>Edad de inicio (años)</b>	Media $\pm$ DT	$28 \pm 20$
	Rango	0 – 77
<b>Duración (años)</b>	Media $\pm$ DT	$15 \pm 14$
	Rango	0 – 67
<b>Sexo</b>	Hombres (%)	269 (53)

## 4.2. Estudio del gen SPAST

El estudio molecular del gen *SPAST/SPG4* se realizó en todos los casos índice (n = 511) de los que 70 (14%) fueron portadores heterocigotos de una mutación en este gen. De

éstos, 56 (80%) eran casos con PEH-AD, 13 (19%) eran aparentemente esporádicos y una familia presentaba un patrón de herencia recesivo (1%). Además, 64 (91%) presentaban un fenotipo puro y 6 (9%), complicado.

La frecuencia de portadores en función del modo de herencia fue de un 33% (56/170) en los pacientes con PEH-AD, un 4% (13/292) en los casos esporádicos y un 2% (1/49) en los PEH-AR. Tres de los casos aparentemente esporádicos resultaron ser portadores de mutaciones *de novo* (p.Leu426Val, p.Lys503\_Arg504insArg y p.Met390Val) tras confirmarse la ausencia de las mismas en los progenitores y realizar un análisis de segregación alélica para verificar la paternidad (Figura 8).

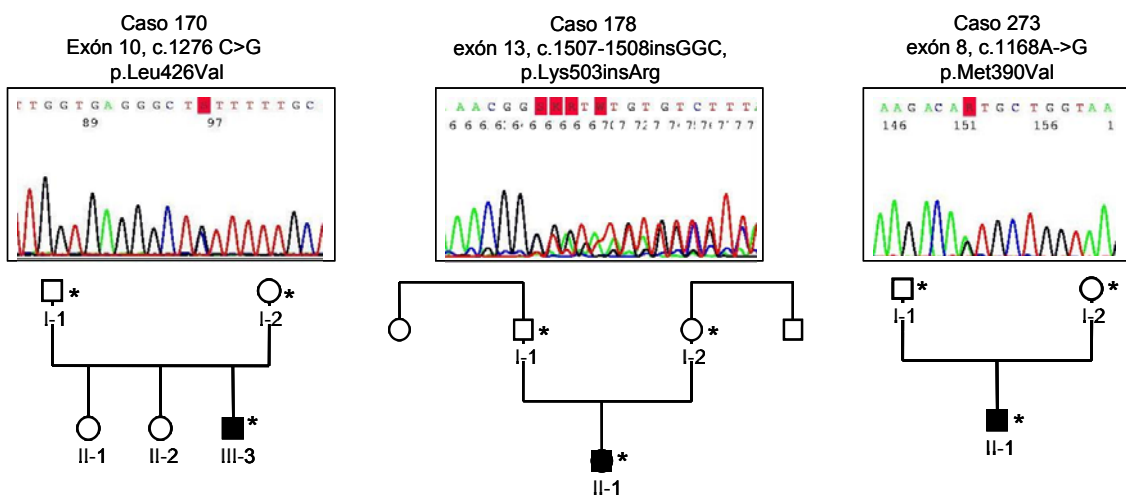


Figura 8. Casos portadores de mutaciones *de novo* en el gen *SPAST/SPG4*. Los asteriscos señalan los familiares del caso índice analizados.

#### 4.2.1. Mutaciones puntuales en el gen *SPAST*

Mediante secuenciación hallamos 57 mutaciones en heterocigosis, de las que 6 estaban presentes en 2 pacientes cada una: p.Glu398fs\*9, p.Phe404del, p.Pro489Leu, p.Arg562\*, p.Ile580Thr, p.\*617Glu (Tabla 8). 26 mutaciones (46%) generaban cambios de aminoácidos conservados en la escala evolutiva, 10 (18%) eran variantes que alteraban la pauta de lectura, 9 (16%) eran mutaciones sin sentido, 7 (12%) afectaban a las secuencia consenso de ajuste y empalme entre exones e intrones, 4 (7%) generaban inserciones y deleciones de aminoácidos y 1, daba lugar a mutación de sentido en el codón de parada.

El 61% (35/57) de estas mutaciones fueron nuevas y sólo 3 de éstas aparecieron en dos pacientes aparentemente no emparentados (p.Glu398fs\*9, p.Ile580Thr, p.\*617Glu), si bien procedían de áreas geográficas cercanas. Dentro de las mutaciones puntuales

descritas previamente, 3 de ellas fueron recurrentes: p.Phe404del, p.Pro489Leu, p.Arg562\*.

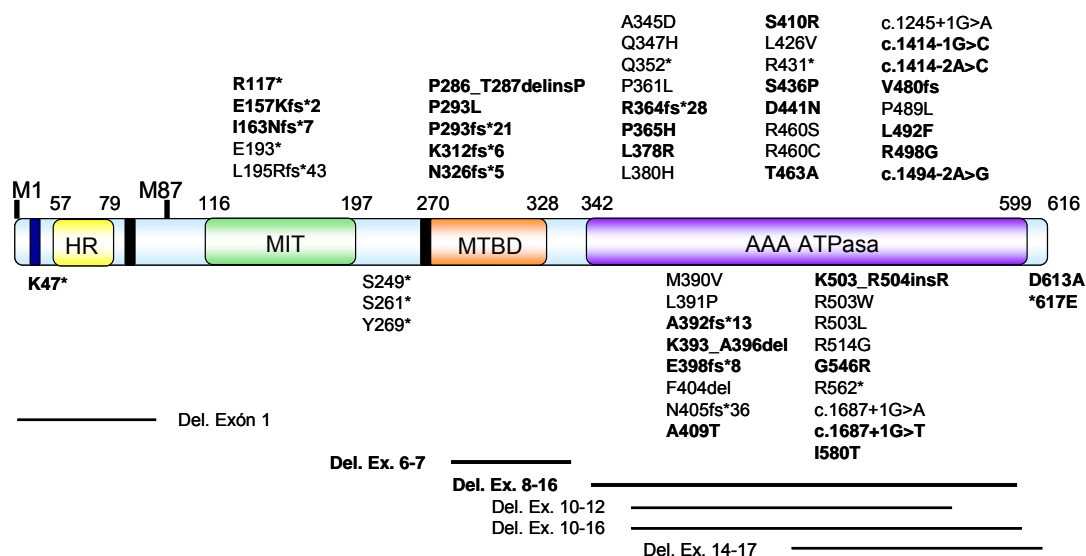
Las mutaciones se distribuyeron a lo largo de todo el gen, a excepción de los exones 4 y 16. El exón más frecuentemente mutado fue el exón 9 en el cual se localizaban un 14% de las mutaciones (8/57) (Figura 9).

**Tabla 8. Mutaciones halladas en el gen *SPAST/SPG4*.**

Caso	EI (años)	Modo de herencia	Fenotipo	Exón	Cambio de nucleótido	Efecto en la proteína	Referencia
401	-	Esporádico	Puro	1	c.139A>T	p.Lys47*	Este estudio
193	60	Desconocido	Puro	1	c.349C>T	p.Arg117*	86
69	45	Esporádico	Puro	2	c.469delG	p.Glu157Lysfs*2	86
415	20	AD	Puro	2	c.486_487insA	p.Ile163Asnfs*7	Este estudio
81	35	Esporádico	Puro	3	c.577C>T	p.Glu193*	93
138	2	AD	Complicado	3	c.583C>G	p.Leu195Argfs*43	95
300	8	AD	Puro	5	c.746C>G	p.Ser249*	184
166	43	AD	Puro	5	c.782C>G	p.Ser261*	93
257	23	AD	Puro	5	c.806C>G	p.Tyr269*	93
197	53	AD	Puro	5	c.857_859delCTA	p.Pro286_Thr287delinsPro	86
335	32	Esporádico	Puro	6	c.878C>T	p.Pro293Leu	86
174	1	AD	Puro	6	c.879delG	p.Pro293fs*21	86
205	20	AD	Puro	6	c.936_937insA	p.Lys312fs*6	86
206	30	Desconocido	Puro	6	c.977_978insA	p.Asn326fs*5	86
405	40	AD	Puro	7	c.1034C>A	p.Ala345Asp	Este estudio
13	40	AD	Puro	7	c.1040A>C	p.Gln347His	Este estudio
133	35	AD	Puro	7	c.1054C>T	p.Gln352*	86
130	0	AD	Complicado	7	c.1082C>T	p.Pro361Leu	16
351	-	AD	Puro	7	c.1091_1098delGGCCTGAG	p.Arg364fs*28	86
481	40	AD	Puro	7	c.1094C>A	p.Pro365His	Este estudio
111	49	AD	Puro	8	c.1133T>G	p.Leu378Arg	86
47	66	AD	Puro	8	c.1139T>A	p.Leu380His	96
273	1	Esporádico	Complicado	8	c.1168A>G	p.Met390Val	185
180	54	AD	Puro	8	c.1172T>C	p.Leu391Pro	94
22	42	AD	Puro	9	c.1174_1180delGCTAAG	p.Ala392fs*13	86
32	35	AD	Puro	9	c.1177_1180delAAAGCAGTAGCT	p.Lys393_Ala396del	86
98	29	AD	Puro	9	c.1192_93delGA/insT	p.Glu398fs*8	86
179	10	AD	Puro	9	c.1192_93delGA/insT	p.Glu398fs*8	86
52	45	AD	Puro	9	c.1210_1212delTTT	p.Phe404del	186
80	38	AD	Puro	9	c.1210_1212delTTT	p.Phe404del	186
7	44	AD	Puro	9	c.1215_1219delTATAA	p.Asn405fs*36	93
23	35	AD	Puro	9	c.1226G>A	p.Ala409Thr	86
363	2	AD	Puro	9	c.1228A>C	p.Ser410Arg	86
398	64	AR	Puro	Intrón 9	c.1245+1G>A	Elimina el exón 9	87
170	3	Esporádico	Complicado	10	c.1276C>G	p.Leu426Val	93
488	39	AD	Puro	10	c.1291C>T	p.Arg431*	93

(Continuación tabla 8)

Caso	EI (años)	Modo de herencia	Fenotipo	Exon	Cambio de nucleótido	Efecto en la proteína	Referencia
135	47	AD	Puro	10	c.1306T>C	p.Ser436Pro	86
373	10	AD	Puro	10	c.1321G>A	p.Asp441Asn	86
200	35	AD	Puro	11	c.1378C>A	p.Arg460Ser	187
429	3	Esporádico	Puro	11	c.1379C>T	p.Arg460Cys	188
50	2	AD	Puro	11	c.1387A>G	p.Thr463Ala	86
322	30	AD	Puro	Intron 11	c.1414-1G>C	Elimina el exón 12	86
308	30	AD	Puro	Intron 11	c.1414-2A>C	Elimina el exón 12	86
86	40	AD	Puro	12	c.1439_1145delTACTTGT/insC	p.Val480fs	86
118	61	AD	Puro	12	c.1466C>T	p.Pro489Leu	189
339	50	AD	Puro	12	c.1466C>T	p.Pro489Leu	189
352	-	AD	Puro	12	c.1474C>T	p.Leu492Phe	86
177	20	AD	Puro	12	c.1492A>G	p.Arg498Gly	86
145	16	AD	Puro	Intron 12	c.1494-2A>G	Elimina el exón 13	86
178	1	Esporádico	Puro	13	c.1507_1508insGGC	p.Lys503_Arg504insArg	86
334	32	AD	Puro	13	c.1507C>T	p.Arg503Trp	95
470	-	AD	Puro	13	c.1508G>T	p.Arg503Leu	92
358	30	AD	Puro	14	c.1540A>G	p.Arg514Gly	98
427	-	Esporádico	Puro	15	c.1636G>C	p.Gly546Arg	Este estudio
253	18	AD	Puro	15	c.1684C>T	p.Arg562*	93
379	38	AD	Puro	15	c.1684C>T	p.Arg562*	93
261	50	AD	Puro	15	c.1687+1G>A	Elimina el exón 15	93
62	40	AD	Puro	15	c.1687+1G>T	Elimina el exón 15	86
103	40	AD	Puro	17	c.1739T>C	p.Ile580Thr	86
112	56	AD	Puro	17	c.1739T>C	p.Ile580Thr	86
310	36	Desconocido	Puro	17	c.1838A>C	p.Asp613Ala	86
212	35	AD	Puro	17	c.1849T>G	p.*617Glu	86
286	54	Desconocido	Complicado	17	c.1849T>G	p.*617Glu	86
<b>DELECCIONES EXÓNICAS</b>							
383	20	AD	Puro	Exón 1	c.1A-?_415G+?	p.Met1_p.Lys138del	180
225	14	AD	Puro	Exones 6-7	c.871G-?_1098G+?del	p.Gly291_Glu366del	86
477	30	AD	Puro	Exones 8-16	c.1099T-?_1728G+?de	p.Leu367_Glu576del	Este estudio
123	50	AD	Complicado	Exones 10-12	c.1246G-?_1494+?del	p.Val416_Arg498delfs*13	180
199	20	AD	Puro	Exones 10-16	c.1246G-?_1728G+?del	p.Val416_Glu576del	190
167	-	AD	Puro	Exones 10-16	c.1246G-?_1728G+?del	p.Val416_Glu576del	190
418	45	AD	Puro	Exones 14-17	c.1537A-?_1851A+?del	p.Val513_*617del	191



**Figura 9. Localización de las mutaciones en la espastina. En negrita se indican las mutaciones nuevas.**

### Mutaciones de cambio de aminoácido

De las 57 mutaciones puntuales detectadas, 41 (72%) se localizaban en el dominio AAA (Figura 9). De las 26 mutaciones de cambio de sentido, 24 (92%) se localizaron en el dominio AAA. Las dos mutaciones de cambio de aminoácido localizadas fuera de este dominio, p.Pro293Leu y p.Asp613Ala, afectaban a aminoácidos conservados evolutivamente y no estaban presentes en los cromosomas control.

El paciente portador de la variante p.Pro293Leu era varón con una edad de inicio de 31 años, una duración de la enfermedad de 18 años y fenotipo puro. Tanto su hermana de 46 años como una de sus hijas, de 18, eran portadoras heterocigotas. Ambas presentaban hiperreflexia y signo de Babinski, pero sin espasticidad y con marcha normal.

La variante p.Asp613Ala se detectó en un paciente varón de 45 años con fenotipo puro e inicio a los 36 años que no refería antecedentes familiares, aunque no se pudo examinar ni clínica ni genéticamente a sus familiares directos.

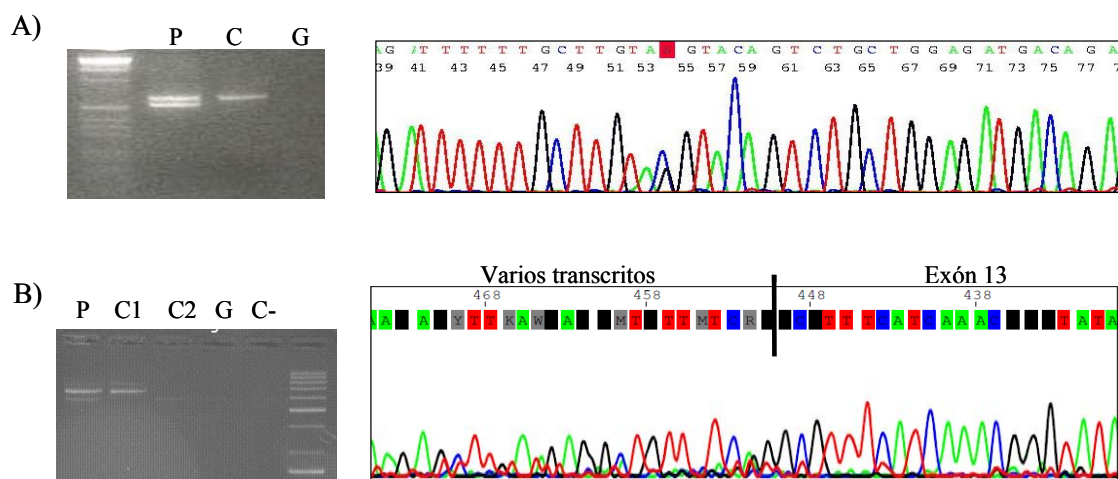
Además, encontramos la variante de significado incierto p.Ile328Leu en un paciente de 15 años que presentaba fenotipo complicado y edad de inicio temprana (18 meses). El cambio no fue detectado en los cromosomas control y afecta a un aminoácido conservado en la escala evolutiva (Tabla 10). Su abuela paterna (asintomática) también era portadora, pero no fue posible obtener muestra ni información clínica del padre. La



predicción bioinformática sugería que el cambio p.Ile328Leu no tendría un efecto patogénico.

### **Mutaciones que afectan al proceso de ajuste del ARNm**

Encontramos seis cambios intrónicos (c.1245+1G>A, c.1414-1G>C, c.1414-2A>C, c.1494-2A>G, c.1687+1G>A y c.1687+1G>T) en las secuencias consenso implicadas en el proceso de corte y empalme del ARNm. El análisis “*in silico*” sugería que éstos afectarían al procesamiento del pre-ARNm. Tras obtener el cDNA de 4 de estos portadores, y amplificar las regiones de interés con cebadores que hibridaban en los exones 7, 11 y 17 obtuvimos dos productos de amplificación para cada portador. Tras la secuenciación comprobamos que el fragmento de mayor tamaño correspondía al alelo normal y el de menor tamaño se generaba como consecuencia de la pérdida de exones durante el proceso de ajuste.

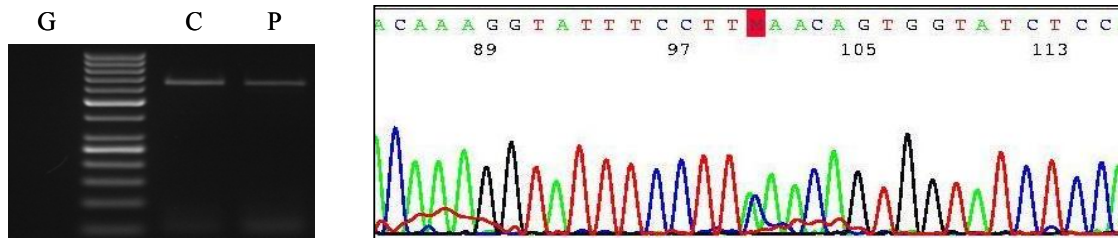


**Figura 10. Análisis de mutaciones que afectan al procesamiento del ARNm. A) Electroforesis del cDNA y secuencia genómica de la variante c.1414-1G>C. B) Electroforesis del cDNA y secuencia del cDNA para la variante c.1414-2A>C.**

### **Mutación con sentido**

La mutación c.1849T>G (p.\*617Glu) afecta al codón de parada de la traducción y se detectó en heterocigosis en 2 pacientes, aparentemente no relacionados. Hipotéticamente, el transcrito mutado daría lugar a una proteína con 46 aminoácidos más que la espastina normal. Para determinar si la presencia de esta alteración inducía la degradación de la copia de ARNm mutante, se obtuvo cDNA y se amplificó con cebadores localizados en el exón 11 y la región 3'UTR. La secuenciación del cDNA

amplificado mostró la presencia en heterocigosis, y equimolecular, de ambos alelos, sugiriendo que el alelo c.1849G no incrementa el “decay” del ARNm y probablemente se traduzca en una proteína de mayor tamaño (Figura 11).

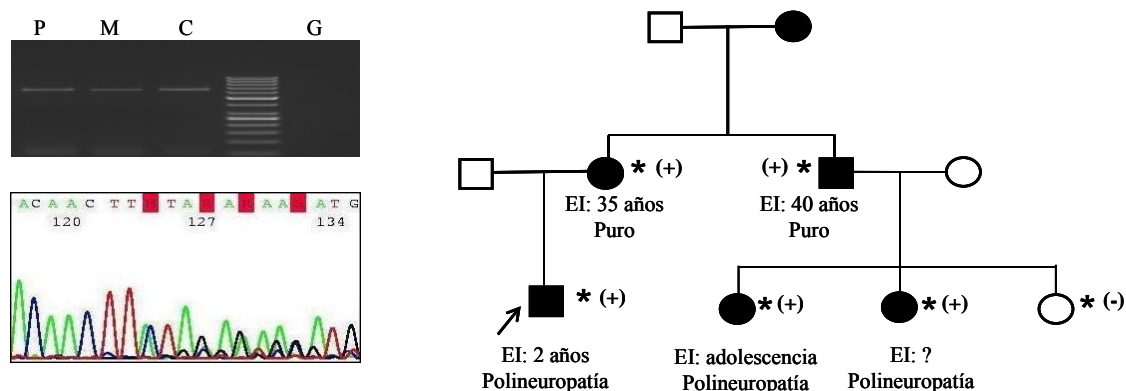


**Figura 11.** Estudio en cDNA de la mutación c.1849T>G (p.\*617Glu). Electroforesis mostrando el amplificado a partir del cDNA del portador (P) y un control sano no portador (C) y la ausencia de amplificado a partir de ADN genómico (G). Secuencia obtenida del amplificado del cDNA del portador.

### **Mutación c.583C>G**

La mutación c.583C>G, localizada fuera del dominio AAA, se había asociado previamente a PEH como una variante de cambio de aminoácido (p.Leu195Val). Sin embargo, su localización en el penúltimo codón del exón 3 y el resultado de los análisis bioinformáticos sugerían un papel patogénico para el alelo c.583G que, hipotéticamente, afectaría al proceso de corte y empalme de pre-ARNm. La amplificación del cDNA del probando, con cebadores situados en los exones 2 y 7, demostró que el transcrito obtenido a partir del alelo mutante carecía de los 4 últimos nucleótidos del exón 3 originando un cambio en la pauta de lectura y la inserción de un codón de parada prematuro (p.Leu195Argfs\*43). Probablemente, el cambio de nucleótido abolía el sitio de ajuste normal permitiendo el reconocimiento de un sitio crítico en el interior del exón. En nuestra cohorte, apareció en un probando de 19 años con inicio de los síntomas a los 2 años de edad, con un fenotipo complicado con neuropatía periférica y un patrón de herencia autosómico dominante. Se estudiaron otros individuos de esta familia y todos los afectados fueron portadores heterocigotos de la mutación c.583C>G. Tanto la edad de inicio como el fenotipo de los afectados resultaron bastante variables (Figura 12). La madre del paciente mostró un fenotipo puro sin neuropatía. Un tío materno, con inicio antes de los 40 años, también fue portador y tenía un fenotipo puro con neuropatía. Una hija de éste, también portadora, tenía una forma complicada con neuropatía periférica con inicio en la adolescencia. Otra hija (prima materna del

paciente) presentaba una forma subclínica sólo con hiperreflexia, Babinski indiferente y mínimos signos de neuropatía axonal.



**Figura 12.** Estudio de la mutación c.583C>G. Electroforesis de los amplificadores obtenidos a partir del cDNA del caso índice (P), su madre (M), un control no portador (C) y ADN genómico (G). Secuencia del cDNA del caso índice y árbol familiar.

### 4.3. Estudio del gen *ATL1*

El estudio molecular del gen *ATL1* se realizó en 224 casos negativos para el gen *SPAST* de los cuales 115 (51%) se seleccionaron por presentar un patrón de herencia AD y 109 (49%), por presentar una edad de inicio inferior a los 20 años independientemente de su historia familiar. De todos ellos, 55 (25%) presentaban un fenotipo complicado y 118 (53%) eran hombres. La edad media de inicio fue de 16 ( $\pm$  16) años, y la edad al diagnóstico media, de 35 ( $\pm$  21) años. La duración media de la enfermedad fue de 18 ( $\pm$  16) años.

En total encontramos 8 mutaciones, en heterocigosis, en 14 pacientes (6%), de las cuales 4 (50%) fueron nuevas. Todas fueron cambios de aminoácido y la mutación p.Arg239Cys fue recurrente, apareciendo en 6 probandos no emparentados (43%) (Tabla 9). El exón más frecuentemente mutado fue el 12, con 4 de las 8 mutaciones (50%) (Figura 13).

Un 93% de los portadores (13/14) presentaban un patrón de herencia AD y 1 paciente (7%) fue aparentemente esporádico. En cuanto a la frecuencia en función del patrón herencia observamos que el 11% de los casos AD (13/115) y el 1% de los casos aparentemente esporádicos (1/90) analizados resultaron portadores de mutación en el gen *ATL1*.

La nueva variante p.Gln154Glu resultó ser una mutación *de novo* y se detectó en un paciente con fenotipo puro e inicio de la PEH en la infancia. Su hijo, portador heterocigoto de la misma variante, mostraba alteración de la marcha desde los 2 años de edad (Figura 14).

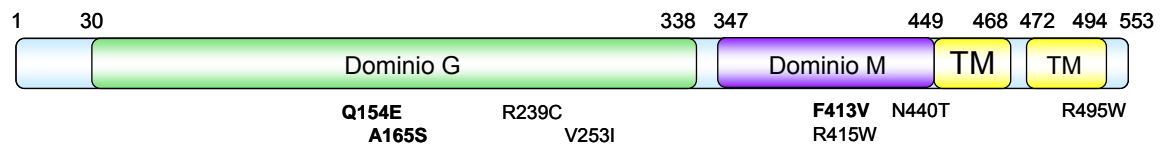
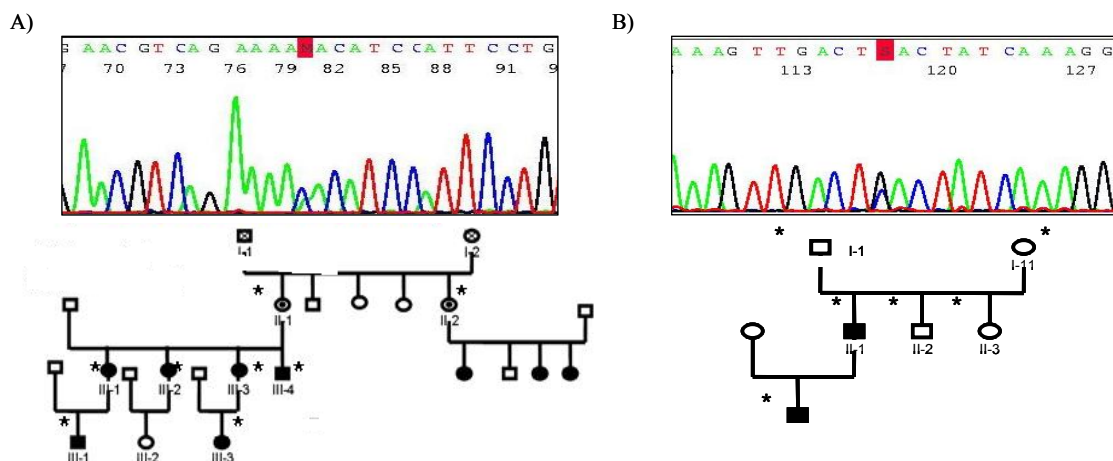
La mutación p.Phe413Val fue hallada en un paciente con inicio a los 6 años de edad y que desarrolló un fenotipo complicado con neuropatía. Esta alteración no estaba presente en los cromosomas control, afectaba a un aminoácido conservado en la escala evolutiva y el análisis bioinformático predijo un efecto dañino para la función de la proteína.

La tercera mutación no descrita p.Ala165Ser se detectó en una paciente de 32 años con 2 años de evolución de la enfermedad, fenotipo puro y un patrón de herencia dominante. No fue posible realizar el análisis de segregación familiar al no disponer de muestras de otros afectados.

Además, encontramos una familia portadora de una variante no descrita, p.His256Asp, para la que las predicciones bioinformáticas sugerían un efecto patogénico. El probando era una mujer de 45 años con inicio de la enfermedad hacia los 3 años de edad y un patrón de herencia autosómico dominante. Un hijo de la paciente, 3 hermanos y 2 sobrinos, todos ellos afectados de PEH, eran portadores de la variante p.His256Asp. También resultaron portadoras la madre de la paciente y una tía materna si bien eran asintomáticas a los 60 y 63 años, respectivamente. Aunque podría tratarse de una mutación con penetrancia incompleta, en ausencia de nuevos datos clínicos consideramos la alteración p.His256Asp como una variante de significado incierto

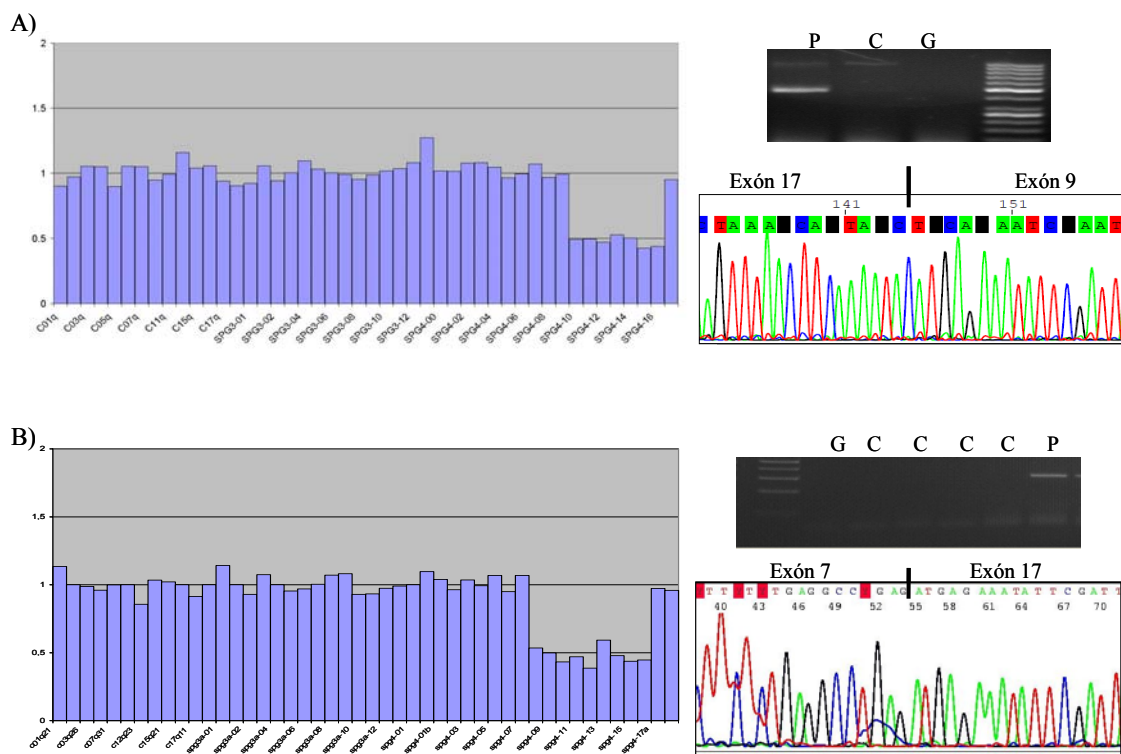
Tabla 9. Mutaciones halladas en el gen *ATLI/SPG3A*.

Caso	EI (años)	Herencia	Fenotipo	Exón	Nucleótido	Mutación	Referencia
57	1	AD	Puro	4	c.460C>G	p.Gln154Glu	<sup>86</sup>
406	32	AD	Puro	4	c.493G>T	p.Ala165Ser	Este estudio
97	8	AD	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
102	4	AD	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
220	3	AD	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
279	5	AD	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
439	8	AD	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
464	1	Esporádico	Puro	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	<sup>102</sup>
64	10	AD	Puro	8	c.757G>A	p.Val253Ile	<sup>32</sup>
232	6	AD	Complicado	12	c.1237T>G	p.Phe413Val	<sup>86</sup>
233	16	AD	Puro	12	c.1243C>T	p.Arg415Trp	<sup>86</sup>
110	17	AD	Puro	12	c.1319A>C	p.Asn440Thr	<sup>32</sup>
198	18	AD	Puro	12	c.1319A>C	p.Asn440Thr	<sup>32</sup>
159	5	AD	Puro	12	c.1483C>T	p.Arg495Trp	<sup>32</sup>

Figura 13. Localización de las mutaciones halladas en el gen *ATLI/SPG3A*. En negrita se indican las mutaciones descritas por primera vez en nuestra población.Figura 14. Secuencias y árboles familiares de los casos portadores de A) la variante de significado incierto c.766C>A, p.Hys256Asp; B) la mutación *de novo* c.460C>G;p.Gln154Glu.

#### 4.4. Estudio mediante MLPA de los genes *SPAST* y *ATL1*

En 104 pacientes que presentaban un patrón de herencia autosómico dominante y en los que no se detectó ninguna mutación puntual en los genes *SPAST* y *ATL1*, se realizó un estudio mediante MLPA para la detección de reordenamientos génicos. En 7 de ellos (7%) se identificó una delección en heterocigosis de exones completos del gen *SPAST* y, en todos aquellos casos en que fue posible, la existencia de ésta se confirmó a nivel de ARN mensajero (Figura 15). Detectamos 6 mutaciones diferentes, ya que la delección de los exones 10 a 16 del gen *SPAST* apareció en 2 familias no emparentadas. Las delecciones de los exones 6 y 7 y de los exones 8 a 16, respectivamente, no habían sido descritas en otros estudios. Las grandes delecciones se localizaron, fundamentalmente, en la región final del gen. Ningún paciente fue portador de reordenamientos génicos en el gen *ATL1*.



**Figura 15.** MLPA del gen *SPAST*, amplificación y secuenciación del cDNA en los pacientes portadores de las delecciones de los exones 10 a 16 (A) y 8 a 16 (B). G= ADN genómico, C= cDNA de caso control, P= cDNA del paciente.

#### **4.5. Polimorfismos en los genes *SPAST* y *ATL1***

En el gen *SPAST* encontramos un total de 10 polimorfismos de los cuales 6 habían sido previamente descritos (Tabla 10). Tres de las variantes no descritas codificaban para cambios silentes mientras que la cuarta, c.844T>A (p.Ser282Thr), afectaba a un aminoácido conservado evolutivamente, no apareció en la población control y los programas bioinformáticos predijeron que se trataba de un cambio “posiblemente dañino”. Sin embargo, este cambio se encontró en una paciente portadora de la mutación p.Ser261\*, también localizada en el exón 5. Para determinar si ambos cambios estaban en el mismo o en diferentes cromosomas, y en ausencia de familiares de primer grado de la paciente, aplicamos un protocolo de doble digestión con las endonucleasas MnlI y MboI y demostramos que se encontraban en “cis”. Este resultado, junto con el hecho de que es un cambio de aminoácido fuera del dominio AAA, sugeriría que el cambio p.Ser282Thr es un polimorfismo más que una variante patogénica.

Las variantes p.Ser44Leu y p.Pro45Leu, para las que se ha propuesto un efecto modulador del fenotipo, no aparecieron en ninguno de nuestros probandos.

En el gen *ATL1* encontramos 9 polimorfismos, de los cuales sólo uno fue nuevo. Solo dos de ellos se hallaban en la región codificante y eran silentes (Tabla 10).

Tabla 10. Polimorfismos identificados en los genes *SPAST/SPG4* y *ATLI/SPG3A*.

Gen	Cambio de nucleótido	Exón/Intrón	Referencia	Cambio de aminoácido
<b>Variantes de significado incierto</b>				
<i>ATLI</i>	c.766C>A <sup>1</sup>	Exón 8	Novel	p.His256Asp
<i>SPAST</i>	c.992A>T <sup>2</sup>	Exón 6	Novel	p.Ile328Leu
<b>Polimorfismos</b>				
<i>ATLI</i>	c.84A>G	Exón 2	rs35014209	p.Pro28Pro
<i>ATLI</i>	c.351A>G	Exón 3	rs17850684	p.Glu117Glu
<i>ATLI</i>	c.418-19G>T	Intrón 3	rs1060197	
<i>ATLI</i>	c.574-33_34del2	Intrón 5	rs35968976	
<i>ATLI</i>	c.630 +7G>A	Intrón 6	rs3759588	
<i>ATLI</i>	c.863-54A>G	Intrón 8	rs11157759	
<i>ATLI</i>	c.1048 -58G>A	Intrón 10	Novel	
<i>ATLI</i>	c.1552 -103G>T	Intrón 12	rs61985479	
<i>ATLI</i>	c.1552-111TTCTTins/del	Intrón 12	rs35540751	
<i>SPAST</i>	c.391C>T	Exón 1	Novel	p.Leu131Leu
<i>SPAST</i>	c.844T>A	Exón 5	Novel	p.Ser282Thr
<i>SPAST</i>	c.879G>A	Exón 6	<sup>184</sup>	p.Pro293Pro
<i>SPAST</i>	c.1374T>C	Exón 11	Novel	p.Ser458Ser
<i>SPAST</i>	c.1722C>T	Exón 15	Novel	p.Ala574Ala
<i>SPAST</i>	c.503+53T>C	Intrón 2	rs7561519	
<i>SPAST</i>	c.1332-37delG	Intrón 10	<sup>184</sup>	
<i>SPAST</i>	c.1413+42 TATAins/del	Intrón 11	rs10627985	
<i>SPAST</i>	c.1494-3delT	Intrón 12	<sup>190</sup>	
<i>SPAST</i>	c.*51A>G	3'UTR	rs6730121	

1. *ATLI* c.766C>A (p.His256Asp) se halló en un caso y en ningún control pero fue clasificado como variante de efecto patogénico incierto por estar presente en dos familiares asintomáticos.

2. *SPAST* c.992A>T (p.Ile328Leu) fue hallado en un caso y en ningún control pero, dado que las predicciones bioinformáticas indicaban que no alteraba la función proteica, fue clasificado como variante de efecto patogénico incierto.

#### 4.6. Correlación genotipo-fenotipo

De los 164 pacientes portadores de mutaciones en los genes *SPAST* y *ATLI*, 148 (90%) tenían un fenotipo puro y 16 (10%) mostraron un fenotipo complicado, siendo la complicación más frecuente la neuropatía periférica. No observamos diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de fenotipos al comparar entre si ambos grupos de portadores (91% de casos con fenotipo puro entre los portadores de mutación en *SPAST* vs. 90%, en *ATLI*) (Tabla 11).



La EI media de los portadores de mutaciones en el gen *SPAST* fue 33 años ( $\pm 17$ , rango de 0 a 66) siendo significativamente mayor que la observada en los casos no portadores de mutación en *SPAST* (EI media de no portadores =  $27 \pm 20$  años; p-valor = 0,009). Los portadores de mutaciones en *ATLI* presentaron una EI media de 9,5 años ( $\pm 9$ ), distribuida en un rango entre 1 y 32 años, que fue significativamente menor a la observada en los pacientes no portadores de mutación en *ATLI* (EI media de no portadores =  $29 \pm 20$  años; p-valor < 0,001). Del mismo modo, observamos también una diferencia significativa en la EI media entre los portadores *SPAST* y *ATLI* (p-valor < 0,001).

La duración media de la enfermedad en los portadores de mutaciones en el gen *SPAST* fue de 15 años ( $\pm 12$ ), oscilando entre 0 y 49 años, y no difirió de la observada en los no portadores ( $15 \pm 14$  años, p-valor = 0,663). La duración media de la enfermedad en los casos portadores de mutación en *ATLI* fue de 24 ( $\pm 21$ , rango 0-67) y resultó significativamente mayor que la observada tanto en los no portadores ( $14 \pm 13$  años, rango 0-57, p-valor = 0,016) como en los portadores de mutación en el gen *SPAST* (p-valor = 0,041).

La frecuencia de hombres afectados fue significativamente mayor entre los portadores *SPAST* que en los *ATLI* (ratio hombres:mujeres = 1,6 y 0,5; respectivamente, p-valor = 0,019).

**Tabla 11. Correlaciones observadas al comparar los casos portadores en *SPAST* y *ATLI*.**

	<b>Portadores <i>SPAST</i></b> <b>N = 137</b>	<b>Portadores <i>ATLI</i></b> <b>N = 27</b>	<b>p-valor</b>
Fenotipo puro	91%	90%	0,753
EI (media $\pm$ DT) años	$33 \pm 17$	$9,5 \pm 9$	<0,001
ED (media $\pm$ DT) años	$47 \pm 18$	$36 \pm 21$	0,019
Duración (media $\pm$ DT) años	$15 \pm 12$	$24 \pm 21$	0,041
% Hombres (ratio)	62% (1,6)	35% (0,5)	0,019

#### **4.7. Estudio del gen *SPG7***

Se estudiaron en total 285 casos índice de los cuales 251 (88%) eran casos aparentemente esporádicos o historia familiar desconocida, aunque no en todos los casos había sido posible la evaluación clínica de familiares de primer grado para descartar la existencia de otros afectados. Los 34 (12%) casos restantes presentaban antecedentes familiares compatibles con un patrón de herencia AR. Un total de 174 casos (61%) tenían un fenotipo puro, mientras que los 111 restantes (39%) desarrollaron

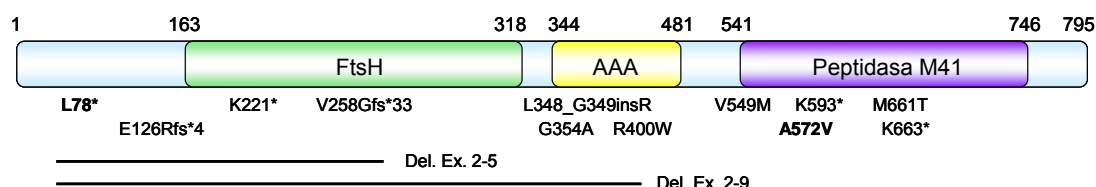
síntomas adicionales. Las complicaciones más frecuentes fueron la ataxia y la atrofia cerebelosa. Un total de 139 (49%) probandos eran hombres y la edad media de inicio de los síntomas fue de 28 años ( $\pm 21$ ). La edad media al diagnóstico fue de 41 años ( $\pm 20$ ), con un periodo de evolución medio de 13 años ( $\pm 12$ ).

#### 4.7.1. Mutaciones en el gen *SPG7*

Los exones 1-17 y regiones intrónicas flanqueantes del gen *SPG7* fueron estudiados en los 285 pacientes mediante secuenciación automática. En aquellos pacientes en que no se detectó ninguna mutación puntual y tenían un patrón de herencia AR ( $n = 30$ ) y en los portadores heterocigotos de una mutación puntual o de la variante p.Ala510Val ( $n = 18$ ) realizamos un estudio mediante MLPA para la detección de reordenamientos génicos en el gen *SPG7*. Identificamos un total de 14 portadores (5%) de mutaciones, 13 de ellos fueron heterocigotos para una mutación y 1 fue heterocigoto compuesto (ver tabla 12). Nueve de los 14 portadores eran aparentemente esporádicos (64%), 4 eran AR (29%) y uno resultó ser aparentemente AD (7%).

Identificamos 14 mutaciones, de las cuales 12 (86%) fueron nuevas. Cinco (36%) fueron mutaciones de cambio de aminoácido, 4 (29%) fueron mutaciones sin sentido, 2 (14%) grandes deleciones intragénicas, 1 (7%) alteraba la pauta de lectura, 1 (7%) provocaba la inserción de un aminoácido y 1 (7%) afectaba al procesamiento del pre-ARNm.

Los exones más frecuentemente mutados fueron el 8, el 13 y el 15, con 2 mutaciones cada uno. Sólo las mutaciones p.Leu78\* y p.Glu126Argfs\*4 se localizaron fuera de las regiones codificantes de dominios, aunque eliminaban dichos dominios por truncar la proteína (Figura 16). Las grandes deleciones comprendieron los exones 1 a 5 y 2 a 9, respectivamente; de modo que la primera de ellas truncaba parte del dominio FtSH\_extracelular y la segunda, el dominio FtSH\_extracelular completo y parte del dominio AAA.



**Figura 16. Localización de las mutaciones en la proteína paraplegina. En negrita se destacan las mutaciones previamente descritas.**

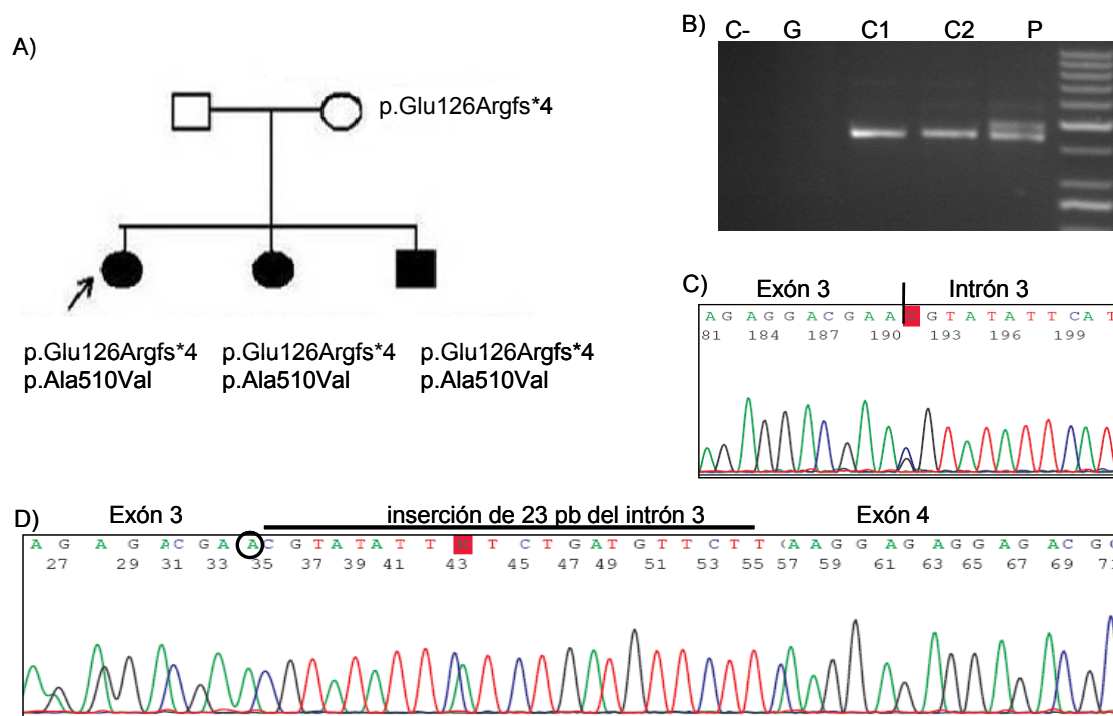
Tabla 12. Mutaciones halladas en el gen *SPG7*.

Caso	EI (años)	Fenotipo	Exón	Nucleótido	Mutación	Referencia
<b>Portadores heterocigotos compuestos (dos mutaciones en <i>SPG7</i>)</b>						
36	39	PEH-AR, Complicado	8 13	c.1061G>C c.1715C>T	p.Gly354Ala p.Ala572Val	192 47
<b>Portadores heterocigotos de una mutación en <i>SPG7</i></b>						
40	44	PEH-SP, Puro	15	c.1987A>T	p.Lys663*	192
48	32	PEH-SP, Complicado	5	c.661A>T	p.Lys221*	192
173	52	PEH-SP, Puro	9	c.1198C>T	p.Arg400Trp	192
244	29	PEH-SP, Complicado	8	c.1044_1047 insGCT	p.Leu348_Gly349insArg	192
260	39	PEH-SP, Complicado	12	c.1645G>A	p.Val549Met	192
296	20	PEH-AD, Puro	2	c.233T>A	p.Leu78*	26
312	40	PEH-SP, Puro	6	c.773_774de ITG	p.Val258Glyfs*33	192
370	18	PEH-AR, Puro	-	c.183-? 757+?del	Delección exones 2-5 (p.Ser62_Asn253delfs*35)	192
416	25	PEH-AR, Complicado	3	c.376G>C	p.Glu126Argfs*4	192
<b>Portadores heterocigotos compuestos de una mutación en <i>SPG7</i> y la variante p.Ala510Val</b>						
240	26	PEH-AR, Complicado	311 11	c.376G>C c.1529C>T	p.Glu126Argfs*4 p.Ala510Val	192 rs61755320
365	36	PEH-SP, Puro	15 11	c.1982T>C c.1529C>T	p.Met661Thr p.Ala510Val	192 rs61755320
402	-	PEH-SP, Complicado	- 11	c.183- ?_1325+?del c.1529C>T	Delección exones 2-9 (p.Ser62_Asp441delfs*24) p.Ala510Val	192 rs61755320
503	50	PEH-SP, Complicado	13 11	c.1777A>T c.1529C>T	p.K593* p.Ala510Val	192 rs61755320
<b>Portadores de la variante p.Ala510Val</b>						
53	47	PEH-SP, Puro	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320
184	1	PEH-SP, Complicado	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320
302	40	PEH-SP, Complicado	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320
331	44	PEH-SP, Puro	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320
411	50	PEH-SP, Complicado	11	c.1529C>T	homocigoto p.Ala510Val	rs61755320
419	7	PEH-SP, Puro	11	c.1529C>T	homocigoto p.Ala510Val	rs61755320
433	30	PEH-AR, Puro	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320
438	10	PEH-SP, Puro	11	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320

\*PEH: paraparesia espástica hereditaria. AD: autosómica dominante. AR: autosómica recesiva. SP: aparentemente esporádica o de herencia desconocida.

### Mutación c.376G>C

Hipotéticamente, la mutación c.376G>C implicaba el cambio de aminoácido p.Glu126Gln en una región situada fuera de los dominios funcionales. El cambio afectaba al último nucleótido del exón 3 y el análisis bioinformático (NNSplice0.9 y Human Splicing Finder v.2.4) predijo un efecto sobre el proceso de corte y empalme del pre-ARNm, ya que implicaría la pérdida del sitio aceptor situado entre el exón 3 y el intrón. El estudio sobre cDNA puso de manifiesto que esta alteración daba lugar a una inserción de 30 pb del intrón en el mensajero, excluyéndose un fenómeno de “decay”, ya que ambos alelos se detectaban con igual intensidad. La inserción originaba una alteración de la pauta de lectura y la introducción de un codón de parada prematuro (p.Glu126Argfs\*4) (Figura 17).

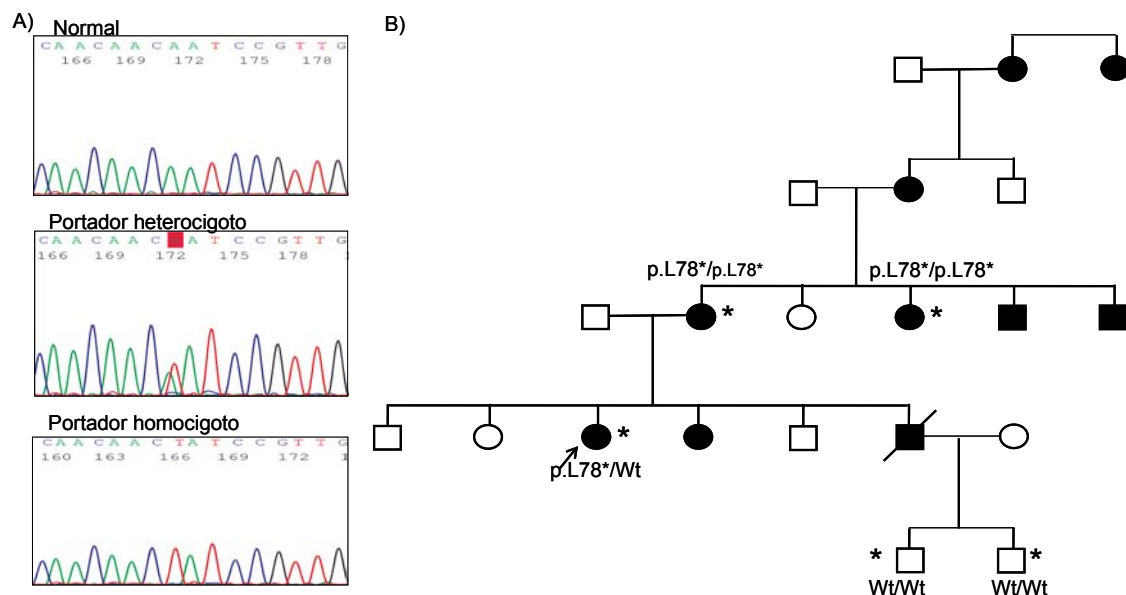


**Figura 17.** Estudio de la mutación c.376G>C. A) Árbol familiar mostrando el genotipo de los individuos analizados (la flecha indica el caso índice). B) Electroforesis con los amplificadores obtenidos a partir de ADN genómico (G), dos cDNA no portadores (C1 y C2) y el cDNA caso índice (P). C) y D) Secuencias obtenidas a partir del ADN genómico y del cDNA del caso índice, respectivamente.

### Mutación p.Leu78\*

En una paciente de origen gitano con fenotipo puro y edad de inicio hacia los 20 años, detectamos en heterocigosis, en el exón 2, la mutación c.233T>A (p.Leu78\*). La

probando fue inicialmente clasificada como aparentemente esporádica. Sin embargo, una revisión más detallada de su árbol familiar reveló que tanto su madre como su tía, de 32 y 48 años, respectivamente, también estaban afectadas de PEH. Ambas tenían un fenotipo puro y eran homocigotas para la mutación p.Leu78\* (Figura 18). Al existir una herencia compatible con un patrón dominante, se descartó en el probando la presencia de mutaciones (mediante secuenciación y MLPA) en los genes *SPAST/SPG4*, *ATL1/SPG3A*, *REEP1/SPG31* y *NIPA1/SPG6*. Además, se descartó que tanto ella como sus familiares afectadas fuesen portadoras de un gran reordenamiento en el gen *SPG7*. La presencia en heterocigosis de la mutación p.Leu78\* podría ser la causa de la enfermedad en el caso índice, pero los antecedentes familiares sugieren una penetrancia incompleta para esta mutación. Sería necesario analizar más individuos de la familia para confirmar esta hipótesis.



**Figura 18. Estudio de la mutación p.Leu78\*.** A) Secuencias obtenidas a partir de un control sano (normal), la probando (portadora heterocigota) y de su madre (portadora homocigota). B) Árbol familiar. La madre y la tía del probando (flecha), ambas afectadas, eran homocigotas para la mutación. Los tres pacientes resultaron negativos para mutaciones en los genes *SPAST/SPG4*, *ATL1/SPG3A*, *REEP1/SPG31* y *NIPA1/SPG6*. \* Individuos disponibles para el análisis genético.

#### 4.7.2. Estudio mediante MLPA del gen *SPG7*

Dos de los 48 pacientes analizados (4%) fueron portadores heterocigotos de deleciones de exones completos (Tabla 12). Sólo en uno de ellos fue posible comprobar a nivel de cDNA el efecto sobre el ARNm (Figura 19).

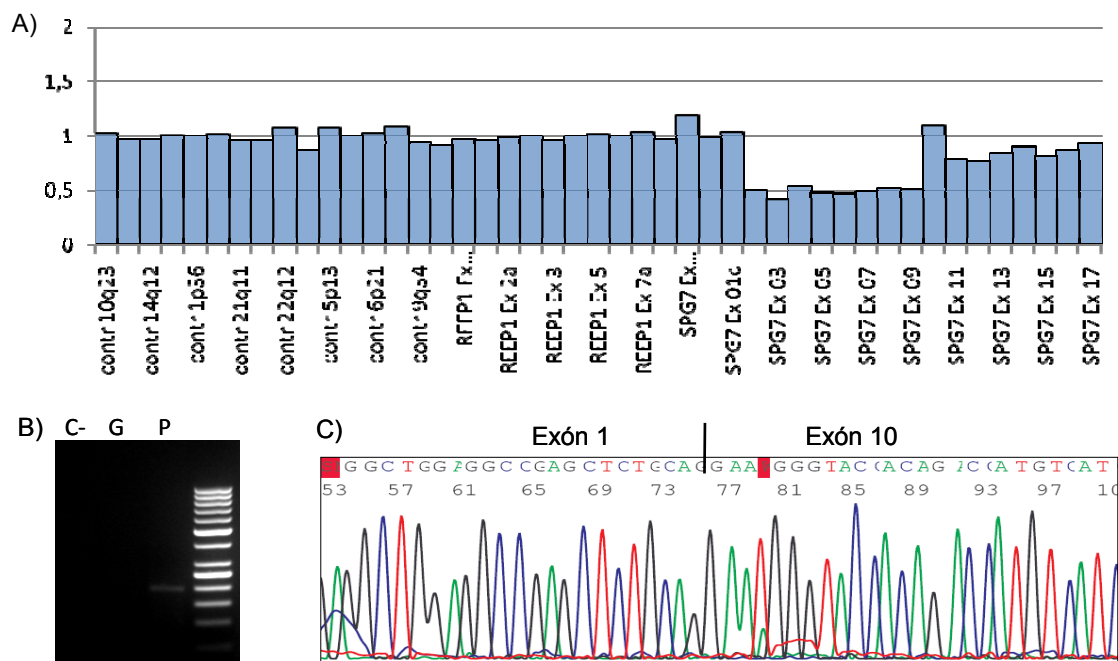


Figura 19. Estudio de la delección de los exones 2 a 9 del gen *SPG7*. A) MLPA mostrando la delección en heterocigosis. B) Electroforesis de los fragmentos amplificados a partir de una muestra de ADN genómico (G) y de una muestra de cDNA del caso índice portador de la delección (P). C) Secuencia del fragmento amplificado a partir del cDNA del portador mostrando la unión de los exones 1 y 10.

#### 4.7.3. Variante p.Ala510Val

Doce pacientes (4%) fueron portadores de la variante p.Ala510Val (10 portadores heterocigotos y 2 homocigotos) mientras que sólo 3 controles (<1%) presentaron este cambio. De hecho, observamos diferencias significativas tanto en las frecuencias genotípicas (p-valor = 0,003) como en las frecuencias alélicas (p-valor < 0,001). La frecuencia en los controles fue similar a la descrita en la base de 1000 genomas y en el proyecto NHLB1 de secuenciación exómica.

Los portadores de la variante p.Ala510Val fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con mutaciones en *SPG7* (4/14 = 29%) que en el grupo de pacientes sin mutación (8/271 = 3%; p-valor = 0,001). En los 4 pacientes con mutación en *SPG7*, el análisis de la segregación familiar mostró que la variante p.510Val y la mutación se encontraban en diferentes cromosomas. El análisis mediante programas de predicción bioinformática sugiere que la presencia del cambio p.510Val afectaría a la estructura y función de la proteína (SHIFT score = 0; PolyPhen PSIC store = 2.16).

Estos hallazgos sugieren que la variante p.510Val contribuiría a la patogénesis de la PEH, actuando como variante deletérea en presencia de otra mutación y como factor de riesgo genético para PEH en nuestra población (Figura 17).

#### **4.7.4. Polimorfismos y variantes de efecto incierto**

En el gen *SPG7*, encontramos un total de 27 polimorfismos, 21 de los cuales ya habían sido descritos con anterioridad mientras que 6 fueron nuevos (Tabla 13).

Cuatro de los polimorfismos se localizaron en la región 3'UTR y 2 de ellos eran nuevos. La variante c.\*432G>A se localizaría en la diana de unión del microARN hsa-miR-513-5p y la variante c.\*496 G>C, en la del hsa-miR-661; por lo que ambas podrían afectar a la estabilidad del ARNm (<http://www.mirbase.org/>). El cambio c.\*432G>A es un polimorfismo raro que aparece con un frecuencia cercana al 1% tanto en pacientes como en controles.

El cambio c.\*496 G>C se encontró en heterocigosis en 1 paciente sin antecedentes familiares y no apareció en ninguno de los controles. No fue posible determinar el efecto a nivel de ARN del alelo c.\*496C por lo que la variante fue clasificada como de efecto incierto.

Un paciente fue portador heterocigoto de la variante p.Arg13Gln (c.38G>A), localizada en el exón 1 del gen. Ninguno de los controles fue portador, si bien el análisis bioinformático sugería un efecto no patogénico del alelo p.13Gln.

Tabla 13. Polimorfismos hallados en el gen *SPG7*.

Localización	Variante genómica	Cambio proteico	Referencia
Exón 1	c.4G>A	p.Ala2Ser	<sup>192</sup>
	c.38G>A	p.Arg13Gln	<sup>192</sup>
	c.120G>A	p.Gly40Gly	<sup>47</sup>
Intrón 2	c.286+46C>T	-	rs3922633
Intrón 4	c.618+12T>C	-	rs3803679
	c.619-47G>A	-	rs3935626
Intrón 6	c.862-34G>T	-	rs4785690
Intrón 7	c.988+5A>G	-	rs4785691
	c.988+19G>A	-	rs62071462
Exón 8	c.1032C>T	p.Gly344Gly	<sup>193</sup>
Intrón 10	c.1449+19G>A	-	<sup>47</sup>
	c.1450-29G>A	-	rs462464
Exón 11	c.1457G>A	p.Arg486Gln	<sup>192</sup>
	c.1507A>G	p.Thr503Ala	rs2292954
	c.1529C>T	p.Ala510Val	rs61755320 <sup>1</sup>
Intrón 12	c.1663+13C>T	-	<sup>115</sup>
Intrón 13	c.1779+47G>C	-	rs3794632
Exón 14	c.1933T>A	p.Ser645Thr	rs2099104
Intrón 14	c.1780-54A>G	-	rs730264
	c.1780-16G>C	-	<sup>192</sup>
Exón 15	c.2063G>A	p.Arg688Gln	rs12960
Intrón 17	c.2280G>A	p.Pro760Pro	rs11559075
	c.2292C>T	p.Ile764Ile	rs61747711
3'UTR	c.*33C>T	-	rs60711430
	c.*432G>A	-	<sup>192</sup>
	c.*490insCACA	-	rs67678429
	c.*496G>C	-	<sup>192</sup>

1. El polimorfismo p.Ala510Val presentó una frecuencia significativamente mayor en los pacientes con respecto a los controles (p-valor del test de Chi-cuadrado = 0,035).

#### 4.7.5. Correlación genotipo-fenotipo

De los 14 portadores, 6 (43%) presentaban un fenotipo puro frente a 8 con fenotipo complicado (57%). Así, la frecuencia de casos complicados fue mayor entre los pacientes portadores de mutación en *SPG7* que entre los no portadores aunque no se alcanzaron diferencias significativas (103/271, 38%, p-valor = 0,152). Sin embargo, la frecuencia del fenotipo complicado fue significativamente mayor entre los casos



portadores de mutación en *SPG7* que entre los portadores *SPAST* (9%) y los portadores *ATLI* (10%, p-valor < 0,001 en ambos casos).

Teniendo en cuenta el total de casos analizados, un 3,4% (6/174) de los casos puros y un 7,2% (8/111) de los complicados resultaron portadores de mutación en el gen *SPG7*. El fenotipo de los 8 casos complicados no fue homogéneo aunque la atrofia cerebelosa fue el signo más común, presente en 3 de los pacientes. El resto presentaron atrofia óptica, deterioro cognitivo y disartria, ptosis y nistagmo, adelgazamiento del cuerpo calloso, y ptosis y oftalmoplejía, respectivamente (Tabla 14).

La media de los portadores de mutación en el gen *SPG7* fue de 36 años ( $\pm 11$ ), distribuida en un rango entre 18 y 52 años, similar a la observada en el resto de la población analizada ( $28 \pm 21$  años, p-valor = 0,114) y a la de los portadores de mutación en *SPAST* ( $33 \pm 17$  años, p-valor = 0,282). A su vez fue significativamente menor a la observada en los portadores *ATLI* ( $9,5 \pm 9$  años, p-valor < 0,001).

Respecto a la ED, la media fue de 49 años ( $\pm 11$ ), con un rango de entre 32 y 73. No se hallaron diferencias significativas respecto al resto de casos analizados (p-valor = 0,160).

La duración media de la enfermedad fue de 12 años ( $\pm 7$ ), comprendida en un rango de entre 3 y 27 años. No se hallaron diferencias significativas respecto al resto de casos analizados para el gen ni respecto a los portadores de mutación en *SPAST* ( $15 \pm 12$  años, p-valor = 0,762). Aunque la duración fue menor que en los casos *ATLI* positivos no alcanzaron diferencias significativas ( $24 \pm 21$  años, p-valor = 0,056).

El ratio entre hombres y mujeres en el grupo de portadores *SPG7* fue de 1,3 ya que 8 eran hombres (57%) y 6, mujeres (43%). Esta proporción no fue significativamente diferente de la observada en el total de casos estudiados para *SPG7*, que presentaba un ratio de 0,9 con un 49% de hombres y un 51% de mujeres (p-valor = 0,520). Tampoco se hallaron diferencias significativas respecto a los portadores *SPAST* (p-valor = 0,469) y *ATLI* (p-valor = 0,161).

Tabla 14. Características clínicas de los portadores de mutación en *SPG7*.

<b>Paciente</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>173</b>	<b>240</b>	<b>244</b>	<b>260</b>
<b>Edad/sexo</b>	55/M	56/M	37/H	55/H	53/M	44/H	47/H
<b>Edad de inicio</b>	39	44	32	52	26	29	39
<b>Síntoma de inicio</b>	Marcha inestable	Marcha inestable	Marcha inestable	Rigidez MMII	Marcha inestable	Rigidez MMII	Rigidez MMII
<b>Capacidad para caminar</b>	Silla de ruedas	Camina con ayuda	Camina con ayuda	Silla de ruedas	Camina con ayuda	Camina con ayuda	Camina con ayuda
<b>Miembros superiores</b>							
<b>Espasticidad</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Debilidad</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Hiperreflexia</b>	No	No	No	No	No	Si	Si
<b>Miembros inferiores</b>							
<b>Espasticidad</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Debilidad</b>	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
<b>Hiperreflexia</b>	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si
<b>Babinski</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Pes cavus</b>	No	Si	Si	No	Si	No	No
<b>Sensibilidad disminuida</b>	No	No	No	Si	No	No	Si
<b>Disartria cerebelar</b>	No	No	No	No	Si	No	Si
<b>Disfagia</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>Nistagmo</b>	Si	No	No	No	Si	Si	No
<b>Vejiga neurogénica</b>	Si	No	Si	No	Si	Si	No
<b>Dismetría/Marcha atáxica</b>	Si	No	No	No	Si	No	No
<b>Ptosis / Oftalmoplejía</b>	Si	No	No	No	No	No	No
<b>Atrofia óptica</b>	Si	No	Si	No	No	No	No
<b>Deterioro cognitivo</b>	Si	No	No	No	No	No	Funciones ejecutivas
<b>MRI Cerebral</b>	Atrofia cerebelar	Normal	Normal	Normal	Atrofia cerebelar	Atrofia cerebelar	Normal
<b>EMG/NCS</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

(Continuación tabla 14)

<b>Paciente</b>	<b>296</b>	<b>312</b>	<b>365</b>	<b>370</b>	<b>402</b>	<b>416</b>	<b>503</b>
<b>Edad/sexo</b>	40/M	53/M	40/H	32/M	73/H	37/H	60/H
<b>Edad de inicio</b>	20	40	36	18	48	25	50
<b>Síntoma de inicio</b>	Rigidez MMII	Marcha inestable	Marcha inestable	Marcha inestable	Marcha inestable	Rigidez MMII	Rigidez MMII
<b>Capacidad para caminar</b>	Camina con ayuda	Camina con ayuda	Camina con ayuda	Normal	Normal	Camina con ayuda	Camina con ayuda
<b>Miembros superiores</b>							
<b>Espasticidad</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Debilidad</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Hiperreflexia</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Miembros inferiores</b>							
<b>Espasticidad</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Debilidad</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Hiperreflexia</b>	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<b>Babinski</b>	Ambiguo	Si	Si	Si	Si	Si	Ambiguo
<b>Pes cavus</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Sensibilidad disminuida</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>Disartria cerebelar</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Disfagia</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Nistagmo</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>Vejiga neurogénica</b>	Si	No	No	No	No	Si	No
<b>Diametric/Marcha atáxica</b>	No	No	No	No	No	No	Si
<b>Ptoxis / Oftalmoplejía</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>Atrofia óptica</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>Deterioro cognitivo</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>MRI Cerebral</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	TCC	Normal
<b>EMG/NCS</b>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal*

\* M: mujer. H: hombre. MMII: miembros inferiores. MRI = imagen de resonancia magnética. EMG = electromiografía. NCS = estudios de conducción nerviosa. TCC = Atrofia del cuerpo calloso (del inglés *thin corpus callosum*).

#### 4.8. Algoritmo de diagnóstico

En base a los resultados obtenidos construimos un algoritmo de diagnóstico genético de la PEH. El flujo de trabajo definido en éste permitirá identificar paciente con PEH de forma más rápida y eficaz (Figura 20).

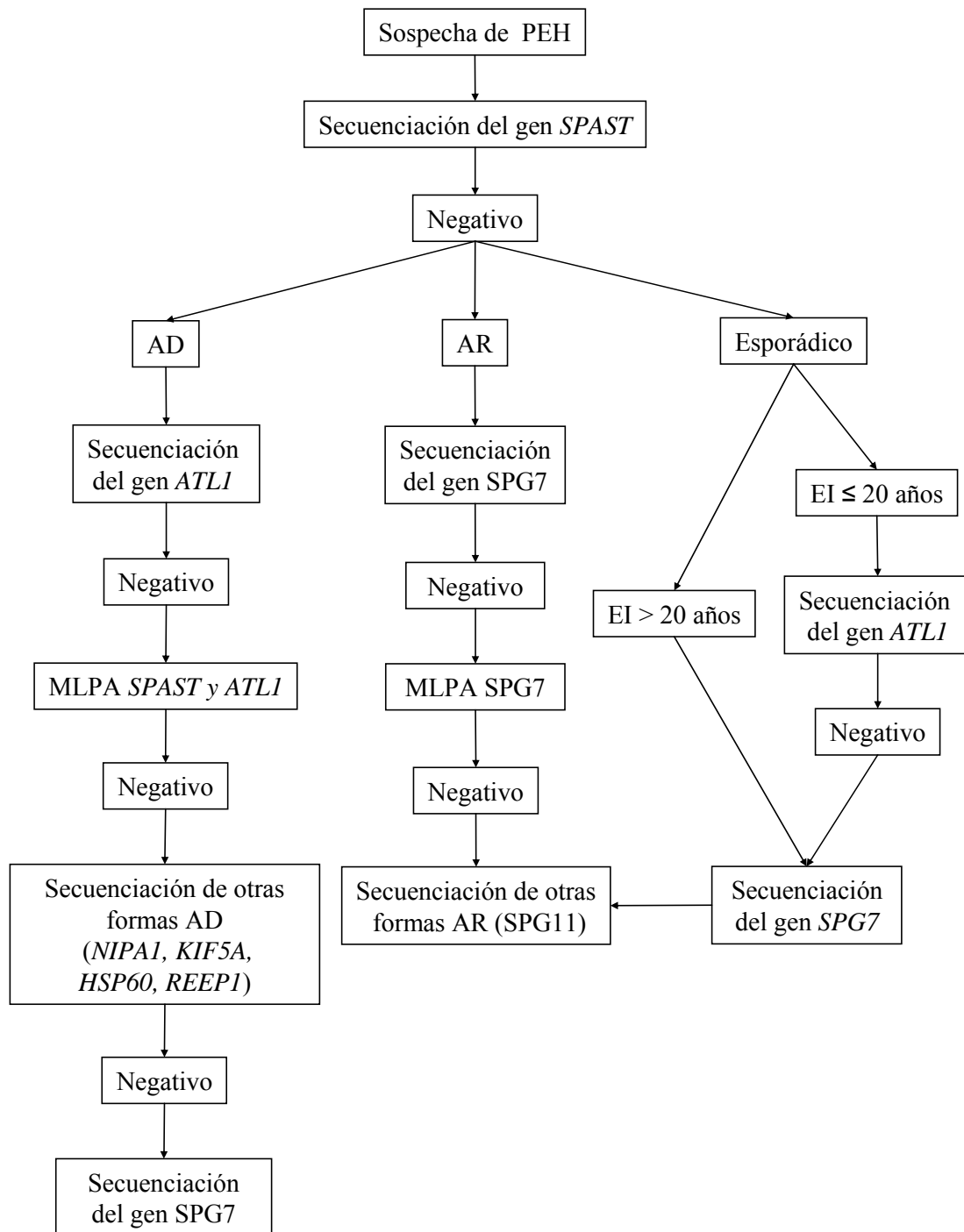


Figura 20. Algoritmo para el diagnóstico genético de la PEH en población española.

#### 4.9. Estudio de los haplogrupos mitocondriales

El estudio de haplogrupos mitocondriales se realizó en 424 probandos, de los cuales 170 (40%) tenían un patrón de herencia AD, 43 (10%) un patrón de herencia AR y 211 (50%) casos esporádicos o con una historia familiar dudosa o desconocida. Un total de 82 pacientes (19%) presentaban un fenotipo complicado, siendo los síntomas adicionales más comunes neuropatía periférica, atrofia cerebral o cerebelar, retraso mental, nistagmo y disartria. La EI osciló entre los 1-72 años, con una media de 27 años ( $\pm 20$ ) (Tabla 15). Del total de los pacientes, 23% (97/424) presentaban mutación en alguno de los genes previamente estudiados (69 portadores *SPAST*, 14 en *ATLI* y 14 en *SPG7*).

En el total de casos índice analizados el haplogrupo H fue el más común (46%). En los pacientes portadores de mutación no hallamos diferencias significativas en cuanto a la EI media o a la frecuencia de casos con fenotipo complicado en función del haplogrupo. Por otro lado, ninguno de los haplogrupos se asoció significativamente al desarrollo del fenotipo complicado (Tabla 16).

Tampoco observamos diferencias significativas en la EI media en función de los distintos haplogrupos al comparar los casos portadores de mutación en alguno de los genes frente a los casos sin mutación conocida.

En el grupo de 327 pacientes sin mutación conocida, hallamos en total 19 combinaciones de alelos o haplogrupos. Las frecuencias de los haplogrupos comunes no difirieron significativamente de las halladas en los controles. La única excepción fue el haplogrupo “raro” definido por los alelos 1719G-4580G-7028T-8251G-9055G-10398A-12308A-13368G-13708G-16391G cuya frecuencia en el grupo de los pacientes (8%) fue significativamente mayor que en los controles (2%) ( $p = 0,001$ ; OR = 3.77) (Tabla 17).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes sin mutación y controles al comparar las frecuencias alélicas de los 10 SNPs que definen los haplogrupos. Sin embargo, la frecuencia de casos complicados fue significativamente menor entre los pacientes portadores del alelo m.10398G y esta asociación se mantuvo incluso tras realizar un análisis multivariante corrigiéndolo por covariables como la edad, el sexo y la historia familiar ( $p$ -valor = 0,04) (Tabla 18).

Tabla 15. Características poblaciones de la muestra de pacientes estudiados para los haplogrupos mitocondriales.

Población	Hombres (%)	EI media	Rango de EI	Historia familiar (%)	Fenotipo puro (%)
<b>Total</b>	(N=424) 220 (52)	27	1 a 72	206 (50)	341 (80)
<b>SPAST</b>	(N=69) 43 (62)	32	1 a 66	55 (80)	62 (90)
<b>ATLI</b>	(N=14) 5 (36)	9	1 a 32	11 (79)	11 (79)
<b>SPG7</b>	(N=14) 8 (57)	36	20 a 52	4 (29)	9 (64)
<b>Sin mutación</b>	(N=327) 164 (50)	28	1 a 72	136 (42)	259 (79)

Tabla 16. Edad de inicio, frecuencias de fenotipos e historia familiar en función del haplogrupo en la población de pacientes.

Haplogrupo	Portadores de mutación en <i>ATLI</i> , <i>SPAST</i> o <i>SPG7</i>			Casos sin mutación conocida			
	EI media, años	Puro (N=82)	Complicado (N=15)	EI media, años	Puro (N=259)	Complicado (N=68)	Historia familiar (N=135)
<b>H</b>	31 (1-66)	41 (79)	11 (21)	26 (1-72)	110 (76)	35 (24)	58 (40)
<b>J</b>	18 (1-34)	3 (60)	2 (40)	26 (2-54)	24 (92)	2 (8)	7 (27)
<b>K</b>	18 (1-43)	2 (67)	1 (33)	26 (2-57)	13 (81)	3 (19)	10 (63)
<b>T</b>	19 (2-54)	5 (83)	1 (17)	27 (1-63)	25 (80)	6 (20)	12 (39)
<b>U</b>	32 (16-39)	10	0	24 (1-65)	17 (65)	9 (35)	11 (42)
<b>V</b>	27 (5-53)	5	0	26 (2-65)	10 (83)	2 (17)	4 (33)
<b>W</b>	31 (18-45)	3	0	28 (2-50)	8	0	5 (63)
<b>X</b>	33 (14-54)	3	0	20 (1-60)	6 (86)	1 (14)	1 (14)
<b>I</b>	35	1	0	0	0	0	0
<b>Otros</b>	23 (1-66)	9	0	38 (1-67)	46 (82)	10 (18)	27 (48)

Tabla 17. Haplogrupos definidos por los 10 polimorfismos seleccionados y frecuencias de cada haplogrupo en los pacientes sin mutación conocida y en los controles.

Haplo-grupo	Polimorfismo mitocondrial										Pacientes N = 327 (%)	Controles N = 300 (%)
	1719 G>A	4580 G>A	7028 C>T	8251 G>A	9055 G>A	10398 A>G	12308 A>G	13368 G>A	13708 G>A	16391 G>A		
<b>H</b>	G	G	C	G	G	A	A	G	G	G	145 (45)	138 (46)
<b>I</b>	A	G	T	A	G	G	A	G	G	A	0	3 (1)
<b>J</b>	G	G	T	G	G	G	A	G	A	G	26 (8)	33 (11)
<b>K</b>	G	G	T	G	A	G	G	G	G	G	16 (5)	24 (8)
<b>T</b>	G	G	T	G	G	A	A	A	G	G	31 (9)	27 (9)
<b>U</b>	G	G	T	G	G	A	G	G	G	G	26 (8)	30 (10)
<b>V</b>	G	A	T	G	G	A	A	G	G	G	12 (4)	15 (5)
<b>W</b>	G	G	T	A	G	A	A	G	G	G	8 (2)	9 (3)
<b>X</b>	A	G	T	G	G	A	A	G	G	G	7 (2)	3 (1)
<b>Otro 1</b>	G	G	T	G	A	A	G	G	G	G	1 (<1)	1 (<1)
<b>Otro 2</b>	G	G	T	G	A	G	G	G	G	A	4 (1)	1 (<1)
<b>Otro 3</b>	G	G	T	G	G	A	A	G	G	G	4 (1)	3 (1)
<b>Otro 4</b>	G	G	T	G	G	A	A	G	G	A	4 (1)	0
<b>Otro 5<sup>1</sup></b>	G	G	T	G	G	A	A	G	G	G	27 (8)	7 (2)
<b>Otro 6</b>	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	1 (<1)	0
<b>Otro 7</b>	G	G	T	G	G	G	G	A	A	A	1 (<1)	0
<b>Otro 8</b>	G	G	T	G	G	G	A	A	G	G	4 (1)	2 (<1)
<b>Otro 9</b>	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	7 (2)	2 (<1)
<b>Otro 10</b>	G	G	C	G	G	A	A	G	G	G	3 (1)	2 (<1)

<sup>1</sup> La frecuencia del haplogrupo “otro 5” en el grupo de los pacientes (8%) fue significativamente mayor que en los controles (2%) (p = 0,001; OR = 3.77).

**Tabla 18. Frecuencia de alelo menor (FAM) en controles y pacientes sin mutación conocida. También se indica la frecuencia de casos complicados y la edad de inicio media en función del alelo.**

<b>Polimorfismo</b>	<b>FAM en controles (N=300)</b>	<b>FAM en pacientes sin mutación (N = 327)</b>	<b>Frecuencia casos complicados (alelo raro/común)</b>	<b>EI media, años (alelo raro versus común)</b>
G1719A	6 (0,02)	7 (0,02)	0,14/0,21	20 vs. 28
G4580A	15 (0,05)	12 (0,04)	0,17/0,22	26 vs. 28
C7028T	140 (0,47)	148 (0,45)	0,24/0,18	27 vs. 29
G8251A	12 (0,04)	5 (0,02)	0/0,21	34 vs. 27
G9055A	27 (0,09)	21 (0,06)	0,19/0,21	27 vs. 28
A10398G	66 (0,22)	55 (0,17)	0,11/0,23 <sup>1</sup>	29 vs. 27
A12308G	57 (0,19)	52 (0,16)	0,27/0,20	27 vs. 28
G13368A	29 (0,10)	35 (0,11)	0,17/0,21	31 vs. 27
G13708A	33 (0,11)	31 (0,09)	0,10/0,22	29 vs. 27
G16391A	4 (0,01)	9 (0,03)	0,11/0,21	27 vs. 28

<sup>1</sup> A10398G: complicado frente a puro, FAM: p-valor = 0.048, OR = 0.41 (0.17–1.01)





## *DISCUSIÓN*



## 5. Discusión

La Paraparesia Espástica Hereditaria (PEH) comprende una serie de desórdenes neurodegenerativos relacionados entre sí clínica y patológicamente. La PEH es muy heterogénea en la clínica y la etiología y parte de esta variabilidad fenotípica podría deberse a las diversas causas genéticas subyacentes ya que, en la actualidad, se han descrito casi 50 *loci* asociados al desarrollo de PEH con patrones de herencia AD, AR y ligada al sexo. Sin embargo, el hallazgo de pacientes portadores de la misma mutación, pero con diferente fenotipo y de casos casi idénticos en la clínica, aunque con diferentes causas genéticas, sugiere la existencia de otros factores moduladores del fenotipo, que podrían ser tanto genéticos como ambientales<sup>85</sup>.

Nuestro estudio es el primero que describe la base genética de la PEH en una gran cohorte de pacientes españoles (n = 511) procedentes de diferentes áreas geográficas. En el 57% de los casos no existían familiares afectados o se desconocían los antecedentes familiares. Dentro de las formas con antecedentes familiares, observamos que el 78% presentaban un patrón de herencia AD y el 22% era PEH-AR; frecuencias similares a las encontradas en otras poblaciones caucásicas<sup>7,13,120,124,194-196</sup>. En consonancia con lo descrito previamente, existía una gran variabilidad en la forma de presentación clínica y aproximadamente, un 24% de los pacientes desarrollaron síntomas adicionales<sup>95,120,196</sup>.

La proporción de casos puros fue significativamente mayor entre los casos de herencia AD (90%) que en el resto de casos (69%)<sup>48,191</sup>. Además, los casos de PEH-AR con fenotipo puro, inicialmente considerados “raros” o “poco frecuentes”, equivalen en nuestra población al 72% frente al 50-60% en los estudios más recientes<sup>13,23,48,197-198</sup>. Estos porcentajes son similares a los ya publicados.

La edad de inicio de los síntomas (EI) varió entre el primer año de vida y la octava década, con dos picos de mayor frecuencia de inicio a edades inferiores a los 10 años (30% de los casos) y entre los 30 y los 40 años (15%), respectivamente. Algunos autores atribuyen este fenómeno a la existencia de mecanismos patogénicos que afecten bien al desarrollo neuronal provocando un inicio precoz, bien al mantenimiento de los axones con manifestación ya en la edad adulta. Sin embargo, esta teoría no explicaría la enorme variabilidad intrafamiliar descrita, lo que hace pensar en la existencia de otros factores moduladores genéticos o ambientales<sup>191</sup>. La prevalencia se mantiene

relativamente estable entre los 10 años y la sexta década (8-10% de casos por decenio), tras lo cual comienza a decaer probablemente a causa de la mayor tasa de mortalidad o de errores en el diagnóstico. Sin embargo, en nuestra población un 30% de los casos presentaron síntomas antes de los 10 años, un valor superior al de otros estudios que la sitúan cercana al 7%<sup>195</sup>. Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias étnicas y a los criterios de inclusión.

La EI de los casos complicados fue significativamente menor a la de los casos puros (22 vs 30 años)<sup>23,191,197</sup>. De hecho, sólo un 25% de los casos puros presentaba síntomas antes de los 10 años de edad ascendiendo hasta el 37% entre los complicados. Dado que la PEH-AR se ha asociado tradicionalmente a un fenotipo complicado y este a su vez a una menor EI, cabía esperar que hubiese algún tipo de correlación entre el patrón de herencia y la EI<sup>195</sup>. En nuestro caso no encontramos ninguna asociación pero podría deberse al pequeño número de familias recesivas con fenotipo complicado.

Considerando sólo los casos con patrón de herencia AD, la frecuencia conjunta de mutación en los genes *SPAST* y *ATL1* asciende al 39% (67/170), situándose en el rango descrito en otras poblaciones<sup>212</sup>. La frecuencia en casos esporádicos o de historia familiar desconocida fue del 5% (16/292)<sup>98</sup>. Esto hecho, junto con la relativa frecuencia de ocurrencia de las mutaciones *de novo* en los genes *SPAST* y *ATL1*, sugiere que los casos esporádicos serían candidatos al estudio genético después de la exclusión de otras causas principales de espasticidad<sup>96,213</sup>

### **5.1. Estudio del gen *SPAST***

La frecuencia total de portadores de mutación en el gen *SPAST* fue del 14% (70/511), un porcentaje cercano al 18-20% descrito en otros estudios con cohortes similares. Por otro lado, el porcentaje de portadores fue del 33% (56/170) entre los casos con PEH-AD, entrando en el 30-50% tradicionalmente atribuido a este gen para los casos dominantes<sup>120,124,199</sup>.

Un rasgo frecuente del gen *SPAST* es la privacidad de sus mutaciones y nuestra población no es una excepción ya que más de la mitad de las mutaciones halladas en este estudio son nuevas<sup>92,95,195</sup>. Sólo 7 aparecieron en más de 1 familia y 3 de ellas nunca habían sido descritas (p.Glu398fs\*8, p.Ile580Thr y p.\*617Glu). En el caso de la mutación p.\*617Glu, que es un tipo de mutación bastante infrecuente, cabe mencionar que aunque los pacientes no referían relación de parentesco procedían de la misma área

geográfica. Las otras 4 mutaciones recurrentes (p.Phe404del, p.Pro489Leu, p.Arg562\* y la delección de los exones 10 a 16) ya han sido descritas en otras poblaciones lo cual sugiere que se trataría de puntos calientes mutacionales<sup>93,186,189,190</sup>. De los 6 reordenamientos que detectamos en nuestra cohorte de pacientes, 4 ya habían sido descritos. Su recurrencia podría ser debida a la presencia de numerosas microhomologías tipo Alu en el gen *SPAST*, que facilitan los procesos de recombinación homóloga<sup>180,190-191,201</sup>.

En las primeras series publicadas, la proporción de grandes reordenamientos intragénicos en el gen *SPAST* era de un 20-25%, mientras que en nuestra cohorte es sólo un 7%. Este valor es similar al obtenido por estudios más recientes que sitúan la frecuencia de reordenamientos por debajo del 15%<sup>35,199,202</sup>. Sin embargo, no podemos descartar que en nuestro estudio se esté subestimando la frecuencia de delecciones ya que sólo hemos analizado por MLPA los casos con claro patrón de herencia AD. Shoukier y colaboradores describieron en 2009 seis casos esporádicos portadores de delección en el gen *SPAST*, lo que en su población equivalía al 4% de los pacientes<sup>98</sup>. Nuestra población comprende un 57% de casos esporádicos de los que el 4% resultaron portadores de mutaciones puntuales en este gen. Sería necesario realizar estudios adicionales para definir la implicación de grandes delecciones e inserciones en la etiología de la PEH esporádica.

Las mutaciones más frecuentes fueron las de cambio de sentido (41%), con una frecuencia ligeramente superior a la descrita en otras poblaciones (20-30%) mientras que las mutaciones de *splicing* fueron mucho menos frecuentes que en otros estudios (11% vs. 50%, respectivamente). La gran variabilidad existente entre las diferentes cohortes podrían ser consecuencia de los criterios de inclusión en la muestra<sup>35,98</sup>.

Coincidiendo con resultados previos, el 96% de las mutaciones puntuales afectan a alguno de los dominios funcionales, en especial al dominio AAA que contiene un 74% del éstas<sup>98,120,191</sup>. Estos datos apoyarían la hipótesis de que la actividad del dominio AAA es mucho más sensible a los cambios en su secuencia, quizá porque contiene un centro activo con numerosos residuos críticos. Teóricamente, veintiuna de las 63 mutaciones detectadas introducen un codón de parada prematuro por lo que probablemente generan un mensajero inestable que se degrada antes de traducirse. Así, estas mutaciones disminuirían los niveles de espastina total en la célula provocando haploinsuficiencia. El efecto dominante de estas mutaciones podría deberse a que los

niveles de espastina activa son críticos para que pueda realizar su función adecuadamente<sup>35,44,98</sup>. Las 42 mutaciones restantes podrían llegar a traducirse dando lugar a una espastina inactiva, como es el caso de las mutaciones de cambio de sentido o las deleciones e inserciones que no alteran la pauta de lectura. En aquellos casos en que la espastina aberrante fuese capaz de oligomerizar podría ejercer un efecto negativo dominante por la formación de hexámeros no funcionales<sup>204-205</sup>.

La mutación c.583C>G, que había sido previamente descrita como un cambio de sentido fuera del dominio AAA, es, en realidad, una mutación del sitio de ajuste y empalme con introducción de un codón de parada prematuro (p.Leu195Argfs\*43)<sup>95</sup>.

Dos pacientes fueron portadores heterocigotos de la mutación con sentido c.1849T>G; p.\*617Glu que originaba un transcrito estable que podría traducirse en una espastina aberrante con 46 aminoácidos más en el extremo carboxilo terminal. Esta es la primera descripción de este tipo de mutación en pacientes con PEH, pero se han descrito en otras enfermedades hereditarias como la Demencia Familiar Británica<sup>203</sup>.

Dos mutaciones puntuales se situaron en el extremo carboxi-terminal, una región aparentemente no funcional, por lo que su mecanismo patogénico es menos evidente. Sin embargo, esta región es crucial en la formación del poro del hexámero, donde se produce el corte efectivo de los microtúbulos. La teoría más plausible es que, aunque no inactivan los dominios funcionales, alteran el plegamiento de la espastina modificando la disposición de sus centros activos o su capacidad de interacción con otras proteínas<sup>98,206</sup>.

Los polimorfismos detectados en el gen *SPAST* son poco frecuentes y en su mayoría silentes, lo que subraya la gran conservación evolutiva e importancia funcional de la espastina<sup>93</sup>. En nuestra población no hallamos los polimorfismos p.Ser44Leu y p.Pro45Leu, que teóricamente actúan como modificadores del fenotipo. Su frecuencia no supera el 0,6% en otras poblaciones<sup>38,95-96</sup>.

## 5.2. Estudio del gen *ATL1*

La frecuencia de portadores *ATL1* en nuestra población ascendió al 6% (14/224), dentro del rango descrito en otros estudios (1,25-39%). Sin embargo, puede que estemos subestimando la frecuencia en nuestra población, ya que no incluimos los casos esporádicos o de herencia dudosa con inicio posterior a los 20 años de edad. Entre los casos con herencia dominante hallamos un 11% de portadores (13/115)<sup>120,124,207</sup>.

El gen *ATL1* se encuentra altamente conservado. Encontramos 9 polimorfismos, de los cuales sólo dos se encontraban en region codificante y ambos eran silentes.

La mutación p.Arg239Cys fue recurrente lo cual confirmaría que este codón es, también en nuestra población, un punto caliente mutacional quizás por tratarse de un dinucleótido CpG metilado<sup>209-210</sup>.

Varios autores han observado que las mutaciones en la atlastina-1 disminuyen la actividad GTPasa en distintos grados, independientemente de su localización en el dominio G (GTPasa) o fuera del mismo. Por ello, se cree que su mecanismo patogénico se basa en la introducción de cambios conformacionales en la atlastina-1 que alteran indirectamente la actividad GTPasa, aumentan la susceptibilidad a la degradación o impiden la oligomerización o la interacción con otras proteínas<sup>76,103,107</sup>. El efecto negativo dominante de estas mutaciones parece explicarse por la coexistencia de formas mutadas y nativas<sup>207</sup>. Este mecanismo recuerda al de otros desórdenes neurológicos con herencia AD como Atrofia Óptica de tipo 1, neuropatía intermedia de tipo 2A o Charcot-Marie-Tooth debidos a mutaciones en OPA1, dinamina 2 o Mfn2<sup>76</sup>.

El caso índice de una de las familias con patrón de herencia dominante resultó ser portador de la mutación *de novo* p.Gln154Glu, que posteriormente heredó su hijo desarrollando el mismo fenotipo puro y de inicio infantil que se había determinado en el examen del probando. La presencia de mutaciones *de novo* es un evento relativamente frecuente en el gen *ATL1*<sup>100,211</sup>.

### **5.3. Estudio del gen SPG7**

El gen *SPG7* se estudió en 285 casos, la mayor cohorte de pacientes estudiada hasta el momento. Las frecuencias de portadores de mutación en la población analizada (5%), entre los pacientes PEH-AR (12%) y entre los casos aparentemente esporádicos (4%) fueron similares a las descritas en otras poblaciones. Además, sólo uno de los pacientes fue heterocigoto compuesto, un rasgo característico de este gen<sup>26,47,116,215</sup>. A pesar de que se han descrito pocas deleciones en el gen *SPG7*, la frecuencia observada en nuestro estudio (2/14, 14%) sugiere que el análisis de pacientes con PEH para el gen *SPG7* debería incluir tanto el análisis por secuenciación como por MLPA a fin de mejorar el diagnóstico y el consejo genético.

Según estudios previos, el análisis del gen *SPG7* está indicado en aquellos pacientes con sospecha de PEH-AR en los que la enfermedad se manifiesta en la edad adulta y con



fenotipo complicado<sup>26,116</sup>. Nuestros datos no apoyan esta hipótesis pues, aunque la edad de inicio fue de 35 años, la mayor parte de los portadores eran aparentemente esporádicos (64%) y tan sólo 8 (57%) desarrollaron síntomas adicionales. Por otra parte, tras excluir mediante MLPA la presencia de reordenamientos en los portadores de mutaciones puntuales, comprobamos que 13 de los 14 portadores presentaban una sola mutación. Estudios previos también han descrito un elevado número de portadores de una única mutación, si bien en muchos de ellos no se descartaba la existencia de reordenamientos génicos<sup>26,115-116</sup>. Una excepción es el trabajo de Schlipf y cols. (2011) en el que analizaron 187 casos índice aparentemente esporádicos o con PEH-AR<sup>215</sup>. Hallaron 7 pacientes (4%) portadores de dos mutaciones incluyendo tres portadores de inserciones o deleciones. También identificaron 7 portadores de una mutación en heterocigosis y dos portadores heterocigotos compuestos de sendas variantes de efecto patogénico incierto.

Una de nuestras familias con patrón de herencia autosómico dominante fue portadora de la mutación p.Leu78\*. Esta mutación, en heterocigosis, fue la única detectada en una paciente cuya madre y tía fueron homocigotas. Las tres pacientes estaban afectadas y presentaban una PEH pura con similar edad de inicio. Esta mutación ya había sido detectada en dos familias italianas aparentemente no relacionadas en las que los portadores heterocigotos resultaron asintomáticos<sup>26</sup>. Este hallazgo sugiere que algunas mutaciones en *SPG7* podrían asociarse a penetrancia incompleta con desarrollo de síntomas en algunos pacientes portadores de una sola mutación. En esta familia, se descartó la existencia de una segunda mutación en el gen *SPG7*, ya sean reordenamientos o cambios puntuales en la región codificante, las secuencias intrónicas flanqueantes o la región 3'UTR. Sin embargo, no podemos excluir que el portador heterocigoto de p.Leu78\* tenga una segunda mutación en las regiones no analizadas (como el promotor o secuencias intrónicas profundas). Este paciente también podría ser portador de una mutación en un segundo gen asociado a PEH y no analizado en este estudio, que actuase de modo sinérgico con la mutación en *SPG7*.

De todos modos, ya se ha sugerido la existencia de un patrón de herencia dominante con penetrancia incompleta asociado a *SPG7*, una posibilidad apoyada recientemente por el hallazgo de alteraciones de la materia blanca del cuerpo calloso en casos asintomáticos portadores heterocigotos de mutación en este gen<sup>116,215-216</sup>.

Alrededor del 60% de las mutaciones halladas parecen generar un mensajero inestable que probablemente sea degradado provocando haploinsuficiencia<sup>116,215</sup>. El resto de mutaciones dan lugar a cambios de aminoácido en los dominios funcionales AAA o Peptidasa\_M41. En este caso podrían traducirse en una paraplegina inactiva con efecto dominante negativo por la formación de complejos m-AAA no funcionales<sup>26,114</sup>.

Al contrario que los genes *SPAST* y *ATL1*, el gen *SPG7* es muy polimórfico. Entre las variantes detectadas se encuentra el cambio p.Ala510Val, inicialmente considerado un polimorfismo raro. Sin embargo, se encuentra en una región altamente conservada y su análisis *in silico* indica un efecto dañino en la estructura de la proteína. De hecho, ensayos de complementación en levaduras demostraron que perturba la función proteolítica de la proteasa hetero-oligomérica m-AAA, de la que forma parte la paraplegina<sup>26,47,117</sup>. De acuerdo con su papel patogénico putativo, el alelo p.510Val fue significativamente más frecuente en nuestra cohorte de pacientes en comparación con los controles y entre los pacientes portadores de mutación respecto a los no portadores. Además, al igual que en otras poblaciones, cuatro de los pacientes portadores de mutaciones causales en *SPG7* eran portadores del alelo de riesgo y observamos que segregaban de modo independiente<sup>114,215</sup>. Como ya han sugerido otros autores, estos datos indican que la variante p.Ala510Val podría contribuir a la patogénesis de la PEH, actuando como variante deletérea en presencia de otra mutación, y constituyendo un factor de riesgo genético para el desarrollo de PEH<sup>26,116-117</sup>. Ya que su frecuencia es del 1% en controles sanos, estudios poblacionales para determinar el riesgo de PEH a diferentes edades podrían ser de utilidad para clarificar el papel patogénico de esta variante.

#### **5.4. Correlación genotipo-fenotipo**

En el grupo de portadores *SPG7* predominaron los casos aparentemente esporádicos y aquellos con PEH sugerente de herencia recesiva, en concordancia con estudios previos<sup>114,116,215</sup>. Sin embargo, destaca el hallazgo de la familia portadora de la mutación p.Leu78\* en *SPG7* y con patrón de herencia dominante. Esto junto con el hecho de que muchos pacientes son portadores heterocigotos de una única mutación sugiere que el estudio del gen *SPG7* estaría indicado en familias con patrón AD, a pesar de la asociación inicial de este locus a las formas recesivas<sup>26,115-116</sup>.

La frecuencia de casos complicados entre los portadores *SPG7* fue menor a la descrita en otras poblaciones (57% vs. 70%) pero, como cabía esperar, fue significativamente mayor que la observada entre los portadores *SPAST* y *ATLI* (9% y 10%, respectivamente)<sup>47,116,215</sup>.

Al igual que en otras poblaciones, los portadores de mutación en *ATLI* presentaron, por lo general, un inicio infantil con una EI media de 9,5 años ( $\pm 9$ ), significativamente menor que las observadas en los portadores *SPAST* y *SPG7* ( $33 \pm 17$  años y  $36 \pm 11$  años, respectivamente)<sup>100</sup>. Aunque la EI media no difirió significativamente entre estos últimos, cabe señalar la ausencia de casos con inicio infantil entre los portadores *SPG7* frente al 17% de casos observados entre los portadores *SPAST*<sup>26,116,200</sup>.

Las diferencias y similitudes en la EI se vieron reflejadas en la mayor duración de la enfermedad en los casos *ATLI*, que presentaban una duración media de 24 años frente a los 15 y 12 de los casos *SPAST* y *SPG7*, respectivamente.

La proporción de hombres afectados fue mayor de la esperada entre los portadores *SPAST* (62%), un fenómeno que podría estar relacionado con el efecto neuroprotector de los estrógenos<sup>34-35,217</sup>. Por el contrario, esta frecuencia fue menor de la esperada entre los portadores *ATLI* (35%), aunque este resultado podría ser un artefacto debido al pequeño tamaño de este grupo.

Los resultados obtenidos nos han permitido diseñar un protocolo o algoritmo de diagnóstico genético a fin de hacer más eficiente el estudio de los pacientes en los que se establece una sospecha diagnóstica de PEH (Figura 20). El estudio del gen *SPAST* debe realizarse en todos los pacientes con sospecha clínica de PEH por su elevada frecuencia de mutación, la existencia de mutaciones con penetrancia incompleta y el hallazgo mutaciones en pacientes con formas aparentemente esporádicas o de herencia dudosa. En pacientes *SPAST* negativo, con edad de inicio precoz antes de los 20 años e independientemente de su modo de herencia, se realizaría el estudio de *ATLI*. En ambos casos, se analizaría primero la presencia de mutaciones puntuales y en caso de que no se encontrara ninguna se procedería al estudio mediante MLPA. En caso de no detectarse ninguna mutación en estos genes y si el patrón de herencia es AD se debe descartar la presencia de mutaciones en otros genes AD como *NIPAI* y *REEPI* y también en *SPG7*. El estudio del gen *SPG7* se realizaría tanto en los casos con patrón de herencia recesiva como en los casos esporádicos o de herencia familiar desconocida que hubiesen resultado negativos durante el estudio de los genes *SPAST* y *ATLI*.

Este protocolo podría resultar una herramienta diagnóstica eficaz que facilitaría el estudio genético molecular en los pacientes con sospecha de PEH, promoviendo un uso más racional de los recursos disponibles al evitar la realización de pruebas superfluas.

### **5.5. Estudio de los haplogrupos mitocondriales**

A fin de determinar la posible contribución de la variación mitocondrial al riesgo de padecer PEH, comparamos las frecuencias observadas en los casos sin mutación conocida frente a la de la población general. No observamos diferencias en la distribución de los haplogrupos comunes ni de los polimorfismos que los definen entre ambos grupos. Sin embargo, uno de los haplogrupos “raros”, definido por los alelos 1719G-4580G-7028T-8251G-9055G-10398A-12308A-13368G-13708G-16391G, fue significativamente más frecuente entre los pacientes (8% vs. 2%;  $p = 0.001$ ; OR = 3.77), por lo que podría estar contribuyendo al riesgo de desarrollar PEH en nuestra población. Con todo, sería necesario secuenciar todo el genoma mitocondrial en los pacientes portadores de este haplogrupo a fin de determinar si éste está ligado a alguna otra variante que explicase esta aparente asociación con la enfermedad.

Por otro lado, analizamos la posible contribución mitocondrial a la variabilidad fenotípica, comparando las proporciones de fenotipos y las edades de inicio en función del alelo de cada polimorfismo o del haplogrupo. De este modo, detectamos que el alelo m.10398G fue más frecuente entre los casos complicados que en los puros. Este alelo forma parte de los que definen el haplogrupo J, que también presentó una frecuencia mayor en los casos complicados. En estudios previos se ha sugerido que este alelo tiene un efecto protector frente a la enfermedad de Parkinson aunque también, se ha asociado a una menor edad de inicio en un grupo de pacientes con ataxia espinocerebelosa de tipo 2<sup>172,218-219</sup>. El polimorfismo m.10398A>G provoca un cambio conservativo de treonina por alanina en el codón 155 del gen de NADH deshidrogenasa 3 (ND3). Parece que este cambio afecta al pH de la matriz mitocondrial y modifica la dinámica de calcio intracelular, ya que en las células cuyas mitocondrias portan el alelo m.10398A se ha observado una mayor liberación de calcio al citosol en respuesta a la histamina<sup>220</sup>. Las diferencias en la función mitocondrial podrían ser las causantes de la relación entre este polimorfismo y el fenotipo de los pacientes con PEH. Aunque esta hipótesis es posible, sería necesario disponer de una serie de 126 casos complicados y 477 casos puros para alcanzar una potencia estadística del 80% con un valor de significación de 0,05.

Por otra parte, entendemos que nuestro estudio presenta una limitación básica debida a que la frecuencia de los diferentes haplogrupos varía considerablemente entre regiones, y nuestra muestra incluye pacientes procedentes de diferentes áreas geográficas del territorio español, mientras que los controles son exclusivamente asturianos.

## ***CONCLUSIONES***



## 6. Conclusiones

1. La cohorte de pacientes españoles estudiada muestra una estructura genética y unas características clínicas similares a las de otras poblaciones caucásicas. Sin embargo, en nuestra serie hemos encontrado un porcentaje de casos juveniles y de casos con herencia recesiva y fenotipo puro mayores que en otras poblaciones.
2. El gen *SPAST* es el más frecuentemente mutado en la población española y presenta una mayor penetrancia de las mutaciones entre los hombres.
3. Las mutaciones en el gen *ATLI*, halladas en el 6% de los casos analizados y en el 10% de las familias con patrón de herencia dominante, se asocian a una edad de inicio juvenil. La mutación p.Arg239Cys también es un punto caliente mutacional en nuestra población al hallarse en un 43% de los portadores.
4. El análisis de los genes *SPAST* y *SPG7* mediante la técnica de MLPA es imprescindible en casos con claros antecedentes familiares, dada la frecuencia relativamente alta de grandes reordenamientos hallados.
5. Nuestros resultados apoyan la existencia de un patrón de herencia dominante con penetrancia incompleta asociado a *SPG7* así como el efecto deletéreo del alelo p.510Val en presencia de otras mutaciones y su papel como factor de riesgo para el desarrollo de PEH. La asociación entre las mutaciones en el gen *SPG7* y el desarrollo de fenotipo complicado parece menor a la descrita en otras poblaciones.
6. Un 9% de los pacientes esporádicos o de historia familiar desconocida son portadores de mutaciones en uno de los 3 genes analizados, por lo que sería recomendable abordar el estudio molecular de estos aún en ausencia de antecedentes familiares.
7. Los haplogrupos mitocondriales europeos más comunes no contribuirían a la patogenia de la PEH en la población española. Sin embargo, tanto el haplogrupo J como el polimorfismo mitocondrial que lo define (m.A10398G) parecen contribuir al desarrollo de síntomas adicionales.





## ***BIBLIOGRAFÍA***



## Bibliografía

- 1 Harding. *Hereditary spastic paraplegias*. Semin Neurol 13, 333-6, (1993).
- 2 Fink & Hedera. *Hereditary spastic paraplegia: genetic heterogeneity and genotype-phenotype correlation*. Semin Neurol 19, 301-9, (1999).
- 3 Polo, Calleja, Combarros y cols. *Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study*. Brain 114 ( Pt 2), 855-66, (1991).
- 4 Filla, De Michele, Marconi y cols. *Prevalence of hereditary ataxias and spastic paraplegias in Molise, a region of Italy*. J Neurol 239, 351-3, (1992).
- 5 Leone, Bottacchi, D'Alessandro y cols. *Hereditary ataxias and paraplegias in Valle d'Aosta, Italy: a study of prevalence and disability*. Acta Neurol Scand 91, 183-7, (1995).
- 6 Silva, Coutinho, Pinheiro y cols. *Hereditary ataxias and spastic paraplegias: methodological aspects of a prevalence study in Portugal*. J Clin Epidemiol 50, 1377-84, (1997).
- 7 McMonagle, Webb & Hutchinson. *The prevalence of "pure" autosomal dominant hereditary spastic paraparesis in the island of Ireland*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72, 43-6, (2002).
- 8 Boukhris, Stevanin, Feki y cols. *Tunisian hereditary spastic paraplegias: clinical variability supported by genetic heterogeneity*. Clin Genet 75, 527-36, (2009).
- 9 Berciano. *Guía clínica y de pacientes de Paraparesia Espástica Hereditaria*. (2006).
- 10 McDermott, Burness, Kirby y cols. *Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation*. Neurology 67, 45-51, (2006).
- 11 Schwarz & Liu. *Hereditary (familial) spastic paraplegia; further clinical and pathologic observations*. AMA Arch Neurol Psychiatry 75, 144-62, (1956).
- 12 Behan & Maia. *Strumpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 37, 8-20, (1974).
- 13 Harding. *Classification of the hereditary ataxias and paraplegias*. Lancet 1, 1151-5, (1983).
- 14 Harding. *Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 44, 871-83, (1981).
- 15 Dalpozzo, Rossetto, Boaretto y cols. *Infancy onset hereditary spastic paraplegia associated with a novel atlastin mutation*. Neurology 61, 580-1, (2003).
- 16 Chinnery, Keers, Holden y cols. *Infantile hereditary spastic paraparesis due to codominant mutations in the spastin gene*. Neurology 63, 710-2, (2004).
- 17 Fink. *Hereditary spastic paraplegia*. Curr Neurol Neurosci Rep 6, 65-76, (2006).
- 18 Fink. *Sporadically occurring neurologic disease: HSP genes and apparently sporadic spastic paraplegia*. Neurology 71, 1468-9, (2008).
- 19 Dürr, Brice, Serdaru y cols. *The phenotype of "pure" autosomal dominant spastic paraplegia*. Neurology 44, 1274-7, (1994).
- 20 Berciano. *Ataxias y paraplegias hereditarias: revisión clinicogenética*. Neurología 17, 40-51, (2002).
- 21 Hughes, Byrne, Webb y cols. *SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q*. Neurology 56, 1230-3, (2001).
- 22 Patel, Hart, Warner y cols. *The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype*. Am J Hum Genet 69, 209-15, (2001).
- 23 Coutinho, Barros, Zemmouri y cols. *Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families*. Arch Neurol 56, 943-9, (1999).
- 24 Goizet, Boukhris, Mundwiller y cols. *Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10*. Hum Mutat 30, E376-85, (2009).
- 25 Salameh, Shenoy & David. *Novel SPG3A and SPG4 mutations in two patients with Silver syndrome*. J Clin Neuromuscul Dis 11, 57-9, (2009).
- 26 Arnoldi, Tonelli, Crippa y cols. *A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia*. Hum Mutat 29, 522-31, (2008).

- 27 Aleem, Abu-Shahba, Swistun y cols. *Expanding the clinical spectrum of SPG11 gene mutations in recessive hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum*. Eur J Med Genet, (2011).
- 28 Cailloux, Gauthier-Barichard, Mimault y cols. *Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations*. *Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease*. Eur J Hum Genet 8, 837-45, (2000).
- 29 Schrandner-Stumpel, Fryns, Cassiman y cols. *MASA syndrome (a form of complicated spastic paraplegia) and X linked hydrocephalus: variable expression of the same mutation at Xq28? Call for families*. J Med Genet 29, 215, (1992).
- 30 Fransen, Van Camp, Vits y cols. *L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite*. Hum Mol Genet 6, 1625-32, (1997).
- 31 Macedo-Souza, Kok, Santos y cols. *Reevaluation of a large family defines a new locus for X-linked recessive pure spastic paraplegia (SPG34) on chromosome Xq25*. Neurogenetics 9, 225-6, (2008).
- 32 Dürr, Camuzat, Colin y cols. *Atlastin1 mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia*. Arch Neurol 61, 1867-72, (2004).
- 33 D'Amico, Tessa, Sabino y cols. *Incomplete penetrance in an SPG3A-linked family with a new mutation in the atlastin gene*. Neurology 62, 2138-9, (2004).
- 34 Mitne-Neto, Kok, Beetz y cols. *A multi-exonic SPG4 duplication underlies sex-dependent penetrance of hereditary spastic paraplegia in a large Brazilian pedigree*. Eur J Hum Genet 15, 1276-9, (2007).
- 35 Proukakis, Moore, Labrum y cols. *Detection of novel mutations and review of published data suggests that hereditary spastic paraplegia caused by spastin (SPAST) mutations is found more often in males*. J Neurol Sci 306, 62-5, (2011).
- 36 Chang & Wu. *Motor neuron diseases and neurotoxic substances: a possible link?* Chem Biol Interact 180, 127-30, (2009).
- 37 Verny, Guegen, Desquiret y cols. *Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation*. Mitochondrion 11, 70-5, (2011).
- 38 Svenson, Kloos, Gaskell y cols. *Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations*. Neurogenetics 5, 157-64, (2004).
- 39 Mancuso & Rugarli. *A cryptic promoter in the first exon of the SPG4 gene directs the synthesis of the 60-kDa spastin isoform*. BMC Biol 6, 31, (2008).
- 40 Solowska, Garbern & Baas. *Evaluation of loss of function as an explanation for SPG4-based hereditary spastic paraplegia*. Hum Mol Genet 19, 2767-79, (2010).
- 41 Hewamadduma, Kirby, Kershaw y cols. *HSP60 is a rare cause of hereditary spastic paraparesis, but may act as a genetic modifier*. Neurology 70, 1717-8, (2008).
- 42 Nielsen, Koefoed, Abell y cols. *CAG repeat expansion in autosomal dominant pure spastic paraplegia linked to chromosome 2p21-p24*. Hum Mol Genet 6, 1811-6, (1997).
- 43 Benson, Horwitz, Wolff y cols. *CAG repeat expansion in autosomal dominant familial spastic paraparesis: novel expansion in a subset of patients*. Hum Mol Genet 7, 1779-86, (1998).
- 44 Bürger, Fonknechten, Hoeltzenbein y cols. *Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene*. Eur J Hum Genet 8, 771-6, (2000).
- 45 Zander, Yuan, Lindblad y cols. *No evidence for long CAG/CTG repeats in families with spastic paraplegia linked to chromosome 2p21-24*. Neurosci Lett 279, 41-4, (2000).
- 46 McDermott, Taylor, Hayes y cols. *Investigation of mitochondrial function in hereditary spastic paraparesis*. Neuroreport 14, 485-8, (2003).
- 47 Wilkinson, Crosby, Turner y cols. *A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia*. Brain 127, 973-80, (2004).
- 48 Depienne, Stevanin, Brice y cols. *Hereditary spastic paraplegias: an update*. Curr Opin Neurol 20, 674-80, (2007).
- 49 Ferreirinha, Quattrini, Pirozzi y cols. *Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport*. J Clin Invest 113, 231-42, (2004).
- 50 Orso, Martinuzzi, Rossetto y cols. *Disease-related phenotypes in a Drosophila model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine*. J Clin Invest 115, 3026-34, (2005).

- 51 Pirozzi, Quattrini, Andolfi y cols. *Intramuscular viral delivery of paraplegin rescues peripheral axonopathy in a model of hereditary spastic paraplegia*. J Clin Invest 116, 202-8, (2006).
- 52 Purves. *Neuroscience. 2nd edition.*, (Sinauer Associates, 2001).
- 53 Wharton, McDermott, Grierson y cols. *The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene*. J Neuropathol Exp Neurol 62, 1166-77, (2003).
- 54 Warner. *Hereditary Spastic Paraplegia*. ACNR, (2007).
- 55 Deluca, Ebers & Esiri. *The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia*. Neuropathol Appl Neurobiol 30, 576-84, (2004).
- 56 McDermott, White, Bushby y cols. *Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 69, 150-60, (2000).
- 57 Gould & Brady. *Neuropathology: many paths lead to hereditary spastic paraplegia*. Curr Biol 14, R903-4, (2004).
- 58 França, D'Abreu, Maurer-Morelli y cols. *Prospective neuroimaging study in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum*. Mov Disord 22, 1556-62, (2007).
- 59 Salinas, Proukakis, Crosby y cols. *Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms*. Lancet Neurol 7, 1127-38, (2008).
- 60 Blackstone, O'Kane & Reid. *Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway*. Nat Rev Neurosci 12, 31-42, (2011).
- 61 Reid, Kloos, Ashley-Koch y cols. *A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10)*. Am J Hum Genet 71, 1189-94, (2002).
- 62 Roll-Mecak & Vale. *The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules*. Curr Biol 15, 650-5, (2005).
- 63 Park, Zhu, Parker y cols. *Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network*. J Clin Invest 120, 1097-110, (2010).
- 64 Harbour, Breusegem, Antrobus y cols. *The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics*. J Cell Sci 123, 3703-17, (2010).
- 65 Simpson, Cross, Proukakis y cols. *Masparidin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia*. Am J Hum Genet 73, 1147-56, (2003).
- 66 Tsang, Edwards, Wang y cols. *The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling*. Hum Mol Genet 18, 3805-21, (2009).
- 67 Fassier, Hutt, Scholpp y cols. *Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway*. Nat Neurosci 13, 1380-7, (2010).
- 68 Devon, Orban, Gerrow y cols. *Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 9595-600, (2006).
- 69 Bakowska, Jupille, Fatheddin y cols. *Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking*. Mol Biol Cell 18, 1683-92, (2007).
- 70 Zuchner, Wang, Tran-Viet y cols. *Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31*. Am J Hum Genet 79, 365-9, (2006).
- 71 Koppen & Langer. *Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases*. Crit Rev Biochem Mol Biol 42, 221-42, (2007).
- 72 Bross, Naundrup, Hansen y cols. *The Hsp60-(p.V98I) mutation associated with hereditary spastic paraplegia SPG13 compromises chaperonin function both in vitro and in vivo*. J Biol Chem 283, 15694-700, (2008).
- 73 Milewska, McRedmond & Byrne. *Identification of novel spartin-interactors shows spartin is a multifunctional protein*. J Neurochem 111, 1022-30, (2009).
- 74 Jouet, Moncla, Paterson y cols. *New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome*. Am J Hum Genet 56, 1304-14, (1995).
- 75 Saugier-veber, Munnich, Bonneau y cols. *X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus*. Nat Genet 6, 257-62, (1994).

- 76 Zhu, Soderblom, Tao-Cheng y cols. *SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development*. Hum Mol Genet 15, 1343-53, (2006).
- 77 Lee, Paik, Lee y cols. *Drosophila Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development*. Dev Biol 330, 250-62, (2009).
- 78 Tsaousidou, Ouahchi, Warner y cols. *Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration*. Am J Hum Genet 82, 510-5, (2008).
- 79 Boutet, El Mourabit, Prot y cols. *Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy*. Biochimie 91, 796-803, (2009).
- 80 Hooper, Puttamadappa, Loring y cols. *Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets*. BMC Biol 8, 72, (2010).
- 81 Yagi, Ito, Nihei y cols. *N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress*. Hum Mol Genet 20, 3831-40, (2011).
- 82 Alazami, Adly, Al Dhalaan y cols. *A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated Hereditary Spastic Paraplegia locus (SPG18)*. Neurogenetics 12, 333-6, (2011).
- 83 Finsterer, Loscher, Quasthoff y cols. *Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance*. J Neurol Sci 318, 1-18, (2012).
- 84 McCorquodale Iii, Ozomaro, Huang y cols. *Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia*. Clin Genet, (2010).
- 85 Stevanin, Ruberg & Brice. *Recent advances in the genetics of spastic paraplegias*. Curr Neurol Neurosci Rep 8, 198-210, (2008).
- 86 Alvarez, Sanchez-Ferrero, Beetz y cols. *Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia*. BMC Neurol 10, 89, (2010).
- 87 Svenson, Ashley-Koch, Gaskell y cols. *Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet 68, 1077-85, (2001).
- 88 Hazan, Fonknechten, Mavel y cols. *Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia*. Nat Genet 23, 296-303, (1999).
- 89 Claudiani, Riano, Errico y cols. *Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus*. Exp Cell Res 309, 358-69, (2005).
- 90 Salinas, Carazo-Salas, Proukakis y cols. *Spastin and microtubules: Functions in health and disease*. J Neurosci Res 85, 2778-82, (2007).
- 91 Errico, Claudiani, D'Addio y cols. *Spastin interacts with the centrosomal protein NAI4, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon*. Hum Mol Genet 13, 2121-32, (2004).
- 92 Proukakis, Auer-Grumbach, Wagner y cols. *Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene*. Hum Mutat 21, 170, (2003).
- 93 Fonknechten, Mavel, Byrne y cols. *Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia*. Hum Mol Genet 9, 637-44, (2000).
- 94 Bertelli, Cecchin, Lorusso y cols. *Identification of a novel mutation in the spastin gene (SPG4) in an Italian family with hereditary spastic paresis*. Panminerva Med 48, 193-7, (2006).
- 95 Crippa, Panzeri, Martinuzzi y cols. *Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia*. Arch Neurol 63, 750-5, (2006).
- 96 Erichsen, Inderhaug, Mattingdal y cols. *Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol 14, 809-14, (2007).
- 97 Patrono, Casali, Tessa y cols. *Missense and splice site mutations in SPG4 suggest loss-of-function in dominant spastic paraplegia*. J Neurol 249, 200-5, (2002).
- 98 Shoukier, Neesen, Sauter y cols. *Expansion of mutation spectrum, determination of mutation cluster regions and predictive structural classification of SPAST mutations in hereditary spastic paraplegia*. European Journal of Human Genetics 17, 187-94, (2009).
- 99 Riano. *Pleiotrophic effects of spastin on neurite growth depending on expression levels*. Journal of Neurochemistry 108, 1277-88, (2009).

- 100 Namekawa, Ribai, Nelson y cols. *SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years.* Neurology 66, 112-4, (2006).
- 101 Orlacchio, Montieri, Babalini y cols. *Late-onset hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum caused by a new SPG3A mutation.* J Neurol 258, 1361-3, (2011).
- 102 Zhao, Alvarado, Rainier y cols. *Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia.* Nat Genet 29, 326-31, (2001).
- 103 Byrnes & Sonderrmann. *Structural basis for the nucleotide-dependent dimerization of the large G protein atlastin-1/SPG3A.* Proc Natl Acad Sci U S A 108, 2216-21, (2011).
- 104 Zhu, Patterson, Lavoie y cols. *Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin.* J Biol Chem 278, 49063-71, (2003).
- 105 Namekawa, Muriel, Janer y cols. *Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis.* Mol Cell Neurosci 35, 1-13, (2007).
- 106 Hu, Shibata, Zhu y cols. *A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network.* Cell 138, 549-61, (2009).
- 107 Bian, Klemm, Liu y cols. *Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A 108, 3976-81, (2011).
- 108 Iadecola, Zhang, Casey y cols. *Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia.* Stroke 27, 1373-80, (1996).
- 109 Boukhris, Stevanin, Feki y cols. *Hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum in Tunisia: SPG11, SPG15, and further genetic heterogeneity.* Arch Neurol 65, 393-402, (2008).
- 110 De Michele, De Fusco, Cavalcanti y cols. *A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3.* Am J Hum Genet 63, 135-9, (1998).
- 111 Paul & Tzagoloff. *Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit FI-ATPase assembly in Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett 373, 66-70, (1995).
- 112 Atorino, Silvestri, Koppen y cols. *Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia.* J Cell Biol 163, 777-87, (2003).
- 113 Nolden, Ehses, Koppen y cols. *The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria.* Cell 123, 277-89, (2005).
- 114 Brugman, Scheffer, Wokke y cols. *Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes.* Neurology 71, 1500-5, (2008).
- 115 McDermott, Dayaratne, Tomkins y cols. *Paraplegin gene analysis in hereditary spastic paraparesis (HSP) pedigrees in northeast England.* Neurology 56, 467-71, (2001).
- 116 Elleuch, Depienne, Benomar y cols. *Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia.* Neurology 66, 654-9, (2006).
- 117 Bonn, Pantakani, Shoukier y cols. *Functional evaluation of paraplegin mutations by a yeast complementation assay.* Hum Mutat 31, 617-21, (2010).
- 118 Casari, De Fusco, Ciarmatori y cols. *Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease.* Cell 93, 973-83, (1998).
- 119 Starling, Rocco, Cambi y cols. *Further evidence for a fourth gene causing X-linked pure spastic paraplegia.* Am J Med Genet 111, 152-6, (2002).
- 120 McCorquodale, Ozomaro, Huang y cols. *Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia.* Clin Genet, (2010).
- 121 Depienne, Tallaksen, Lephay y cols. *Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases.* J Med Genet 43, 259-65, (2006).
- 122 Beetz, Schule, Deconinck y cols. *REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31.* Brain 131, 1078-86, (2008).
- 123 Denora, Muglia, Casali y cols. *Spastic paraplegia with thinning of the corpus callosum and white matter abnormalities: further mutations and relative frequency in ZFYVE26/SPG15 in the Italian population.* J Neurol Sci 277, 22-5, (2009).



- 124 Svenstrup, Bross, Koefoed y cols. *Sequence variants in SPAST, SPG3A and HSPD1 in hereditary spastic paraplegia*. J Neurol Sci 284, 90-5, (2009).
- 125 Hazan, Fontaine, Bruyn y cols. *Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p*. Hum Mol Genet 3, 1569-73, (1994).
- 126 Fink, Wu, Jones y cols. *Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q*. Am J Hum Genet 56, 188-92, (1995).
- 127 Hedera, DiMauro, Bonilla y cols. *Phenotypic analysis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 8q*. Neurology 53, 44-50, (1999).
- 128 Slavotinek, Pike, Mills y cols. *Cataracts, motor system disorder, short stature, learning difficulties, and skeletal abnormalities: a new syndrome?* Am J Med Genet 62, 42-7, (1996).
- 129 Reid, Dearlove, Whiteford y cols. *Autosomal dominant spastic paraplegia: refined SPG8 locus and additional genetic heterogeneity*. Neurology 53, 1844-9, (1999).
- 130 Reid, Dearlove, Osborn y cols. *A locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13*. Am J Hum Genet 66, 728-32, (2000).
- 131 Fontaine, Davoine, Durr y cols. *A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34*. Am J Hum Genet 66, 702-7, (2000).
- 132 Valente, Brancati, Caputo y cols. *Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34*. Ann Neurol 51, 681-5, (2002).
- 133 Orlacchio, Kawarai, Gaudiello y cols. *New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1*. Ann Neurol 58, 423-9, (2005).
- 134 Zuchner, Kail, Nance y cols. *A new locus for dominant hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 2p12*. Neurogenetics 7, 127-9, (2006).
- 135 Mannan, Krawen, Sauter y cols. *ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet 79, 351-7, (2006).
- 136 Schule, Bonin, Durr y cols. *Autosomal dominant spastic paraplegia with peripheral neuropathy maps to chr12q23-24*. Neurology 72, 1893-8, (2009).
- 137 Hanein, Durr, Ribai y cols. *A novel locus for autosomal dominant "uncomplicated" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 8p21.1-q13.3*. Hum Genet 122, 261-73, (2007).
- 138 Orlacchio, Patrono, Gaudiello y cols. *Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: A locus to 4p and allelism with SPG4*. Neurology 70, 1959-66, (2008).
- 139 Subramony, Nguyen, Langford y cols. *Identification of a new form of autosomal dominant spastic paraplegia*. Clin Genet 76, 113-6, (2009).
- 140 Zhao, Hu, Shen y cols. *A novel candidate locus on chromosome 11p14.1-p11.2 for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia*. Chin Med J (Engl) 121, 430-4, (2008).
- 141 Lin, Li, Liu y cols. *A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42)*. Am J Hum Genet 83, 752-9, (2008).
- 142 Hentati, Pericak-Vance, Hung y cols. *Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity*. Hum Mol Genet 3, 1263-7, (1994).
- 143 Martinez-Redondo, Marcuello, Casajus y cols. *Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer--is it a paradox?* Mitochondrion 10, 102-7, (2010).
- 144 Vazza, Zortea, Boaretto y cols. *A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28*. Am J Hum Genet 67, 504-9, (2000).
- 145 Al-Yahyaee, Al-Gazali, De Jonghe y cols. *A novel locus for hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum and epilepsy*. Neurology 66, 1230-4, (2006).
- 146 Patel, Cross, Proukakis y cols. *SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia*. Nat Genet 31, 347-8, (2002).
- 147 Blumen, Bevan, Abu-Mouch y cols. *A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32*. Ann Neurol 54, 796-803, (2003).
- 148 Hodgkinson, Bohlega, Abu-Amro y cols. *A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14*. Neurology 59, 1905-9, (2002).
- 149 Zortea, Vettori, Trevisan y cols. *Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1*. J Med Genet 39, 387-90, (2002).

- 150 Farag, El-Badramany & Al-Sharkawy. *Troyer Syndrome: report of the first "non-Amish" sibship and review.* Am J Med Genet 53, 383-5, (1994).
- 151 Meijer, Cossette, Roussel y cols. *A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1.* Ann Neurol 56, 579-82, (2004).
- 152 Bouslam, Benomar, Azzedine y cols. *Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28).* Ann Neurol 57, 567-71, (2005).
- 153 Klebe, Azzedine, Durr y cols. *Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild ataxia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3.* Brain 129, 1456-62, (2006).
- 154 Stevanin, Paternotte, Coutinho y cols. *A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG32) on chromosome 14q12-q21.* Neurology 68, 1837-40, (2007).
- 155 Dick, Al-Mjeni, Baskir y cols. *A novel locus for an autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23.* Neurology 71, 248-52, (2008).
- 156 Rainier, Bui, Mark y cols. *Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease.* Am J Hum Genet 82, 780-5, (2008).
- 157 Meilleur, Traore, Sangare y cols. *Hereditary spastic paraplegia and amyotrophy associated with a novel locus on chromosome 19.* Neurogenetics 11, 313-8, (2010).
- 158 Orthmann-Murphy, Salsano, Abrams y cols. *Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations.* Brain 132, 426-38, (2009).
- 159 Dursun, Koroglu, Kocasoy Orhan y cols. *Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1.* Neurogenetics 10, 325-31, (2009).
- 160 Boukhris, Feki, Elleuch y cols. *A new locus (SPG46) maps to 9p21.2-q21.12 in a Tunisian family with a complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum.* Neurogenetics 11, 441-8, (2010).
- 161 Blumkin, Lerman-Sagie, Lev y cols. *A new locus (SPG47) maps to 1p13.2-1p12 in an Arabic family with complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia and thin corpus callosum.* J Neurol Sci 305, 67-70, (2011).
- 162 Slabicki, Theis, Krastev y cols. *A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia.* PLoS Biol 8, e1000408, (2010).
- 163 Kenwrick, Ionasescu, Ionasescu y cols. *Linkage studies of X-linked recessive spastic paraplegia using DNA probes.* Hum Genet 73, 264-6, (1986).
- 164 Keppen, Leppert, O'Connell y cols. *Etiological heterogeneity in X-linked spastic paraplegia.* Am J Hum Genet 41, 933-43, (1987).
- 165 Steinmuller, Lantigua-Cruz, Garcia-Garcia y cols. *Evidence of a third locus in X-linked recessive spastic paraplegia.* Hum Genet 100, 287-9, (1997).
- 166 Arnold & Langer. *Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria.* Biochim Biophys Acta 1592, 89-96, (2002).
- 167 Hansen, Durr, Cournu-Rebeix y cols. *Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60.* Am J Hum Genet 70, 1328-32, (2002).
- 168 Piemonte, Casali, Carozzo y cols. *Respiratory chain defects in hereditary spastic paraplegias.* Neuromuscul Disord 11, 565-9, (2001).
- 169 Suissa, Wang, Poole y cols. *Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication.* PLoS Genet 5, e1000474, (2009).
- 170 Marcuello, Martinez-Redondo, Dahmani y cols. *Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption.* Mitochondrion 9, 27-30, (2009).
- 171 Gomez-Duran, Pacheu-Grau, Lopez-Gallardo y cols. *Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups.* Hum Mol Genet 19, 3343-53, (2010).
- 172 van der Walt, Nicodemus, Martin y cols. *Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease.* Am J Hum Genet 72, 804-11, (2003).
- 173 van der Walt, Dementieva, Martin y cols. *Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk.* Neurosci Lett 365, 28-32, (2004).
- 174 Tonska, Kodron & Bartnik. *Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy.* Biochim Biophys Acta 1797, 1119-23, (2010).

- 175 Arning, Haghikia, Taherzadeh-Fard y cols. *Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease.* J Mol Med 88, 431-6, (2010).
- 176 Venkateswaran, Zheng, Sacchetti y cols. *Mitochondrial DNA haplogroups and mutations in children with acquired central demyelination.* Neurology 76, 774-80, (2011).
- 177 Miller, Dykes & Polesky. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res 16, 1215, (1988).
- 178 den Dunnen & Antonarakis. *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion.* Hum Mutat 15, 7-12, (2000).
- 179 Schouten, McElgunn, Waaijer y cols. *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.* Nucleic Acids Res 30, e57, (2002).
- 180 Beetz, Nygren, Schickel y cols. *High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia.* Neurology 67, 1926-30, (2006).
- 181 Chomczynski & Sacchi. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem 162, 156-9, (1987).
- 182 Garcia-Castro, Reguero, Batalla y cols. *Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients.* Clin Chem 49, 1279-85, (2003).
- 183 Garcia-Castro, Reguero, Alvarez y cols. *Hypertrophic cardiomyopathy linked to homozygosity for a new mutation in the myosin-binding protein C gene (A627V) suggests a dosage effect.* Int J Cardiol 102, 501-7, (2005).
- 184 Sauter, Mitterski, Klimpe y cols. *Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia.* Hum Mutat 20, 127-32, (2002).
- 185 Tang, Zhao, Xia y cols. *Three novel mutations of the spastin gene in Chinese patients with hereditary spastic paraplegia.* Arch Neurol 61, 49-55, (2004).
- 186 Park, Ki, Kim y cols. *Mutation analysis of SPG4 and SPG3A genes and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with hereditary spastic paraplegia.* Arch Neurol 62, 1118-21, (2005).
- 187 Braschinsky, Tamm, Beetz y cols. *Unique spectrum of SPAST variants in Estonian HSP patients: presence of benign missense changes but lack of exonic rearrangements.* BMC Neurol 10, 17, (2010).
- 188 Falco, Scuderi, Musumeci y cols. *Two novel mutations in the spastin gene (SPG4) found by DHPLC mutation analysis.* Neuromuscul Disord 14, 750-3, (2004).
- 189 Meijer, Hand, Cossette y cols. *Spectrum of SPG4 mutations in a large collection of North American families with hereditary spastic paraplegia.* Arch Neurol 59, 281-6, (2002).
- 190 Depienne, Fedirko, Forlani y cols. *Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia.* J Med Genet 44, 281-4, (2007).
- 191 de Bot, van den Elzen, Mensenkamp y cols. *Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 81, 1073-8, (2010).
- 192 Sanchez-Ferrero, Coto, Beetz y cols. *SPG7 mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V.* Clin Genet, (2012).
- 193 Casari. *Spastic Paraplegia 7.* Gene Reviews, (2008).
- 194 Braschinsky, Luus, Gross-Paju y cols. *The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia.* Neuroepidemiology 32, 89-93, (2009).
- 195 Erichsen, Koht, Stray-Pedersen y cols. *Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study.* Brain 132, 1577-88, (2009).
- 196 Magariello, Muglia, Patitucci y cols. *Mutation analysis of the SPG4 gene in Italian patients with pure and complicated forms of spastic paraplegia.* J Neurol Sci 288, 96-100, (2010).
- 197 Appleton, Farrell & Dunn. *'Pure' and 'complicated' forms of hereditary spastic paraplegia presenting in childhood.* Dev Med Child Neurol 33, 304-12, (1991).
- 198 Topaloglu, Pinarli, Erdem y cols. *Clinical observations in autosomal recessive spastic paraplegia in childhood and further evidence for genetic heterogeneity.* Neuropediatrics 29, 189-94, (1998).

- 199 Fei, Tang, Rong y cols. *Two novel mutations in the Spastin gene of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol 18, 1194-6, (2011).
- 200 Battini, Fogli, Borghetti y cols. *Clinical and genetic findings in a series of Italian children with pure hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol 18, 150-7, (2011).
- 201 Boone, Liu, Zhang y cols. *Alu-specific microhomology-mediated deletion of the final exon of SPAST in three unrelated subjects with hereditary spastic paraplegia*. Genet Med 13, 582-92, (2011).
- 202 Sulek, Elert, Rajkiewicz y cols. *Screening for the hereditary spastic paraplegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals*. Neurol Sci, (2011).
- 203 Vidal, Frangione, Rostagno y cols. *A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia*. Nature 399, 776-81, (1999).
- 204 Errico, Ballabio & Rugarli. *Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics*. Hum Mol Genet 11, 153-63, (2002).
- 205 Pantakani, Czyzewska, Sikorska y cols. *Oligomerization of ZFYVE27 (Protrudin) Is Necessary to Promote Neurite Extension*. PLoS ONE 6, e29584, (2011).
- 206 Roll-Mecak & Vale. *Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin*. Nature 451, 363-7, (2008).
- 207 Smith, Bevan, Vance y cols. *Four novel SPG3A/atlastin mutations identified in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia kindreds with intra-familial variability in age of onset and complex phenotype*. Clin Genet 75, 485-9, (2009).
- 208 Sauter, Engel, Neumann y cols. *Novel mutations in the Atlastin gene (SPG3A) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the SPG3A locus*. Hum Mutat 23, 98, (2004).
- 209 Abel, Fonknechten, Hofer y cols. *Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A*. Neurogenetics 5, 239-43, (2004).
- 210 Namekawa, Nelson, Ribai y cols. *A founder effect and mutational hot spots may contribute to the most frequent mutations in the SPG3A gene*. Neurogenetics 7, 131-2, (2006).
- 211 Ming. *[SPG3A-hereditary spastin paraplegia with genetic anticipation and incomplete penetrance]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 24, 15-8, (2007).
- 212 Loureiro, Miller-Fleming, Thieleke-Matos y cols. *Novel SPG3A and SPG4 mutations in dominant spastic paraplegia families*. Acta Neurol Scand 119, 113-8, (2009).
- 213 Rainier, Sher, Reish y cols. *De novo occurrence of novel SPG3A/atlastin mutation presenting as cerebral palsy*. Arch Neurol 63, 445-7, (2006).
- 214 Ivanova, Claeys, Deconinck y cols. *Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy*. Arch Neurol 64, 706-13, (2007).
- 215 Schlipf, Schule, Klimpe y cols. *Amplicon-based high-throughput pooled sequencing identifies mutations in CYP7B1 and SPG7 in sporadic spastic paraplegia patients*. Clin Genet, (2011).
- 216 Warnecke, Duning, Schirmacher y cols. *A novel splice site mutation in the SPG7 gene causing widespread fiber damage in homozygous and heterozygous subjects*. Mov Disord 25, 413-20, (2010).
- 217 Starling, Rocco, Passos-Bueno y cols. *Autosomal dominant (AD) pure spastic paraplegia (HSP) linked to locus SPG4 affects almost exclusively males in a large pedigree*. J Med Genet 39, e77, (2002).
- 218 Huerta, Castro, Coto y cols. *Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population*. J Neurol Sci 236, 49-54, (2005).
- 219 Simon, Zheng, Velazquez y cols. *Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2*. Arch Neurol 64, 1042-4, (2007).
- 220 Kazuno, Munakata, Nagai y cols. *Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics*. PLoS Genet 2, e128, (2006).





***ANEXO: Publicaciones***





# Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia

Victoria Álvarez<sup>1\*</sup>, Elena Sánchez-Ferrero<sup>1,2</sup>, Christian Beetz<sup>2</sup>, Marta Díaz<sup>1</sup>, Belén Alonso<sup>1</sup>, Ana I Corao<sup>1</sup>, Josep Gámez<sup>3</sup>, Jesús Esteban<sup>4</sup>, Juan F Gonzalo<sup>4</sup>, Samuel I Pascual-Pascual<sup>5</sup>, Adolfo López de Munain<sup>6</sup>, Germán Moris<sup>7</sup>, Renne Ribacoba<sup>8</sup>, Celedonio Márquez<sup>9</sup>, Jordi Rosell<sup>10</sup>, Rosario Marín<sup>11</sup>, Maria J García-Barcina<sup>12</sup>, Emilia del Castillo<sup>13</sup>, Carmen Benito<sup>13</sup>, Eliecer Coto<sup>1</sup>, the group for the study of the genetics of Spastic Paraplegia\*

## Abstract

**Background:** Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) are characterized by progressive spasticity and weakness of the lower limbs. At least 45 loci have been identified in families with autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), or X-linked hereditary patterns. Mutations in the SPAST (SPG4) and ATL1 (SPG3A) genes would account for about 50% of the ADHSP cases.

**Methods:** We defined the SPAST and ATL1 mutational spectrum in a total of 370 unrelated HSP index cases from Spain (83% with a pure phenotype).

**Results:** We found 50 SPAST mutations (including two large deletions) in 54 patients and 7 ATL1 mutations in 11 patients. A total of 33 of the SPAST and 3 of the ATL1 were new mutations. A total of 141 (31%) were familial cases, and we found a higher frequency of mutation carriers among these compared to apparently sporadic cases (38% vs. 5%). Five of the SPAST mutations were predicted to affect the pre-mRNA splicing, and in 4 of them we demonstrated this effect at the cDNA level. In addition to large deletions, splicing, frameshifting, and missense mutations, we also found a nucleotide change in the stop codon that would result in a larger ORF.

**Conclusions:** In a large cohort of Spanish patients with spastic paraplegia, SPAST and ATL1 mutations were found in 15% of the cases. These mutations were more frequent in familial cases (compared to sporadic), and were associated with heterogeneous clinical manifestations.

## Background

The hereditary spastic paraplegias (HSP) are characterized by progressive spasticity and weakness of the lower limbs due to axonal degeneration in the pyramidal tract. The disease is classified as “pure” when spasticity is the only clinical finding, and as “complicated” when other clinical features (dementia, cerebellar ataxia, epilepsy, peripheral neuropathy) are also present [1]. HSP is frequently familial and at least 45 loci have been identified in families with autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), or X-linked inheritance [2-4]. This

genetic heterogeneity partly explains the differences in disease severity, age at onset, rate of progression, and degree of disability between families. However, intrafamilial heterogeneity is also frequent.

SPG4 (OMIM#604277) is the most common form of HSP, accounting for approximately 40% of the familial and 6-15% of the sporadic cases. The SPAST/SPG4 gene encodes spastin, a member of the AAA (ATPase associated with various cellular activities) family of proteins, implicated in the remodeling of protein complexes upon ATP hydrolysis and the coordination of axonal microtubule interactions with the tubular endoplasmic reticulum network [5,6]. To date, >240 SPAST mutations have been reported (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; date of consultation August 2, 2010), mainly in patients

\* Correspondence:

victoria.alvarez@sespa.princast.es

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Genetics -Genetic Unit, Hospital Universitario

Central de Asturias, Oviedo, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



with pure HSP [7-12]. Most of the SPAST mutations are single-nucleotide changes or small deletions/insertions, but large deletions and duplications have also been reported [13-16]. This suggested that both, haploinsufficiency and “toxic” gain of function could explain the pathogenic mechanism of SPAST mutations [5,17-19].

SPG3A (OMIM#606439) is the second most frequent form of ADHSP. The ATL1/SPG3A gene encodes atlastin, a protein localized in the endoplasmic reticulum and the Golgi and implicated in vesicle trafficking and neurite outgrowth [20,21]. To date, >25 ATL1 mutations have been reported (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; date of consultation August 2, 2010), mainly missense changes that supported a gain of function pathogenic mechanism. ATL1 mutations accounted for approximately 10% of the ADHSP families, and have been mainly found in pure HSP [22,23]. ATL1 mutations are also frequent in early onset (childhood or adolescence) cases [24-26].

This is the first report of the mutational spectrum of the SPAST and ATL1 genes in a large cohort of unrelated HSP patients from Spain. Few studies on cohorts >200 patients have been published, and the parallel screening of both genes was rarely reported.

## Methods

### Patients

This study was approved by the Ethical Committee of Hospital Universitario Central Asturias (HUCA), and all the participants (patients and controls) signed an informed consent. A total of 370 non-related patients (index cases) were recruited through the Neurology Departments of several Hospitals from Spain. HSP was diagnosed by qualified neurologists on the basis of Harding's criteria. Based on the clinical, radiological, and biochemical findings, cases with diseases that mimicked spastic paraplegia were excluded [27]. A total of 141 patients (38%) had a family history of HSP with a dominant inheritance pattern, and were thus classified as ADHSP cases. The absence of family history of the disease was established in 229 patients (62%) after interview on their first and second degree relatives. These cases were classified as “apparently” sporadic or with an uncertain inheritance pattern. In 177 of these the two parents were alive and did not have symptoms consistent with HSP, while in 52 the inheritance pattern could not be established because no clinical data were available from relatives.

### SPAST and ATL1 sequencing

DNA was obtained from blood leukocytes and the 17 coding exons of SPAST (plus at least 50 bp of the flanking intronic sequences) were polymerase chain reaction (PCR) amplified (Additional file 1, Table S1). PCR fragments were purified and the two strands were sequenced

using Big Dye chemistry in an ABI3130 system (Applied Biosystems, Ca, USA). These sequences were compared with the SPAST reference sequence (ENSG0000021574 for the genomic; ENST00000315285 for the transcript; <http://www.ensembl.org>). In patients who were negative for SPAST mutations and had ADHSP (n = 88) or patients without a family history of HSP and onset age  $\leq 20$  years (n = 99), we amplified and sequenced the 13 coding exons of ATL1 (reference sequences ENSG00000198513 for the genomic, and ENST00000358385 for the transcript; <http://www.ensembl.org>). All the DNA sequence variants were named following the guidelines of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

### Controls screening

All the new putative mutations (not previously reported as SPAST or ATL1 mutations or polymorphisms) were screened in 400 controls. These were healthy individuals aged 21-65 years recruited through the Blood Bank of HUCA. The new nucleotide changes were genotyped through PCR-RFLP, single strand conformation analysis (SSCA), or denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), as reported [28]. Each PCR fragment containing a putative mutation gave a characteristic RFLP, SSCA or DHPLC pattern, and we could thus determine its presence/absence in the controls. When a new nucleotide change was not found among the 400 controls we determined, when it was possible, the carrier status of all the available affected relatives to confirm the segregation of the mutation with the disease.

### MLPA analysis

The multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) assay with the Salsa Kit P165 HPA (MRC Holland, Amsterdam) was used to determine the existence of genome copy number aberrations in the SPAST and ATL1 genes in ADHSP patients who were negative for sequencing mutations [13]. To investigate the consequences of large SPAST deletions at the transcript level, we isolated the mRNA from leukocytes in 10 ml of blood (Trizol reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and synthesised the cDNA (Quantitec Reverse Transcription kit, Quiagen, Hilden, Germany). The cDNA was amplified with primers that matched exons flanking the deletion (conditions available upon request), and the PCR products were purified and sequenced.

### Analysis of SPAST transcripts

To determine the effect of some SPAST mutations on mRNA transcripts, the cDNA synthesised from leukocytes was amplified with primers that matched the exons flanking the mutation (additional file 1, Table S2), and the PCR fragments were purified from agarose gels and sequenced.

### Statistical analysis

The analysis of variance (SPSS 17.0 software) was used to compare the mean onset age and disease duration between patients with mutations in SPAST and ATL1 and patients without mutations.

## Results

### Patients characteristics

We studied a total of 370 unrelated HSP index cases, with a mean onset age of 28 ( $\pm$  21) years (range 1-77 years), and a mean disease duration of 17 ( $\pm$  15) years. A total of 321 patients (87%) had a pure HSP, while 49 (13%) were complicated cases with peripheral neuropathy (the most frequent finding), cerebellar or cerebral atrophy, mental retardation, nystagmus, or dysarthria.

A total of 44 of the 141 patients (31%) with ADHSP had a SPAST mutation, and 10 mutations were found among the 229 (5%) cases apparently sporadic or with an uncertain inheritance pattern. However, in three of these patients the mutation (p.Leu426Val, p.Lys503insArg, and p.Met390Val) was de novo because none of the two parents was mutation carrier (the paternity was confirmed). We found 10 ATL1 mutation carriers among 88 ADHSP cases (11%), and the only apparently sporadic proband had a de novo mutation (p.Gln154Glu) (Additional file 2, Figure S1).

### SPAST mutations

We found 48 SPAST mutations in 52 patients (Table 1). These were missense changes in amino acids conserved between species ( $n = 22$ ), nonsense mutations ( $n = 7$ ), small frameshifting insertions/deletions ( $n = 13$ ), nucleotide changes in the intronic splicing consensus sequence ( $n = 5$ ), and a sense mutation in the stop codon (Figure 1). A total of 15 mutations had been previously reported, while 33 (69%) were novel.

### SPAST missense mutations out of the AAA domain

Most of the missense mutations were in the AAA domain. Two novel missense changes (p. Pro293Leu, and p. Asp613Ala) were outside of the AAA domain, where missense mutations have been rarely found. The two amino acids were evolutionary conserved. The p. Pro293Leu proband was a 51-year-old man with progressive gait disorder starting at the age of 31, who has been confined to a wheelchair due to his spasticity (pure form) for the last two years. His 46-year-old sister, and one of his daughters (18 years old) also carried this mutation. They both presented brisk reflexes and Babinski's sign, but no spasticity and an almost normal gait. The p.Asp613Ala was found in a 45 years old man with a pure phenotype affecting only the lower limbs and the first symptoms at the age of 36 years. He did not report a family history of the disease, although no relatives were studied.

We also found a new SPAST missense variant (p. Ile328Leu) in a 15 years old male with complicated spastic paraplegia starting at the age of 18 months. This putative mutation was also found in his father's grandmother (asymptomatic), but the proband's father was not available for study. Although this variant was not found among the controls and involved a conserved amino acid, a bioinformatics analysis (SIFT v2. program, Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) indicated a non significant change in the protein function, and was thus classified as a change of uncertain pathogenic effect.

### G (exon 3) affected

splicing",1,0,1,0,0pc,0pc,0pc>SPAST c.583C>G (exon 3) affected splicing

The c.583C>G (p.Leu195Val) was found in a 19 years old male with an onset at the age of 2 years and a phenotype complicated with neuropathy. He was from a family with ADSPH in which we confirmed the segregation of the disease with this mutation. This has been previously reported as a missense mutation, and the bioinformatic analysis (SIFT v2. program) indicated that this change would affect the protein function. However, the c.583C>G was four nucleotides from the 3' end of exon 3, and was also predicted to reduce the score of the splicing consensus site (Human Splicing Finder v. 2.4; <http://www.umd.be/SSF/>). This mutation could thus result in an aberrant mRNA sequence. To confirm this, we isolated the mRNA from the patient's blood leukocytes and amplified the SPAST cDNA with primers for exons 2 and 7. The last 4 nucleotides of exon 3 were missed in the transcript, that would thus be translated into an aberrant protein (Figure 2A).

### SPAST sense mutation

We found a novel mutation in the SPAST stop codon, c.1849T>G (p.X617Glu) in two non related patients without known affected relatives. The mutated transcript was predicted to be translated into a 46 amino acids longer protein. To determine the stability of the mRNA containing this mutation, we synthesized the cDNA from RNA obtained from leukocytes of one of the patients and amplified and sequenced a PCR-fragment generated with primers that matched exons 11 and the 3' untranslated region (UTR). The two alleles gave equally intense sequence electropherogram peaks, suggesting that c.1849G did not increase the mRNA decay and was likely translated into a mutated protein (Figure 2B).

### SPAST mutations affecting splicing

In addition to the above described c.583C>G in exon 3 of SPAST, we found five changes in intron splicing consensus nucleotides. The in silico analysis (Splice Site

**Table 1 Mutations identified in the SPAST gene in the Spanish HSP cohort**

Case	Onset age (Years)	Phenotype*	GENE	EXÓN	Mutation	Protein change	Reference
193	60	Pure-UHSP	SPAST	1	c.349C>T	p.Arg117X	This study
69	45	Pure-SHSP	SPAST	2	c.469delG	p.Glu157f sX159	This study
81	35	Pure-SHSP	SPAST	3	c.577C>T	p.Gln193X	[7]
138	2	Complicated-ADHSP	SPAST	3	c.583C>G	p.Leu195Val	[10]
166	43	Pure-ADHSP	SPAST	5	C.782C>G	p.Ser261X	[7]
197	53	Pure-ADHSP	SPAST	5	c.857-859delCTA	p.Pro286-Thr287delinsP	This study
257	23	Pure-ADHSP	SPAST	5	c.806c->G	Tyr269X	[7]
300	8	Pure-ADHSP	SPAST	5	c.746C>G	p.Ser249X	[8]
174	1	Pure-ADHSP	SPAST	6	c.879delG	p. Pro293fsX314	This study
205	20	Pure-ADHSP	SPAST	6	.936-37insA	p.Lys.312fsX318	This study
206	30	Pure- UHSP	SPAST	6	c.977-978insA	p.Asn326fsX331	This study
335	32	Pure- SHSP	SPAST	6	c.878C>T	p.Pro293Leu	This study
13	40	Pure-ADHSP	SPAST	7	c.1040A>C	p.Gln347His	This study
130	0	Complicated-ADHSP	SPAST	7	c.1082C>T	p.Pro361Leu	[41]
133	35	Pure-ADHSP	SPAST	7	c.1054C>T	p.Gln352X	This study
351		Pure-ADHSP	SPAST	7	c. 1091-1098delGGCCTGAG	p.Arg364fsX392	This study
47	66	Pure-ADHSP	SPAST	8	c.1139T>A	p.Leu380His	[15]
111	49	Pure-ADHSP	SPAST	8	c.1133T->G	p.Leu378Arg	This study
180	54	Pure-ADHSP	SPAST	8	c.1172T>C	p.Leu391Pro	[42]
273	1	Complicated-SHSP	SPAST	8	c.1168A->G	p.Met390Val	[43]
7	44	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1215-1219delTATAA	p. Asn405fsX441	[7]
22	42	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1174-1180delGCTAAG	p. Ala392fsX405	This study
23	35	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1226G>A	p. Ala409Thr	This study
32	35	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1177-1180delAAAGCAGTA GCT	p.Lys393-Ala396del	This study
52	45	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1210-1212delITTT	p.Phe404del	[44]
80	38	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1210-1212delITTT	p.Phe404del	[44]
98	29	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1192-93delGA/insT	Glu398fsX406	This study
179	10	Pure-ADHSP	SPAST	9	c.1192-93delGA/insT	Glu398fsX406	This study
363	2	Pure ADHSP	SPAST	9	C.1128A>C	p.Ser410Arg	This study
135	47	Pure-ADHSP	SPAST	10	c.1306T>C	p.Ser436Pro	This study
170	3	Complicated-SHSP	SPAST	10	c.1276 C>G	p.Leu426Val	[7]
373	10	Pure-ADHSP	SPAST	10	c. 1321G->A	p.Asp441Asn	This study
50	2	Pure-ADHSP	SPAST	11	c.1387A>G	p.Thr463Ala	This study
200	35	Pure-ADHSP	SPAST	11	c.1378c>A	p.Arg460Ser	[45]
308	30	Pure -ADHSP	SPAST	IVS11	c.1414-2A>C	Exon 12 skipping	This study
322	30	Pure ADHSP	SPAST	IVS11	c.1414-1G>C	Exon 12 skipping	This study
86	40	Pure- ADHSP	SPAST	12	c.1439-1145delTACTTGT/insC	p.Val480fs	This study
118	61	Pure-ADHSP	SPAST	12	c.1466C-> T	p.Pro489Leu	[46]
177	20	Pure-ADHSP	SPAST	12	c.1492A<G	p.Arg498Gly	This study
352		Pure-ADHSP	SPAST	12	c.1474C>T	p.Leu492Phe	This study
145	16	Pure-ADHSP	SPAST	IVS12	c1494-2A>G	presumed missplicing	This study
178	1	Pure-SHSP	SPAST	13	c.1507-1508insGGC	p.Lys503insArg	This study
334	32	Pure-ADHSP	SPAST	13	c.1540A>G	p.Arg503Trp	[11]
358	30	Pure-ADHSP	SPAST	14	c.1540A>G	p.Arg514Gly	[12]
253	18	Pure-ADHSP	SPAST	15	c.1684C>T	p.Arg562X	[7]
261	50	Pure-ADHSP	SPAST	IVS15	c.1687+1G/A	Ex15 skipping	[7]
62	40	Pure-ADHSP	SPAST	IVS15	c.1687+1G/T	Ex15 skipping	This study
103	40	Pure-ADHSP	SPAST	17	c.1793T-> C	p.Ile580Thr	This study
112	56	Pure-ADHSP	SPAST	17	C.1739T-> C	p.Ile580Thr	This study

Table 1 Mutations identified in the SPAST gene in the Spanish HSP cohort (Continued)

212	35	Pure-ADHSP	SPAST	17	c.1849T-> G	p.X617Glu	This study
286	54	Complicated-UHSP	SPAST	17	c.1849T-> G	p.X617Glu	This study
310	36	Pure- UHSP	SPAST	17	C.1838A-> C	p.Asp613Ala	This study
EXON DELETIONS							
199	20	Pure-ADHSP	SPAST	-		EX10-16 deletion	[14]
225	14	Pure-ADHSP	SPAST	-		Ex 6-7 deletion	This study

\* ADHSP- Autosomal dominant spastic paraplegia; SHSP: apparently sporadic spastic paraplegia (including siblings with healthy parents); UHSP: Unkown familial history spastic paraplegia

Prediction by Neural Network; [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) indicated that the five changes would affect the pre-mRNA splicing. We could synthesize the cDNA from four of the patients, that was amplified with primers that matched exons 7 and 17, and exons 11 and 17. In all these cases two PCR-fragments were amplified, and the longer fragment corresponded to the wild type transcript while the shorter resulted from an exon skipping. In this way, we confirmed the existence of defective transcripts (Figure 2C).

#### Large SPAST deletions

We performed MLPA analysis in the 77 ADHSP cases who were negative for ATL1 and SPAST sequencing mutations. Two patients (2.5%) showed a significantly reduced amplification signal for exons 10-16, or exons 6-7 of SPAST. In the patient with a putative deletion of exons 10-16 we amplified the cDNA with primers that matched exons 9 and 17, and confirmed the skipping of exons 10-16 (Figure 2D). In this pedigree, the age at onset (third decade) was similar in the three affected members who were studied, and the oldest patient (an 81-year-old man) had been confined to a wheelchair for the previous five years.

#### ATL1 mutations

The ATL1 exons were sequenced in a total 88 patients with ADHSP and in 99 patients without a family history of HSP and an onset age  $\leq 20$  years. We found seven mutations and a variant with uncertain pathogenic effect in 11 patients (Table 2). Three were novel missense changes (p.His256Asp, p.Gln154Glu, and p.Phe413Val), while 5 had been reported. The p.Arg239Cys was a recurrent mutation found in 3 non related patients.

Mutations p.Gln154Glu, (c.460 C>G), p. His256Asp (c.766C>A), and p.Phe413Val (c.1237T>G) are located in the guanilate binding protein domains. The p.Gln154Glu mutation was found in a patient with a pure phenotype and onset of symptoms in childhood. His son showed gait problems at the age of two years. The p.His256Asp patient was a 45 years old woman with the onset of symptoms at the age of 3 years and a progressive spastic paraplegia (Additional file 2, Figure S1). In her family, we identified mutation carriers who were asymptomatic at ages of 60

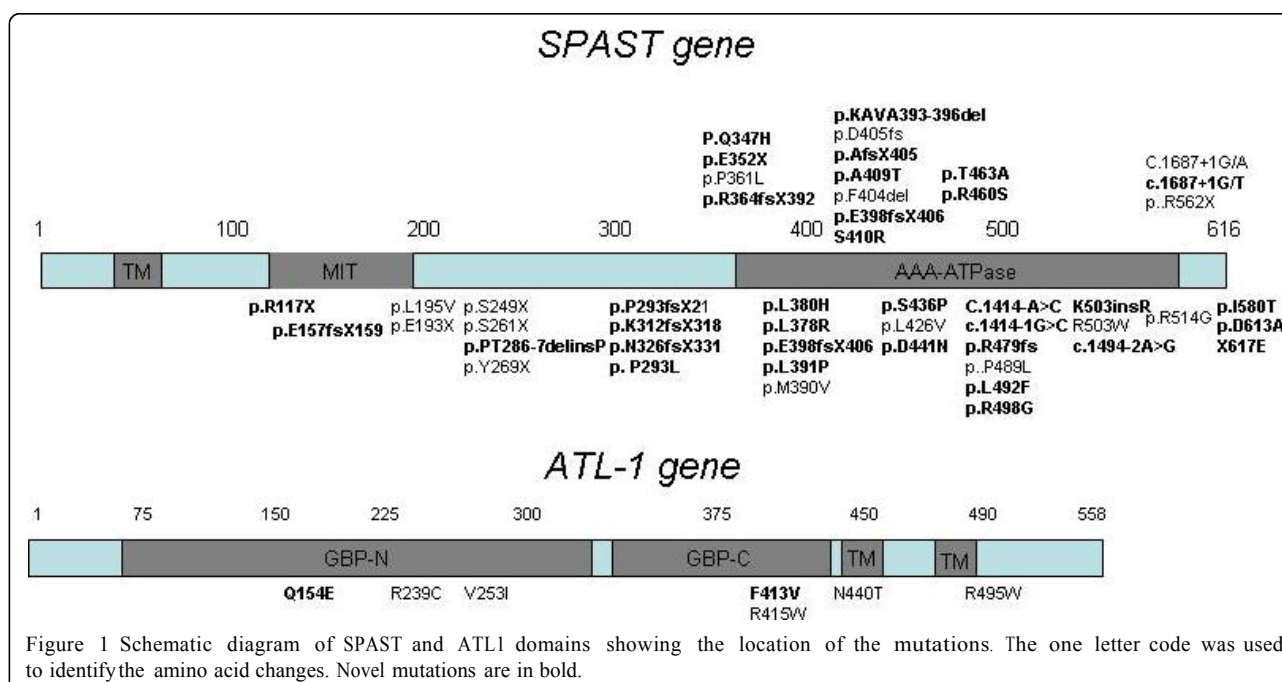
and 63 years, and this could thus be classified as a variant with uncertain pathogenic effect. Mutation p.Phe413Val was found in a patient with an onset age of 6 years and a complicated phenotype (neuropathy). Her mother was affected, but she was death and we could not confirm whether carried the mutation. None of the 77 ADHSP patients studied through MLPA showed evidence for large ATL1 deletions.

#### SPAST and ATL1 polymorphisms

We found several polymorphisms in the two genes (Additional file 1, Table S3). All the new polymorphisms were intronic, or exonic silent amino acid changes with one exception: c.844 T>A in exon 5 of SPAST (p. Ser282Thr). This missense change affected an amino conserved between species and was not found in any of the 400 controls. Although it could be considered a putative mutation, was in a patient with the p.Ser261X mutation (located also in exon 5). Segregation analysis to determine whether the two nucleotide changes were in different chromosomes was not possible. However, the electrophoretic pattern of bands after double restriction enzyme digestion (MnII + MboI) of the exon 5 fragment indicated that the mutation was in cis with the c.844 A allele (data not shown). This suggested that this was likely a rare variant, rather than an HSP mutation. Two missense polymorphisms that have been proposed as modifiers of the clinical phenotype (p.Ser44Leu and p.Pro45Leu) were not found in our patients [29].

#### Genotype-phenotype correlation

The phenotype associated with SPAST and ATL1 mutations was pure in 48 (87%) and 10 (90%) of the index patients, respectively. We analysed all the available relatives of the 63 index cases with mutations, and identified a total of 54 SPAST and 15 ATL1 mutation carriers. A total of 13 mutation carriers (10 for SPAST and 3 for ATL1 gene) were asymptomatic at the time of our analysis. The mean onset age of the disease (index cases and relatives) was 34.5 ( $\pm 17.72$ ) years for SPAST mutation carriers, and 7.67 ( $\pm 5.9$  years) for ATL1 mutation carriers ( $p < 0.001$ ). A difference was also observed between ATL1 mutation carriers and patients without SPAST/ATL1 mutations



( $7.67 \pm 5.9$  vs.  $27.78 \pm 20.238$ ;  $p < 0.001$ ). The mean duration of symptoms at the time of examination did not differ between patients with SPAST ( $14.5 \pm 11.1$ ) and ATL1 ( $18.78 \pm 15.057$ ) mutations. No difference in disease duration was observed between SPAST or ATL1 mutation carriers and patients without mutations.

## Discussion

SPAST mutations (including large gene deletions) were found in 15% (54/370) of the patients, but this frequency increased to 31% (44/141) among patients with ADHSP. Most of the SPAST mutations were novel, and this was in agreement with previous reports that described a high rate of private mutations in this gene [30,10,15]. We found an ATL1 mutation in 6% of the patients studied for this gene, but this frequency could be underestimated because we did not include ADHSP patients with a SPAST mutation or patients with sporadic/uncertain HSP and an onset age  $>20$  years. However, we think that the ATL1 mutation rate should be right because double mutated patients (SPAST + ATL1) have not been reported, and ATL1 mutations were rare among non-ADHSP patients with an onset age  $>20$  years [22,25,26].

Considering the ADHSP cases, the mutational screening of SPAST and ATL1 identified a total of 54 mutation carriers, a frequency (38%) within the range reported in other populations [10,12,31,32]. Also in agreement with previous reports, the frequency of SPAST and ATL1 mutation carriers was much lower among patients with sporadic/uncertain HSP [12]. Four of the sporadic cases had a de novo mutation. A high rate of de novo mutational events

for SPAST and ATL1 has been previously described, indicating that sporadic cases should also be screened for mutations in these genes after exclusion of other major neurological causes of spasticity [15,23,33-35].

SPAST mutations are mostly restricted to the AAA protein domain. It is thus remarkable that three of the missense mutations in our patients were out of this domain (p.Leu195Val, p.Pro293Leu, and p.Asp613Ala). In the case of ATL1 all the mutations were missense changes in the GTPase and transmembrane domains of atlastin, and would disrupt the normal protein folding and oligomerization [20,21]. The SPAST c.C583G variant was previously reported as a missense mutation (p.Leu195Val) [10]. However, this change was within the consensus splicing sequence of exon 3 and we confirmed its effect on pre-RNA splicing. Nucleotide changes in the last nucleotides of exons could result in both, normal and splicing defective transcripts [36-38]. Although we found an aberrant transcript we could not define whether the c.583 G resulted also in normal transcripts.

In the SPAST gene we also found one mutation in the stop codon (c.1849T>G; X617Glu), that would result in the translation of 46 amino acid beyond the stop codon. To our knowledge, this is the first sense mutation reported in this gene. The abolishment of a stop codon and the appearance of a longer ORF has been found in other hereditary diseases, such as the British Familial Dementia caused by a sense mutation in the ITM2B gene [39].

We performed MLPA analysis in 78 patients with ADHSP and we found two large deletions in the SPAST gene, which accounts for 2.5% of patients. In a recent

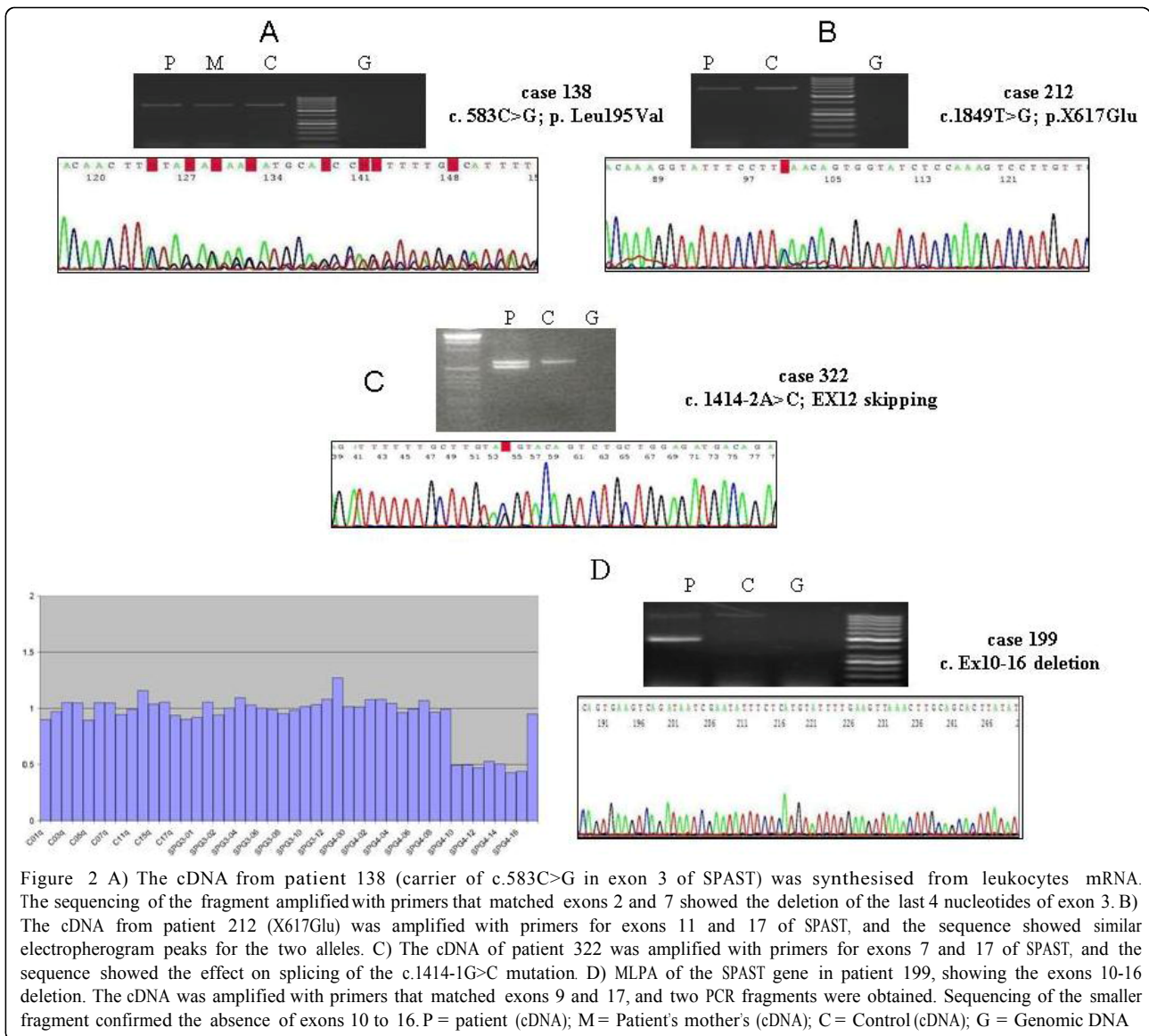


Figure 2 A) The cDNA from patient 138 (carrier of c.583C>G in exon 3 of SPAST) was synthesised from leukocytes mRNA. The sequencing of the fragment amplified with primers that matched exons 2 and 7 showed the deletion of the last 4 nucleotides of exon 3. B) The cDNA from patient 212 (X617Glu) was amplified with primers for exons 11 and 17 of SPAST, and the sequence showed similar electropherogram peaks for the two alleles. C) The cDNA of patient 322 was amplified with primers for exons 7 and 17 of SPAST, and the sequence showed the effect on splicing of the c.1414-1G>C mutation. D) MLPA of the SPAST gene in patient 199, showing the exons 10-16 deletion. The cDNA was amplified with primers that matched exons 9 and 17, and two PCR fragments were obtained. Sequencing of the smaller fragment confirmed the absence of exons 10 to 16. P = patient (cDNA); M = Patient's mother's (cDNA); C = Control (cDNA); G = Genomic DNA

Table 2 Mutations in the ATL1 gene

Case	onset age (Years)	Phenotype/Inheritance	GEN	Exon	Mutation	Protein	Reference
57.1	1	Pure- SHSP	ATL1	4	c.460 C>G	p.Gln154Glu	This study
97	8	Pure-ADHSP	ATL1	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	[47]
102	4	Pure-ADHSP	ATL1	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	[47]
220	3	Pure-ADHSP	ATL1	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	[47]
279	5	Pure-ADHSP	ATL1	7	c.715C>T	p.Arg239Cys	[47]
64	10	Pure-ADHSP	ATL1	8	c.757 G>A	p.Val253Ile	[25]
159	5	Pure-ADHSP	ATL1	12	c.1483c>T	p.Arg495Trp	[25]
110	17	Pure-ADHSP	ATL1	12	c.1319A->C	p.Asn440Thr	[25]
232	6	Pure-ADHSP	ATL1	12	c.1237T->G	p.Phe413Val	This study
233	16	Complicated-ADHSP	ATL1	12	c.1243 C->T	p.Arg415Trp	[40]

<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/10/89>

work Shoukier et al. reported a similar frequency for this type of mutation [12]. However, previous studies reported a much higher frequency (18-23%) [13,15]. Additional studies are thus necessary to define the frequency of large deletions/duplications in the aetiology of HSP.

Finally, SPAST and ATLL1 mutations have been associated with variable penetrance, leading to heterogeneous HSP phenotypes in terms of onset age and clinical symptoms (pure vs. complicated) [40,15]. This heterogeneity could be partly explained by different mutated genes. As discussed above, we observed a significantly higher frequency of familial dominant HSP among ATLL1 patients, compared to SPAST mutation carriers, and pure HSP was also more frequent among the patients with ATLL1 mutations. However, phenotypic variability was also common among mutation carriers from the same family.

## Conclusions

In conclusion, we reported the mutational spectrum of the SPAST and ATLL1 genes in a large cohort of Spanish patients with spastic paraplegia. We found a mutation in 15% of the cases, and a frequency of mutation carriers significantly higher among ADHSP compared to sporadic cases. Thus, the genetic screening should be more relevant in patients (pure and complicated phenotypes) with a family history of the disease. However, the fact that a significant number of apparently sporadic cases had a mutation suggested that these patients should not be excluded from the genetic study. The mutational report could be of limited value to predict the phenotype associated to these mutations, as demonstrated by the heterogeneous behavior of most of the mutations.

## Note

\* Manuel Amorín, Eugenia Marzo-Sola, Carlos H. Lahoz, Pia Gallano, Concepción Alonso-Cerezo, Rafael Palencia-Luaces, Eduardo Gutiérrez- Rivas, Rogelio Simón, Loreto Martorell, Eduardo López-Laso, José M. Asensi, Luis Hernández- Echebarria, Yolanda Morgado, Alonso González-Masegosa, Juan J. Garcia- Peñas, Irene Catalina-Alvarez, José L. Muñoz-Blanco, Miguel Fernández-Burriel, Juan B. Espinal, Mariano Aparicio- Blanco, Jon Infante, María Vázquez-Espinar, Elena Maside

## Additional material

Additional file 1: Supplementary tables and supplementary figure 1 legend for Alvarez et al. This file contains information about PCR primers, polymorphisms detected and legend of supplementary figure.

Additional file 2: supplementary FIGURE1 for Alvarez et al. This file contains a figure showing several examples of mutations detected.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias PI08/0915 (European FEDER funds) to V.A. E.S-F. was a fellowship from FICYT-Principado de Asturias. The authors thank the patients and family members for their participation in this study. Authors wish to thank Fundación Parkinson Asturias and Obra Social CAJASTUR for their support.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Genetics -Genetic Unit, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital Jena, Jena, Germany. <sup>3</sup>Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Univ. Autònoma Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Neurology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain. <sup>5</sup>Pediatric Neurology Department, University Hospital La Paz, Madrid, Spain. <sup>6</sup>Neurology Department, Hospital Donostia-Instituto Biodonostia-Cibermed, San Sebastián, Spain. <sup>7</sup>Neurology Department, Hospital San Agustín, Aviles, Spain. <sup>8</sup>Neurology Department, Hospital Alvarez-Buylla, Mieres, Spain. <sup>9</sup>Neurology Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. <sup>10</sup>Department of Genetics, Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain. <sup>11</sup>HGenetics Unit, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain. <sup>12</sup>Genetics Department, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain. <sup>13</sup>Genetics Unit, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain.

## Authors' contributions

All the authors contributed to this work by recruiting the patients, obtaining the clinical and analytical information, or performing the laboratory work. VA designated the work and analyzed the results. VA, ES-F, CB, M, BA, and AIC performed all the genetic analysis. VA and EC wrote the manuscript. All authors have read and approved the submission of this manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 9 June 2010 Accepted: 8 October 2010

Published: 8 October 2010

## References

- Harding AE: Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983, 1:1151-1155.
- Stevanin G, Ruberg M, Brice A: Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008, 8:198-210.
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT: Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 2008, 7:1127-38.
- Dursun U, Koroglu C, Kocayoy Orhan E, Ugur SA, Tolun A: Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1. *Neurogenetics* 2009, 10:325-31.
- Errico A, Ballabio A, Rugarli E: Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet* 2002, 11:153-63.
- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C: Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest* 2010, 120:1097-110.
- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Craud C, Bönsch D, et al: Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 2000, 9:637-44.
- Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bönsch D, Schöls L, Visbeck A, et al: Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat* 2002, 20:127-32.
- Patrono C, Scarano V, Cricchi F, Melone MA, Chiriaco M, Napolitano A, et al: Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: DHPLC-based mutation analysis of SPG4 reveals eleven novel mutations. *Hum Mutat* 2005, 25:506.
- Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, et al: Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *ArchNeurol* 2006, 63:750-5.
- Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, Bricka B, Poëa-Guyon S, Fontaine B, et al: Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and



<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/10/89>

- their spectrum is different from that observed in familial cases. *J Med Genet* 2006, **43**:259-65.
12. Shoukier M, Neesen J, Sauter SM, Argyriou L, Doerwald N, Pantakani DV, et al: Expansion of mutation spectrum, determination of mutation cluster regions and predictive structural classification of SPAST mutations in hereditary spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet* 2009, **17**:187-94.
  13. Beetz C, Nygren AO, Schickel J, Auer-Grumbach M, Bürk K, Heide G, et al: High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2006, **67**:1926-30.
  14. Depienne C, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Ribai P, Feki I, et al: Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 2007, **44**:281-284.
  15. Erichsen AK, Inderhaug E, Mattingsdal M, Eiklid K, Tallaksen CM: Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol* 2007, **14**:809-14.
  16. Mitne-Neto M, Kok F, Beetz C, Pessoa A, Bueno C, Graciani Z, et al: A multi-exonic SPG4 duplication underlies sex-dependent penetrance of hereditary spastic paraplegia in a large Brazilian pedigree. *Eur J Hum Genet* 2007, **15**:1276-1279.
  17. Patrono C, Casali C, Tessa A, Cricchi F, Fortini D, Carrozzo R, et al: Missense and splice site mutations in SPG4 suggest loss-of-function in dominant spastic paraplegia. *J Neurol* 2002, **249**:200-5.
  18. Charvin D, Cifuentes-Diaz C, Fonknechten N, Joshi V, Hazan J, Melki J, et al: Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet* 2003, **12**:71-8.
  19. Solowska J, Garbern JY, Baas PW: Evaluation of loss of function as an explanation for SPG4-based hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 2010, **19**:1-13.
  20. Namekawa M, Muriel MP, Janer A, Latouche M, Dauphin A, Debeir T, et al: Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis. *Mol Cell Neurosci* 2007, **35**:1-13.
  21. Muriel MP, Dauphin A, Namekawa M, Gervais A, Brice A, Ruberg M: Atlastin-1, the dynamin-like GTPase responsible for spastic paraplegia SPG3A, remodels lipid membranes and may form tubules and vesicles in the endoplasmic reticulum. *J Neurochem* 2009, **110**:1607-1616.
  22. Sauter SM, Engel W, Neumann LM, Kunze J, Neesen : Novel mutations in the Atlastin gene (SPG3A) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the SPG3A locus. *Hum Mutat* 2004, **23**:98.
  23. Ivanova N, Clacys KG, Deconinck T, Litvinenko I, Jordanova A, Auer-Grumbach M, et al: Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy. *Arch Neurol* 2007, **64**:706-13.
  24. Abel A, Fonknechten N, Hofer A, Dürr A, Cruaud C, Voit T, et al: Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics* 2004, **5**:239-43.
  25. Dürr A, Camuzat A, Colin E, Tallaksen C, Hannequin D, Coutinho P, et al: Atlastin1 mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2004, **61**:1867-72.
  26. Namekawa M, Ribai P, Nelson I, Forlani S, Fellmann F, Goizet C, et al: SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology* 2006, **66**:112-4.
  27. Tallaksen CM, Dürr A, Brice A: Recent advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr Opin Neurol* 2001, **14**:457-463.
  28. Randall LP, Coldham NG, Woodward MJ: Detection of mutations in *Salmonella enterica* gyrA, gyrB, parC and parE genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**:619-23.
  29. Svenson IK, Kloos MT, Gaskell PC, Nance MA, Garbern JY, Hisanaga S, et al: Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations. *Neurogenetics* 2004, **5**:157-64.
  30. Proukakis C, Auer-Grumbach M, Wagner K, Wilkinson PA, Reid E, Patton MA, et al: Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene. *Hum Mutat* 2003, **21**:170.
  31. McDermott CJ, Burness CE, Kirby J, Cox LE, Rao DG, Hewamadduma C, et al: Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation. *Neurology* 2006, **67**:45-51.
  32. Coutinho P, et al: Novel SPG3A and SPG4 mutations in dominant spastic paraplegia families. *Acta Neurol Scand* 2009, **119**:113-8.
  33. Raimier S, Sher C, Reish O, Thomas D, Fink JK: De novo occurrence of novel SPG3A/atlastin mutation presenting as cerebral palsy. *Arch Neurol* 2006, **63**:445-447.
  34. Scuderi C, Fichera M, Calabrese G, Elia M, Amato C, Savio M, Borgione E, et al: Posterior fossa abnormalities in hereditary spastic paraparesis with spastin mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009, **80**:440-443.
  35. Molon A, Montagna P, Angelini C, Pegoraro E: Novel spastin mutations and their expression analysis in two Italian families. *Eur J Hum Genet* 2003, **11**:710-713.
  36. Svenson IK, Ashley-Koch AE, Gaskell PC, Riney TJ, Cumming WJ, Kingston HM, et al: Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 2001, **68**:1077-85.
  37. Riveira-Munoz E, Chang Q, Godefroid N, Hoenderop JG, Bindels RJ, Dahan K, et al: Transcriptional and functional analyses of SLC12A3 mutations: new clues for the pathogenesis of Gitelman syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007, **18**:1271-83.
  38. Coto E, Arriba G, Garcia-Castro M, Santos F, Corao AI, Diaz M, et al: Clinical and analytical findings in Gitelman's syndrome associated with homozygosity for the c.1925 G>A SLC12A3 mutation. *Am J Nephrol* 2009, **30**:218-21.
  39. Vidal R, Frangione B, Rostagno A, Mead S, Révész T, Plant G, et al: A stop-codon mutation in the BRL gene associated with familial British dementia. *Nature* 1999, **399**:776-81.
  40. D'Amico A, Tessa A, Sabino A, Bertini E, Santorelli FM, Servidei S: Incomplete penetrance in an SPG3A-linked family with a new mutation in the atlastin gene. *Neurology* 2004, **62**:2138-9.
  41. Chinnery PF, Keers SM, Holden MJ, Ramesh V, Dalton A: Infantile hereditary spastic paraparesis due to codominant mutations in the spastin gene. *Neurology* 2004, **63**:710-2.
  42. Bertelli M, Cecchin S, Lorusso L, Sidoti V, Fabbri A, Lapucci C, et al: Identification of a novel mutation in the spastin gene (SPG4) in an Italian family with hereditary spastic paresis. *Panminerva Med* 2006, **48**:193-7.
  43. Tang B, Zhao G, Xia K, Pan Q, Luo W, Shen L, Long Z, et al: Three novel mutations of the spastin gene in Chinese patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2004, **61**:49-55.
  44. Park SY, Ki CS, Kim HJ, Kim JW, Sung DH, Kim BJ, et al: Mutation analysis of SPG4 and SPG3A genes and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2005, **62**:1118-1121.
  45. Braschinsky M, Tamm R, Beetz C, Sacher-Ferrero E, Raukas E, Lüüs SM, et al: Unique spectrum of SPAST variants in Estonian HSP patients: presence of benign missense changes but lack of exonic rearrangements. *BMC Neurol* 2010, **10**:17.
  46. Meijer IA, Hand CK, Cossette P, Figlewicz DA, Rouleau GA: Spectrum of SPG4 mutations in a large collection of North American families with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2002, **59**:281-286. 47. Wilkinson PA, Hart PE, Patel H, Warner TT, Crosby AH: SPG3A mutation screening in English families with early onset autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci* 2003, **216**:43-45.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here: <http://www.biomedcentral.com/1471-2377/10/89/prepub>

doi:10.1186/1471-2377-10-89

Cite this article as: Álvarez et al: Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurology* 2010 **10**:89.





## Short Report

# *SPG7* mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V

Sánchez-Ferrero E, Coto E, Beetz C, Gámez J, Corao A, Díaz M, Esteban J, del Castillo E, Moris G, Infante J, Menéndez M, Pascual-Pascual SI, López de Munaín A, Garcia-Barcina MJ, Alvarez V on behalf of the Genetics of Spastic Paraplegia study group. *SPG7* mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V.

Clin Genet 2012. © John Wiley & Sons A/S, 2012

Mutations in the *SPG7* gene were initially reported in patients with autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (HSP). Recent works suggested a dominant effect for some *SPG7* mutations. To characterize the *SPG7* mutational spectrum in a large cohort of Spanish HSP patients, we sequenced the whole *SPG7* gene in a total of 285 Spastic Paraplegia patients. Large gene rearrangements were also ascertained in some patients. We found a total of 14 *SPG7* mutations (12 new) in 14 patients; 2 were large deletions. All the mutation carriers had an adult onset age but only five (35%) had a complicated phenotype. We identified a single mutation in 13 patients. Familial analysis suggested a dominant inheritance for one (p.Leu78\*) of these mutations. Carriers of the rare p.A510V variant were significantly more frequent in patients vs healthy controls (3% vs 1%), suggesting a pathogenic role for this *SPG7* variant. We reported a high frequency of patients with only one *SPG7* mutation, and a putative pathogenic role for the p.A510V variant.

### Conflict of interest

All the authors declare no conflicts of interest related to this work, including personal relationships, interests, and affiliations over the past 3 years.

**E Sánchez-Ferrero<sup>a</sup>, E Coto<sup>b</sup>, C Beetz<sup>b</sup>, J Gámez<sup>c</sup>, Al Corao<sup>a</sup>, M Díaz<sup>a</sup>, J Esteban<sup>d</sup>, E del Castillo<sup>e</sup>, G Moris<sup>f</sup>, J Infante<sup>g</sup>, M Menéndez<sup>h</sup>, SI Pascual-Pascual<sup>i</sup>, A López de Munaín<sup>j</sup>, MJ Garcia-Barcina<sup>k</sup> and V Alvarez<sup>a</sup> on behalf of the Genetics of Spastic Paraplegia study group\***

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Genetics-Genetic Unit, Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>b</sup> Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital Jena, Jena, Germany, <sup>c</sup> Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, VHIR Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>d</sup> Department of Neurology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, <sup>e</sup> Genetics Unit, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain, <sup>f</sup> Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, <sup>g</sup> Department of Neurology, Hospital Universitario M de Valdecilla, Santander, Spain, <sup>h</sup> Department of Neurology, Hospital Alvarez-Buylla, Mieres, Spain, <sup>i</sup> Department of Pediatric Neurology, University Hospital La Paz, Madrid, Spain, <sup>j</sup> Department of Neurology, Hospital Donostia-Instituto Bionostia-Ciberned, San Sebastián, Spain, and <sup>k</sup> Department of Genetics, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain

\* See Appendix.

Key words: hereditary spastic paraplegia – mutation – paraplegin

Corresponding author: Dra. Victoria Alvarez, Laboratory of Molecular Genetics-Genetic Unit, Laboratorio de

Medicina, Hospital Universitario  
Central de Asturias, 33006-Oviedo,  
Spain.  
Tel.: +34 985 10 79 68;  
fax: 34 985 10 79 68; e-mail:  
victoria.alvarez@sespa.princast.es

Received 1 March 2012, revised and  
accepted for publication 1 May 2012

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is characterized by progressive corticospinal fibers degeneration that leads to a progressive lower limb spasticity and pyramidal weakness. HSP is clinically heterogeneous, with complicated and pure forms (1, 2).

At least 46 HSP loci have been mapped (3–6). In approximately 80% of the cases the disease segregates in an autosomal dominant way. Autosomal recessive (AR) HSP seems to be more common in regions with high rates of consanguineous marriages (7). To date, at least 19 ARHSP loci have been identified, and seven genes characterized (2, 5, 6, 8, 9). *SPG7* maps on chromosome region 16q24.3 and encodes paraplegin, a protein that belongs to the AAA (ATPase associated with diverse cellular activities) superfamily (10). Paraplegin is a component of the mitochondrial inner membrane protease which activity is impaired in HSP patients, resulting in a reduction of complex I activity with increased sensitivity to oxidant stress (11, 12).

Mutations in *SPG7* are responsible for 1.5–4.5% of ARHSP cases with both, pure and complicated phenotypes (13–18). However, this frequency was derived from families with a clear AR inheritance and could be underestimated because apparently sporadic cases could also harbor *SPG7* mutations. To date, >30 *SPG7* mutations have been found (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html>). Our aim was to contribute to better understand the role of this gene in HSP. For this purpose, we defined the *SPG7* mutational spectrum and the associated phenotypes in a large cohort of Spanish HSP patients.

## Patients and methods

### Patients and controls

A total of 285 non-related HSP patients (mean onset age 28 years, range 1–77, mean disease duration 28 years) were recruited through the Neurology Departments of several reference hospitals from Spain. HSP was diagnosed based on the Harding criteria (1). Diseases that might mimic spastic paraplegia were excluded (2). All the patients were negative for *SPAST/SPG4* and *ATLI/SPG3A* mutations (19). A total of 174 (61%) had a pure-HSP phenotype and 111 (39%) were complicated cases with ataxia and magnetic resonance imaging changes (cerebellar atrophy) as the most frequent findings. All the patients were asked about the existence of other affected relatives. In 34 (12%), a recessive inheritance was suspected, while 251 patients

were classified as ‘apparently’ sporadic because they did not have a recognized family history of HSP. However, no first degree relatives were evaluated to exclude the existence of unrecognized symptoms of spastic paraplegia. All the patients (or their guardians) signed an informed consent, approved by the Ethical Committees.

### *SPG7* sequencing

The 17 *SPG7* coding exons and intron boundaries were polymerase chain reaction (PCR) amplified with primers that matched the flanking introns (Table S1). PCR fragments were purified and sequenced using BigDye chemistry in an ABI3130xl analyzer (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were compared with the reference sequence (ENSG00000197912 for the genomic; ENST00000268704 for the transcript; [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

All the new putative mutations (nucleotide changes not previously reported as *SPG7* mutations or polymorphisms) were screened in 400 controls (all Spanish Caucasians) through restriction enzyme digestion of PCR fragments (PCR-RFLP) or single-strand conformation analysis. These controls were healthy individuals aged 21–65 years, recruited through the Blood Bank of Hospital Universitario Central de Asturias. Allele and genotype frequencies were compared (patients vs controls) through a chi-squared test.

The sorting intolerant from tolerant (sift) v.2 (<http://sift-jcvi.org>) and Polymorphism Phenotyping (Polyphen) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) programs were used to estimate the putative effect of amino acid changes on protein function. We considered the nucleotide missense changes to be likely a causative mutation when it was absent or significantly less frequent among the controls (p.A510Val).

### MLPA analysis

In patients with ARHSP who were negative for *SPG7* mutations ( $n = 32$ ) or had only one identified mutation ( $n = 11$ ) we determined the presence of *SPG7* copy number variants through a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay (Salsa Kit P213; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). MLPA was also performed in the patients who were Val 510 carriers.

### **SPG7 transcript analysis**

To determine the effect of some *SPG7* mutations on pre-mRNA splicing, cDNA was synthesized from mRNA obtained from leukocytes and amplified with primers that matched the exons. These PCR products were purified and sequenced to define the effect on the transcript.

### **Results**

#### *SPG7* mutations and associated phenotype

We identified 14 *SPG7* mutations (12 non-previously reported) in 14 patients (Table 1; Fig. 1). These were missense changes that would affect the function of paraplegin ( $n = 5$ ), nonsense ( $n = 4$ ), frameshifting insertions/deletions ( $n = 2$ ), and splicing ( $n = 1$ ) mutations. We also found two gross deletions (Fig. S1). Mutation c.376G > C was in the last nucleotide of exon 3 and affected pre-mRNA splicing (Fig. S2). Several *SPG7* nucleotide changes were classified as polymorphisms or variants of uncertain effect (Table S2).

The c.233T >A (p.Leu78\*) was the only mutation found in a gypsy patient (HSP296) with a pure-HSP and an onset age of 20 (Fig. S2). No large *SPG7* deletion was found in this patient. We also excluded mutations (sequencing and MLPA) in *SPAST/SPG4*, *ATLI/SPG3A*, *SPG31* and *SPG6*, all linked to dominant forms of HSP. This patient was initially classified as apparently sporadic because no relative had been diagnosed with spastic paraplegia. However, clinical examination showed that the proband's mother and aunt (aged 32 and 48 years) had symptoms of pure spastic paraplegia. The two were c.233T >A homozygotes. In this case, the presence of only one *SPG7* mutated copy should be enough to manifest spastic paraplegia but the family tree suggested an incomplete penetrance for the p.L78\*. It was not possible to analyze other individuals from this family to confirm this hypothesis.

#### *SPG7* A510V

The p.Ala510Val was found in eight patients (one homozygous) and three controls (3% vs <1%;  $p < 0.001$ ). The control's frequency was in agreement with the data from the 1000 genomes and the NHLBI exome sequencing projects (<1%). The three healthy controls were 25, 36, and 86 years old. Carriers of this rare variant were also more frequent among patients with a *SPG7* mutation (4/14 = 29%) compared to patients without mutations (4/271 = 1.5%). Moreover, in the four cases with a *SPG7* mutation the familial segregation showed that 510 Val and the mutation were in different chromosomes (Fig. 2). These findings, in addition to the predicted effect on protein function (sift score 0; Polyphen PSIC score difference 2.16) suggested that 510 Val might contribute to the pathogenesis of HSP.

#### Clinical phenotype of *SPG7* mutation carriers

The mean age at onset for *SPG7* mutation carriers was 35 years ( $\pm 11$ ) and 9 (65%) had a pure spastic paraplegia phenotype. Cerebellar involvement (manifesting as dysarthria, dysphagia, nystagmus, and/or ataxic gait) was the most frequent additional feature in patients with a complicated phenotype (Table S3).

### **Discussion**

We report the first *SPG7* mutational spectrum in a large cohort of HSP patients from Spain. *SPG7* deletions have been rarely reported, but our frequency (2/14, 14%) suggested that large deletions should be excluded in order to improve the diagnosis and the genetic counselling. The frequencies of mutation carriers among total patients (5%), ARHSP cases (9%), and apparently sporadic cases (4%) were similar to the reported by others. In addition, only one of our patients was compound heterozygous, a feature characteristic of *SPG7* (14–18).

Previous studies suggested that *SPG7* should be analyzed when an ARHSP inheritance was suspected and the disease manifested as adult onset spastic paraplegia with a complicated phenotype (13, 15, 18). Our findings challenged this concept. In our cohort, all the mutation carriers had an adult onset age but only five (35%) had a complicated phenotype. Also, most of the *SPG7* mutation carriers were heterozygous carriers (the presence of a copy number variant as the second mutation was excluded in all these patients). Other authors have reported cases with one *SPG7* mutation, but most did not search for large insertions/deletions. An exception was the recent work by Schlipf et al. on 187 index cases with apparently sporadic or recessive spastic paraplegia (14). These authors found two *SPG7* mutations in seven patients (3.7%) including three carriers of an indel mutation, while seven patients had only one mutation or two *SPG7* variants of uncertain or unlikely pathogenicity.

One of our families provided direct evidence for a dominant effect of one *SPG7* mutation. The nonsense p.Leu78\* was the only found in a patient whose mother and aunt were homozygotes for this mutation. The three were affected at a similar onset age and showed a pure spastic paraplegia. This mutation had been previously found in two apparently unrelated Italian families in which heterozygous carriers were asymptomatic. These findings suggested that some *SPG7* mutations could be associated to variable penetrance, and could result in disease symptoms among single mutation carriers. Although we excluded the presence of *SPG7* large rearrangements we cannot rule out that our patient had a second mutation in non-analyzed *SPG7* regions (i.e. the promoter, internal exon sequences). A mutation in a second HSP gene (with the exception of *SPAST/SPG4*, *ATLI/SPG3A*, *REEPI/SPG31* and *NIPA1/SPG6*) could also act in synergy with the *SPG7* mutations to render a disease phenotype. However, recent studies that showed alterations in the cerebral

Table 1. Patients with *SPG7* mutations and Ala510Val carriers in the Spanish HSP cohort<sup>a</sup>

Patient	Age at onset (years)	Phenotype	Location	Nucleotide change	Amino acid change	Protein domain	References
HSP36	39	ASPHSP-pure	Compound heterozygous (two <i>SPG7</i> mutations) carriers Exon 8 Exon 13	c.1061G>C c.1715C>T	p.Gly354Ala p.Ala572Val	AAA+ Peptidase M41	This study (17)
HSP40	44	ASPHSP-pure	Exon 15	c.1987A>T	p.Lys663*	Peptidase M41	This study
HSP48	32	ASPHSP-complicated	Exon 5	c.661A>T	p.Lys221*	FtSH	This study
HSP173	52	ASPHSP-pure	Exon 9	c.1198C>T	p.Arg400Trp	AAA+	This study
HSP244	29	ASPHSP-pure	Exon 8	c.1044_1045insGCT	p.Leu348_Gly349insLeu	AAA+	This study
HSP260	39	ASPHSP-pure	Exon 12	c.1645G>A	p.Val549Met	Peptidase M41	This study
HSP296	20	ADHSP-pure	Exon 2	c.233T>A	p.Leu78*	N-terminal	(18)
HSP312	40	ASHSP-pure	Exon 6	c.773_774delTG	p.Val258Glyfs* 30	FtSH	This study
HSP370	18	ARHSP-pure	Exons 1–5	c.1-?_757+?del	p.Met1_Asn253delfs* 35	N-terminal to FtSH	This study
HSP416	25	ARHSP-complicated	Exon 3	c.376G>C	p.Glu126Argfs* 5	N-terminal	This study
HSP240	26	ARHSP-complicated	Compound heterozygous of one <i>SPG7</i> mutation and the Ala510Val variant Exon 3	c.376G>C	p.Glu126Argfs* 5	N-terminal	This study
HSP365	36	ASPHSP-pure	Exon 11 Exon 15	c.1529C>T c.1982T>C	p.Ala510Val p.Met661Thr	$\alpha$ -Helix Peptidase M41	rs61755320 This study
HSP402	48	ARPHSP-complicated	Exon 11 Exons 2–9	c.1529C>T c.184-?_1324+?del	p.Ala510Val p.Ser62_Asp441delfs* 24	$\alpha$ -Helix N-terminal to AAA+	rs61755320 This study
HSP503	50	ASPHSP-complicated	Exon 11 Exon 13	c.1529C>T c.1777A>T	p.Ala510Val p.Lys593*	$\alpha$ -Helix Peptidase M41	rs61755320 This study
HSP53	47	ASHSP-pure	Exon 11	c.1529C>T	p.Ala510Val (heterozygous)	$\alpha$ -Helix	rs61755320
HSP184	1	ASPHSP-complicated	Exon 11	c.1529C>T	p.Ala510Val (heterozygous)	$\alpha$ -Helix	rs61755320
HSP331	44	ASPHSP-pure	Exon 11	c.1529C>T	p.Ala510Val (heterozygous)	$\alpha$ -Helix	rs61755320
HSP411	50	ASPHSP-complicated	Exon 11	c.1529C>T	p.Ala510Val (homozygous)	$\alpha$ -Helix	rs61755320

ADHSP, autosomal dominant spastic paraplegia; ARHSP, autosomal recessive spastic paraplegia; ASHSP, apparently sporadic spastic paraplegia (including siblings with healthy parents); HSP, hereditary spastic paraplegia.

<sup>a</sup>All the DNA variants were named following the guidelines of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

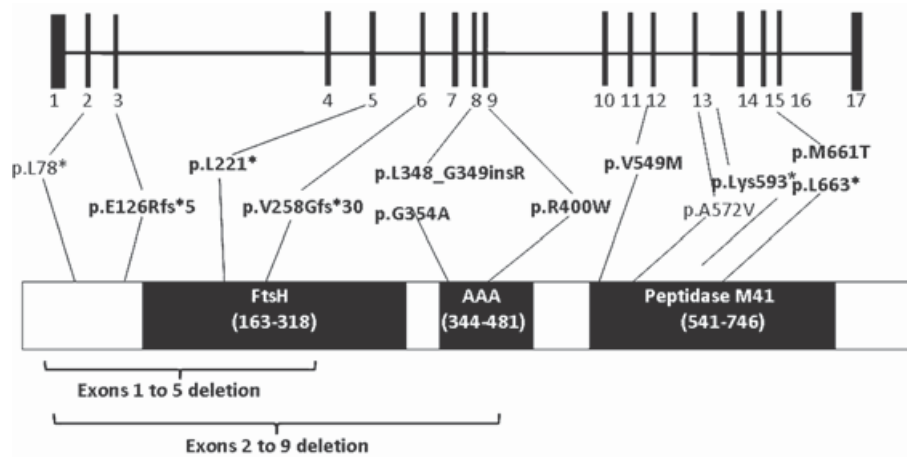


Fig. 1. SPG7 domains showing the location of the mutations. The one letter code was used to identify the amino acid changes. Novel mutations are in bold.

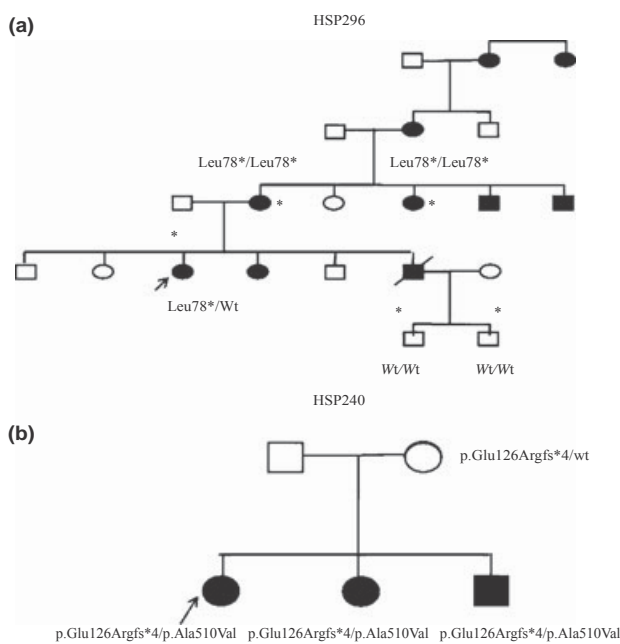


Fig. 2. (a) Tree of the family with the L78\* mutation. The proband's (arrow) mother and aunt, both affected, were homozygous for the mutation. No other SPG7 mutation (including large deletion) was found in the proband. The three patients were also negative for mutations in the SPAST/SPG4, ATLI/SPG3A, SPG31 and SPG6 genes. \*Individuals available for the genetic study. (b) HSP 240 was heterozygous for both, c.376G > C and the rare p.Ala510Val variant. Familial segregation showed that the two variants were in different chromosomes. The three siblings who were carriers of the two SPG7 variants were the only affected.

white matter from corpus callosum of asymptomatic heterozygote SPG7 mutation carriers supported a dominant inheritance with variable penetrance pattern for this gene (20).

Finally, p.Ala510Val was initially reported as a rare polymorphism. This was in a highly conserved region and the *in silico* analysis predicted an effect on protein structure. Yeast complementation assays showed that this missense change would perturb the

proteolytic function of the hetero-oligomeric m-AAA protease (21). In agreement with a putative pathogenic role, the 510Val was significantly more frequent among our patients compared to controls. In addition, in the four patients with *bona fide* SPG7 mutations who were also 510 Val carriers the two alleles segregated independently. These observations strongly suggest that p.Ala510Val might contribute to the pathogenesis of HSP or constitute a negative disease modifier. Population studies to determine the risk of developing symptoms of spasticity among 510 Val carriers at different ages should be of special interest.

In conclusion, our work supported a dominant effect for some SPG7 mutations. We also provided strong evidence of a pathogenic role for the rare p.Ala510Val variant. Detailed clinical and genetic data of single heterozygous carrier family members should be necessary to test the hypothesis that mixed dominant and recessive inheritance characterize SPG7.

### Supporting Information

The following Supporting information is available for this article: Fig S1.(a) Histogram of the MLPA from the HSP402 patient showing the deletion of exons 2 – 9 of SPG7. (b) Amplification of cDNA with primers that matched exons 1 and 10 (lanes: 1 = negative control, 2 = genomic DNA, 3 and 4 = negative control cDNA, 5 = cDNA with exons 2–9 deletion). (c) Sequence of the fragment amplified from the patient's cDNA.

Fig S2.(a) Genomic sequence of a non-carrier, heterozygous carrier, and homozygous carrier for the p.L78\* mutation. (b) (i) The c.376G > C variant was in the last nucleotide of exon 3 and was predicted to reduce the score of the splicing consensus site (bioinformatic analysis with the Human Splicing Finder v. 2.4; <http://www.umd.be/SSF>). This nucleotide change could thus result in an aberrant mRNA sequence. (ii) This was confirmed in mRNA isolated from blood leukocytes. The SPG7 cDNA was amplified with primers that matched exons 3 and 4. The putative mutation resulted in an aberrantly processed pre-mRNA, with a transcript that contained a 23-bp insertion and a premature stop codon.

Table S1. Sequences of the forward (F) and reverse (R) primers used to amplify the *SPG7* gene and cDNA.

Table S2. *SPG7* polymorphisms or variants with unknown effect. Table S3. Clinical characteristics of *SPG7* mutation carriers. Additional Supporting information may be found in the online

version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## Acknowledgements

This study was supported by PI08/0915 to V. A. and PI 10/01970 to J. G. E. S-F. is the recipient of a predoctoral fellowship from Fundació para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT).

Author contributions: All the authors contributed to this work by recruiting the patients, obtaining the clinical and analytical information, or performing the laboratory work. V. A. designated the work and analyzed the results. V. A., E. S-F, C. B., M. D., and A. I. C. performed all the genetic analysis. V. A. and E. C. wrote the manuscript. J. G., J. E., J. F. G., G. M., J. I., M. M., S. I. P-P., A. L. M., M. J. G., E. C., and C. M. recruited the patients and obtained the clinical and anthropometric data. All the authors read and approved the submission of the manuscript.

## References

1. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983; 1 (8334): 1151 – 1155.
2. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; 6 (1): 65 – 76.
3. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 2008; 7 (12): 1127–1138.
4. Dick KJ, Eckhardt M, Paisan-Ruiz C et al. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat* 2010; 31 (4): E1251–E1260.
5. Dursun U, Koroglu C, Kocasoy Orhan E, Ugur SA, Tolun A. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG45) with mental retardation maps to 10q24.3-q25.1. *Neurogenetics* 2009; 10 (4): 325 – 331.
6. Boukhris A, Feki I, Elleuch N et al. A new locus (SPG46) maps to 9p21.2-q21.12 in a Tunisian family with a complicated autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with mental impairment and thin corpus callosum. *Neurogenetics* 2010; 11 (4): 441–448.
7. Polo JM, Calleja J, Combarros O, Berciano J. Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain* 1991; 114 (Pt 2): 855–866.
8. Stevanin G, Azzedine H, Denora P et al. Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus

- callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain* 2008; 131 (Pt 3): 772–784.
9. Hanein S, Martin E, Boukhris A et al. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 82 (4): 992–1002.
10. De Michele G, De Fusco M, Cavalcanti F et al. A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet* 1998; 63 (1): 135–139.
11. Atorino L, Silvestri L, Koppen M et al. Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 2003; 163 (4): 777–787.
12. Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 2005; 123 (2): 277–289.
13. Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S et al. Paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 1998; 93 (6): 973–983.
14. Schlipf N, Schule R, Klimpe S et al. Amplicon-based high-throughput pooled sequencing identifies mutations in CYP7B1 and SPG7 in sporadic spastic paraplegia patients. *Clin Genet* 2011; 80 (2): 148–160.
15. Elleuch N, Depienne C, Benomar A et al. Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2006; 66 (5): 654–659.
16. McDermott CJ, Dayaratne RK, Tomkins J et al. Paraplegin gene analysis in hereditary spastic paraparesis (HSP) pedigrees in northeast England. *Neurology* 2001; 56 (4): 467–471.
17. Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C et al. A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia. *Brain* 2004; 127 (Pt 5): 973–980.
18. Arnoldi A, Tonelli A, Crippa F et al. A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat* 2008; 29 (4): 522–531.
19. Alvarez V, Sánchez-Ferrero E, Beetz C et al. Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol* 2010; 10: 89.
20. Warnecke T, Duning T, Schirmacher A et al. A novel splice site mutation in the SPG7 gene causing widespread fiber damage in homozygous and heterozygous subjects. *Mov Disord* 2010; 25 (4): 413–420.
21. Bonn F, Pantakani K, Shoukier M, Langer T, Mannan AU. Functional evaluation of paraplegin mutations by a yeast complementation assay. *Hum Mutat* 2010; 31 (5): 617–621.

## Appendix

Members of the Genetics of Spastic Paraplegia study group: Manuel Amorín, Concepción Alonso-Cerezo, Carmen Benito, Irene Catalina-Álvarez, Eduardo Gutiérrez-Rivas, Pia Gallano, Rosario Marín, Celedonio Márquez, José L. Muñoz-Blanco, and Jordi Rosell.



## Mitochondrial DNA polymorphisms/haplogroups in hereditary spastic paraplegia

Elena Sánchez-Ferrero · Eliecer Coto · Ana I. Corao · Marta Díaz · Josep Gámez · Jesús Esteban · Juan F. Gonzalo · Samuel I. Pascual-Pascual · Adolfo López De Munain · Germán Morís · Jon Infante · Emilia Del Castillo · Celedonio Márquez · Victoria Álvarez

Received: 5 May 2011 / Accepted: 20 June 2011  
Springer-Verlag 2011

**Abstract** Mitochondrial dysfunction could contribute to the development of spastic paraplegia. Among others, two of the genes implicated in hereditary spastic paraplegia encoded mitochondrial proteins and some of the clinical features frequently found in these patients resemble those observed in patients with mitochondrial DNA (mtDNA) mutations. We investigated the association between common mtDNA polymorphisms and spastic paraplegia. The ten mtDNA polymorphisms that defined the common European haplogroups were determined in 424 patients, 19% with a complicated phenotype. A rare haplogroup was associated with the disease in patients without a SPG3A,

SPG4, or SPG7 mutation. Allele 10398G was more frequent among patients with a pure versus complicated phenotype. This mtDNA polymorphism was previously associated with the risk of developing other neurodegenerative diseases. In conclusion, some mtDNA polymorphisms could contribute to the development of spastic paraplegia or act as modifiers of the phenotype.

**Keywords** Spastic paraplegia · Mitochondria · Complicated phenotype · Haplogroups

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00415-011-6155-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

### Introduction

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is characterized by a progressive spasticity and weakness of the lower

E. Sánchez-Ferrero · E. Coto · A. I. Corao · M. Díaz · V. Álvarez (✉)  
Laboratory of Molecular Genetics, Laboratory of Medicine, Hospital Universitario Central de Asturias, 33006 Oviedo, Spain  
e-mail: victoria.alvarez@sespa.princast.es

J. Gámez  
Department of Neurology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universidad Autònoma, Barcelona, Spain

J. Esteban · J. F. Gonzalo  
Department of Neurology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

S. I. Pascual-Pascual  
Department of Pediatric Neurology, University Hospital La Paz, Madrid, Spain

A. L. De Munain  
Department of Neurology, Hospital Donostia-Instituto Biodonostia-Cibermed, San Sebastián, Spain

G. Morís  
Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

J. Infante  
Department of Neurology, Hospital Universitario M. Valdecilla, Santander, Spain

E. Del Castillo  
Genetics Unit, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain

C. Márquez  
Department of Neurology, Hospital Universitario V. Rocío, Sevilla, Spain

Published online: 02 July 2011

Table 1 Median age at the onset and age range, and frequency of pure and complicated phenotypes in total patients and patients according to the SPG mutations

SPG patients	Male	Median onset age	Age range in years	Family history (%)	Pure (%)	Complicated (%)
Total (N = 424)	220 (52%)		1–72	213 (50)	342 (81)	82 (19)
SPG4 (N = 67)	42 (63%)	32	1–66	56 (85)	59 (88)	8 (12)
SPG3A (N = 17)	5 (29%)	10	1–32	16 (94)	15 (88)	2 (12)
SPG7 (N = 13)	7 (54%)	32	20–52	5 (38)	9 (69)	4 (31)
No mutation (N = 327)	166 (51%)	28	1–72	136 (42)	259 (79)	68 (21)

extremities due to axonal degeneration in the pyramidal tract. The HSP phenotype is variable, from a “pure” form with spasticity as the only clinical finding to a “complicated” form when other clinical features (cerebellar ataxia, epilepsy, peripheral neuropathy, and dementia) are also present. The onset age of HSP ranges from early childhood to the eighth decade of life [1]. This phenotypic variability can be partly attributed to the fact that mutations at different loci/genes are responsible for the development of HSP [2, 3]. The existence of heterogeneity among patients with the same mutation suggested that some non-genetic and/or genetic factors act as modifiers of the phenotype.

Several lines of evidence supported a role for mitochondrial dysfunction on spastic paraplegia. Two of the HSP genes (SPG7 and SPG13) encode mitochondrial proteins (paraplegin and heat shock protein-60) [4]. Mitochondrial respiratory chain defects have been found in HSP patients [5–8]. A mitochondrial DNA (mtDNA) mutation (9176 T → C) was reported in a large family with maternally inherited, late-onset HSP [9]. Complicated HSP phenotypes resemble symptoms present in mitochondrial diseases, such as dementia, ataxia, optic atrophy, hearing loss, peripheral neuropathy, or dysphagia [10].

Common mtDNA polymorphisms define the mitochondrial haplogroups, and have been reported as modifiers of the phenotype in several diseases [11]. For instance, haplogroup H has been related to a lower age at onset of sporadic Huntington’s disease and certain haplogroups would modify the penetrance of mutations associated with Leber’s hereditary optic neuropathy (LHON) [12–15]. This effect is likely due to differences in the efficiency of the mitochondrial function, expressed as the ratio among ATP, heat, and reactive oxygen species (ROS) production between the different haplogroups [16–18]. Our aim was to determine whether common mtDNA polymorphisms/haplogroups were associated with HSP or act as modifiers of the phenotype in these patients.

## Methods

### Patients and controls

A total of 424 non-related Spanish index patients were studied (Table 1). All the patients were diagnosed with spastic paraplegia by a qualified neurologist, and the genetic study was requested to the Molecular Genetics Laboratory of Hospital Universitario Central Asturias. We also recruited a total of 300 healthy Caucasian controls (mean age 49 years; range 18–65; 55% male) from Spain. None of the controls had symptoms of spastic paraplegia or any other neurological disorder, although we did not perform clinical/analytical tests to exclude the existence of asymptomatic disease in any of them. The study was part of a research on the genetic basis of HSP approved by the Ethical Committee of HUCA and all the patients (or their tutors) and controls gave their informed consent to participate.

We searched for SPAST/SPG4 mutations in all the index cases. In patients who were negative for SPAST mutations and had autosomal dominant HSP or patients without a family history of HSP and onset age <20 years, we amplified and sequenced the 13 coding exons of ATLL1. Patients without a family history of HSP or with a recessive inheritance, negative for SPAST or ATLL1 mutations, were also studied for the SPG7 gene [19].

### mtDNA polymorphisms and haplogroups classification

A total of ten mtDNA single nucleotide polymorphisms (SNPs G1719A, G4580A, C7028T, G8251A, G9055A, A10398G, A12308G, G13368A, G13708A, G16391A) were determined in all the patients following a polymerase chain reaction-fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method (Supplementary Table 1) [20–22]. These SNPs defined the seven most common European mitochondrial haplogroups (Supplementary Table 2).

Table 2 Median age (range) and frequencies of pure versus complicated cases in the different haplogroups, patients with SPG3A, SPG4 or SPG7 mutations, and without mutations

Haplogroup	SPG3A, SPG4 or SPG7 mutation			No mutation			
	Mean age, years (range)	Pure (N = 83)	Complicated (N = 14)	Mean age, years (range)	Pure (N = 259)	Complicated (N = 68)	Family history (N = 257)
H	33 (1–66)	40 (0.80)	10 (0.20)	26 (1–72)	110 (0.76)	35 (0.24)	58 (0.40)
J	18 (1–34)	3 (0.60)	2 (0.40)	26 (2–54)	24 (0.92)	2 (0.08)	7 (0.27)
K	18 (1–43)	2 (0.67)	1 (0.33)	26 (2–57)	13 (0.81)	3 (0.19)	10 (0.63)
T	19 (2–54)	6 (0.86)	1 (0.14)	27 (1–63)	25 (0.80)	6 (0.20)	12 (0.39)
U	32 (16–39)	10	0	24 (1–65)	17 (0.65)	9 (0.35)	11 (0.42)
V	27 (5–53)	5	0	26 (2–65)	10 (0.83)	2 (0.17)	4 (0.33)
W	31 (18–45)	4	0	28 (2–50)	8	0	5 (0.63)
X	33 (14–54)	3	0	20 (1–60)	6 (0.86)	1 (0.14)	1 (0.14)
I	35	1	0	0	0	0	0
Other	23 (1–66)	9	0	38 (1–67)	46 (0.82)	10 (0.18)	27 (0.48)

### Statistical analysis

Haplogroup and allele frequencies were compared between the groups through a chi-squared test, and a  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. The statistical power was calculated online (<http://statpages.org/proppowr.html>). Because the age at the onset (AO) did not fit a normal distribution ( $p < 0.001$ , Kolmogorov–Smirnov test) we used the Mann–Whitney U-test to compare the difference in median AO between the groups. A multivariate logistic regression was used to determine the effect of haplogroups/SNPs on the phenotype after correcting by age, sex, and family history of the disease.

### Results

A total of 82 patients (19%) had a complicated HSP, with peripheral neuropathy, cerebellar or cerebral atrophy, mental retardation, nystagmus, and dysarthria as the most common findings. The median AO was 27 years (range 1–77). A SPG3A, SPG4 or SPG7 mutation was found in 97 of the patients (23%) (Table 1). The frequencies of mitochondrial haplogroups are presented in Table 2. In patients with a SPG mutation we did not find significant differences in the median AO and the frequency of complicated phenotypes between the haplogroups.

We found a total of 19 allele combinations in the 327 patients without a SPG mutation. None of the common haplogroup frequencies were significantly different between these patients and the controls (Supplementary Table 2). However, a rare haplogroup defined by alleles 1719G-4580G-7028T-8251G-9055G-10398A-12308A-13368G-13708G-16391G was significantly more frequent among the patients (8% vs. 2%;  $p = 0.001$ ; OR = 3.77)

and could thus contribute to the risk of developing spastic paraplegia in our population (Supplementary Table 2). We compared the allele frequencies for the nine SNPs between controls and patients without a SPG mutation (Table 3). None of the alleles were significantly associated with the disease in our population.

None of the haplogroups were significantly associated with the development of a complicated phenotype (Table 2). A complicated phenotype was less frequent among 10398G patients (Table 3). This SNP remained significantly associated to this phenotype after correcting by age, sex, and family history ( $p = 0.04$ ).

### Discussion

Mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and LHON, among others. Several evidences also suggested a relationship between mitochondrial dysfunction and HSP. Among others, the mtDNA mutation m.9176 T → C was recently found in a large HSP-family, and some of the nuclear HSP-genes encode mitochondrial proteins [9, 23]. A mutation in the mitochondrial poly(A) RNA polymerase gene (MTPAP) that resulted in severely truncated mitochondrial mRNAs was recently found in an Amish family in which multiple children were affected by a slowly progressive autosomal-recessive spastic paraparesis with cerebellar ataxia (limb and truncal), dysarthria, and optic atrophy, among other manifestations [24]. On the other hand, the symptoms seen in cases with complicated HSP resemble those found in patients with mitochondrial disorders [4, 8, 10]. The hypothesis of mtDNA variants as modifiers of the phenotype among

Table 3 Minor allele frequencies (MAF) in controls and patients without a SPG mutation, and frequencies of complicated cases and mean onset ages among patients with the MAF and the common allele

Polymorphism	MAF in Controls (N = 300)	MAF in patients No mut (N = 327)	Complicated MAF/common allele	Median age (years) MAF versus common allele
G1719A	6 (0.02)	7 (0.02)	0.14/0.21	20 versus 28
G4580A	15 (0.05)	12 (0.04)	0.17/0.22	26 versus 28
C7028T	140 (0.47)	148 (0.45)	0.24/0.18	27 versus 29
G8251A	12 (0.04)	5 (0.02)	0/0.21	34 versus 27
G9055A	27 (0.09)	21 (0.06)	0.19/0.21	27 versus 28
A10398G	66 (0.22)	55 (0.17)	0.11/0.23	29 versus 27
A12308G	57 (0.19)	52 (0.16)	0.27/0.20	27 versus 28
G13368A	29 (0.10)	35 (0.11)	0.17/0.21	31 versus 27
G13708A	33 (0.11)	31 (0.09)	0.10/0.22	29 versus 27
G16391A	4 (0.01)	9 (0.03)	0.11/0.21	27 versus 28

A10398G: complicated versus pure, MAF:  $p = 0.048$ , OR = 0.41 (0.17–1.01)

HSP patients was thus plausible based in these and other evidences.

The frequencies of the nine common haplogroups in the HSP patients did not differ from the frequencies reported in our general population [20–22]. A rare SNP combination (defined as the other-5 haplogroup in Supplementary Table 2) was significantly more frequent among the patients, suggesting an effect on the risk of developing spastic paraplegia. The sequencing of the whole mtDNA in patients with this haplogroup should be necessary to determine whether it harbors some functional variant that could explain the association with the disease.

Allele 10398G was more frequent among patients with pure versus complicated phenotype. Because 10398G defines haplogroup J, this was in agreement with the reduced frequency of this haplogroup among patients with a complicated phenotype. It has been reported that 10398G was protective against PD [20, 25]. The 10398G allele was also associated with an earlier age at onset in a group of patients with spinocerebellar ataxia type 2 [26]. The 10398 SNP resulted in a non-conservative 155 threonine to alanine change within the NADH dehydrogenase 3 (ND3) gene. This SNP affected mitochondrial matrix pH and intra-cellular calcium dynamics, with cytosolic calcium response to histamine being higher in cells with 10398A [27]. These differences in mitochondrial function could explain the effect of this SNP on the phenotype among HSP patients. Although the association between this SNP and the phenotype was plausible, it was based on a limited number of 10398G patients. Although the association was statistically significant, a total of 126 complicated and 477 pure cases should be necessary to reach a power of 80 at a  $p \leq 0.05$ .

In conclusion, our work supported a role for a rare haplogroup on the risk of developing HSP, and an effect of the mitochondrial A10398G variant on the phenotype.

These findings require further investigation, including the replication in larger cohorts and from different populations.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias PI08/0915 (European FEDER funds) to V.A. E.S–F. was a fellowship from FICYT– Principado de Asturias. The authors thank the patients and family members for their participation in this study. Authors wish to thank Fundació n Parkinson Asturias and Obra Social CAJASTUR for their support.

**Conflict of interest** None of the authors have conflicts of interest related to this work.

## References

1. Fink JK (2006) Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 6:65–76
2. Dürr A, Camuzat A, Colin E, Tallaksen C, Hannequin D, Coutinho P et al (2004) Atlastin1 mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch Neurol*. 61:1867–1872
3. Stevanin G, Ruberg M, Brice A (2008) Recent advances in the genetics of spastic paraplegias. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 8:198–210
4. Hansen JJ, Dürr A, Courmu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN et al (2002) Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet* 70:1328–1329
5. Piemonte F, Casali C, Carozzo R, Schägger H, Patrono C, Tessa A et al (2001) Respiratory chain defects in hereditary spastic paraplegias. *Neuromuscul Disord* 11:565–569
6. McDermott CJ, Taylor RW, Hayes C, Johnson M, Bushby KM, Turnbull DM, Shaw PJ (2003) Investigation of mitochondrial function in hereditary spastic paraparesis. *Neuroreport* 14:485–488
7. Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G (2003) Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 163:777–787

8. Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Bradley LJ, Ginsberg L, Wood NW, Schapira AH, Warner TT (2004) A clinical, genetic and biochemical study of SPG7 mutations in hereditary spastic paraplegia. *Brain* 127:973–980
9. Verny C, Guegen N, Desquiret V, Chevrollier A, Prudean A, Dubas F et al (2011) Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion* 11:70–75
10. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT (2008) Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 7:1127–1138
11. Raule N, Sevini F, Santoro A, Altília S, Franceschi C (2007) Association studies on human mitochondrial DNA: methodological aspects and results in the most common age-related diseases. *Mitochondrion* 7:29–38
12. Arning L, Haghikia A, Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Pula B et al (2010) Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J Mol Med* 88:431–436
13. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A et al (2007) Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 81:228–233
14. Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Vidoni S, Mattioli S, Barbieri A et al (2009) The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2, 5-hexanedione toxicity. *PLoS One* 4:e7922
15. Tonska K, Kodron A, Bartnik E (2010) Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 797:1119–1123
16. Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, Casajús JA, Ruiz-Pesini E, Montoya J, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C (2009) Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 9:27–30
17. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J et al (2010) Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10:102–107
18. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19:3343–3353
19. Alvarez V, Sánchez-Ferrero E, Beetz C, Díaz M, Alonso B, Corao AI et al (2010) Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol* 10:e89
20. Huerta C, Castro MG, Coto E, Blazquez M, Ribacoba R, Guisasola LM et al (2005) Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J Neurol Sci* 236:49–54
21. Castro MG, Huerta C, Reguero JR, Soto MI, Domenech E, Alvarez V et al (2006) Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 112:202–206
22. Palacín M, Alvarez V, Martín M, Díaz M, Corao AI, Alonso B et al (2010) Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion* 11:176–181
23. Arnold I, Langer T (2002) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1592:89–96
24. Crosby AH, Patel H, Chioza BA, Proukakis C, Gurtz K, Patton MA et al (2010) Defective mitochondrial mRNA maturation is associated with spastic ataxia. *Am J Hum Genet* 87:655–660
25. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER et al (2003) Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 72:804–811
26. Simon DK, Zheng K, Velázquez L, Santos N, Almaguer L, Figueroa KP, Pulst SM (2007) Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol* 64:1042–1044
27. Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T (2006) Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intra-cellular calcium dynamics. *PLoS Genet* 2:e128

