

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Secció d'Errors Congènits del Metabolisme
Servei de Bioquímica i Genètica Molecular
Hospital Clínic, Barcelona

**BASES BIOQUÍMIQUES I GENÈTIQUES DE LES DEPLECIONS
DE mtDNA I DE LES ALTERACIONS DE NFU1**

Aleix Navarro Sastre

TESI DOCTORAL

Barcelona, 2012

Programa de Doctorat de Bioquímica Clínica i Biologia Molecular,
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Memòria per optar al grau de
Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Presentada per:
ALEIX NAVARRO SASTRE

Vistiplau:

Dra. Antònia Ribes
Directora de la tesi

Dr. Francesc González-Sastre
Tutor de la tesi

Aleix Navarro Sastre
Interessat

Barcelona, Octubre 2012

*A la meva família i a la gent que estimo,
que no són pocs...*

Agraïments

Toni, sempre has confiat en mi des de que era un petit becari, ara fa uns 12 anys, com passa el temps! M'has donat l'oportunitat de treballar en el món de la ciència i, en concret, en el món dels errors congènits i gràcies a això he après un munt de coses (i el que queda!). M'has vist fer riure a la Conxita, la Mercè, la Loti, la Patri i fins i tot a la Lluch! I encara espero fer-te riure a tu i a tothom qui passi per les meves mans! A nivell personal et considero una mare postissa (entre d'altres que tinc per l'IBC) i una amiga, m'has obert les portes de casa teva i en moments de dificultat sempre m'has ofert ajuda. Moltes gràcies per tot! Un petó ben fort!

Senyores facultatives, les meves altres mares postisses! **Paz**, gràcies per tota la saviesa mitocondrial i els teus consells(encara que porti pantalons curts a la feina). **Laura**, gràcies per ajudar-me, escoltar-me i fer-me costat en tot moment! **Marisa**, vas ser la primera de la casa, al costat de la Lina, a ensenyar-me ciència i riure al laboratori, gràcies! **Maria Josep**, tot i que quasi sempre m'has necessitat en moments de dificultat informàtica, gràcies pels consells moleculars i per preocupar-te per la meva figura! **Teresa**, la primera persona que em va rebre i em va fer de guia dins l'institut, sempre disposada a ajudar-me, moltes gràcies. **Amparo**, sempre contenta de saber que era de Girona i que allí hem estat els últims en resistir l'envestida del PP. Gràcies per consells i ànims!

Senyors facultatius, **José Luís Marín**, gràcies pels moments divertits i per confiar en mi durant els mesos de substitució a precoç. **J M^a Hernández**, a qui vaig tenir la tristesa de substituir i l'única persona de tot l'institut amb qui he pogut compartir moments *Cálico Electrónico*, ets tot un fenomen científic!

A les **dues floretes** de la mateixa quinta científica que jo, **Judit i Àngela**, sense vosaltres tot això no seria el mateix, he rigut, he gaudit, us he fet passar por, he explicat i he escotat *batallitas*, he après, he ensenyat, m'he empenyat, m'he posat pesat, hem plorat i hem fet un munt de coses plegats durant aquests 11 anys junts. Moltes gràcies per tot, us estimo molt!

Al cos tècnic, la força del laboratori! **Patri**, la més guapa de les tècnics i la més joveneta! Hem passat un munt d'anys junts, eh? M'ho he passat molt bé al teu costat, i has aguantat molt bé totes les meves brometes! Gràcies per les teves rialles! **Cris**, gràcies per tots els moments que hem passat plegats al lab i fora del lab, no els oblidaré mai! Espero poder continuar compartir amb tu moltes rialles i bons moments!. **Loti**, gràcies pels consells i les xerradetes, també per tots els sopars a la teva fantàstica terrasseta! **Sònia**, gràcies per la teva paciència i per deixar-me fer-te petonets i arrambades, que en realitat sé que t'agraden un munt! Gràcies també per la paciència de deixar-te robar sense haver de tallar-me cap mà! **Quim**, gràcies pels teus moments! Et trobem a faltar pel laboratori! **Lina**, la meva primera tecnico-jefa, polifacètica, dolça i divertida, un petó ben gros! **Montse**, hem coincidit poc però ja t'he fet de jefe i has aguantat molt bé, impressionant! I tu no facis cas i continua amb el *Golpe* al mòbil! A tots els altres, **Helena, Josep, Ana, Laura, Conxita, Mercè Freixenet, Irene, Sabine, Emma, Edu, Miguel, Ester, Marc, Neo...** i a tots aquells que em puc haver oblidat no per malícia sinó per despistat, moltes gràcies a tots, ja que en algun moment he necessitat la vostra ajuda i sempre la he obtingut amb un somriure!

A tots els meus apreciats **padawans** (o practicants), **Andrea, Aida, Anna, Dani, Helena...** Ha estat molt bé això de tenir algú sota la meva influència maligne, hi hi hi... M'ho he passat molt bé al vostre costat fent els meus famosos esquemes i dibuixos per ensenyar-vos tot el que sé (o almenys o he intentat). Si més no espero haver-vos

inculcat un xic del meu *slow down* i que us serveixi en la vida! Però no us penseu que només vosaltres heu après, jo també he après un munt de vosaltres! Sempre em tindreu pel que vulgueu, sempre sereu especials per a mi! En fi, que gràcies per suportar-me!

A la **pandilla** d'aquests últims anys; **Ester, Judit, Leslie** (☺), **Aida** (no et queixis que surts a dos llocs, eh?), **Frede, Núria**... Moltes gràcies per la vostra amicitat, els vostres ànims, l'ajuda científica i sentimental. M'ha agradat molt compartir esmorzars, dinars a la gespa, excursions, sopars, ballariques, etc... Us aprecio un munt, sou tots uns fenòmens!

Als **precoços**, que m'heu tingut per les vostres terres durant sis mesos i m'he sentit molt a gust treballant amb vosaltres, sou un gran equip professional i humà! A part d'això, també donar-vos les gràcies per tot, ja que encara que esteu "al fons a l'esquerra", sempre ens hem trobat al passadís per intercanviar vivències!

A la resta de **citogenètics** que no he mencionat en algun moment, gràcies a tots i totes, sempre m'heu mostrat una professionalitat i companyerisme excepcional!

A tota la gent de **l'Institut de Fitopatologia de Marburg**, en especial en Roland, l'Oliver, en Ralph, la Briggite, l'Antonio, la Daili, la Claudia, etc... Moltes gràcies a tots, em vaig sentir com a casa mentre vaig estar amb vosaltres! Sou persones i professionals excepcionals! Us trobo a faltar!

A tot l'equip de **Sant Joan de Déu** amb qui em compartit congressos, doctorats i festes varies! M'ho passo d'allò més bé amb tots vosaltres!

A la meva **família** i **amics** més propers, moltes gràcies pel vostre suport i per aguantar alguna que altra xerrada científica, que ja sé que han estat poques perquè ja sabeu que no explico mai res, eh? Us estimo tant que no hi ha paraules escrites que ho puguin reflectir, us ho demostraré amb abraçades i petons tota la vida!

Una menció especial per a la Marta, ets especial i et dono les gràcies per aquests últims mesos de doctorat, t'estimo!

Moltes gràcies també a totes aquelles persones amb qui he interactuat durant tots aquests anys en congressos, reunions del CIBERER, sopars, events, etc... Han estat tants anys de moments i vivències que segur que m'oblido d'alguna persona, perdó per si t'he oblidat! No m'ho tinguis en compte!

Totes aquestes petites contribucions de tothom han fet possible que jo sigui com sóc, gracies de tot cor!

Aleix

ÍNDIX

ÍNDIX DE FIGURES	15
ÍNDIX DE TAULES.....	16
ÍNDIX DE TAULES.....	17
ABREVIATURES	18
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	23
1.1. LA MITOCÒNDRIA.....	24
1.1.1. ESTRUCTURA I FUNCIO	24
1.1.2. GENS OXPHOS.....	27
1.1.3. GENÈTICA MITOCONDRIAL	28
1.1.4. MUTACIONS DEL DNA MITOCONDRIAL	30
<i>Reorganitzacions del mtDNA.....</i>	<i>30</i>
<i>Mutacions puntuals del mtDNA</i>	<i>31</i>
1.1.5. ASPECTES CLÍNICS DE LES MUTACIONS DEL MTDNA.....	32
1.2. DEPLECIÓ DE DNA MITOCONDRIAL	32
1.2.1. METABOLISME DELS NUCLEÒTIDS.....	33
1.2.2. SÍNDROMES DE DEPLECIÓ DE MTDNA.....	36
<i>Timidina quinasa 2 (TK2).....</i>	<i>36</i>
<i>Desoxiguanosina quinasa (dGK).....</i>	<i>37</i>
<i>Succinil-CoA sintasa (SCS).....</i>	<i>38</i>
<i>Timidina fosforilasa (TP).....</i>	<i>40</i>
<i>p53R2.....</i>	<i>40</i>
<i>Polimerasa gamma (POLG)</i>	<i>41</i>

<i>C10orf2 (Twinkle)</i>	42
<i>MPV17</i>	42
1.2.3. DIAGNÒSTIC DELS SÍNDROMES	43
1.2.4. CONSELL GENÈTIC, DIAGNÒSTIC PRENATAL I TRACTAMENT DE LES MDS.	43
1.3. COFACTORS DEL METABOLISME ENERGÈTIC MITOCONDRIAL.....	44
1.3.1. ÀCID LIPOIC	45
1.3.2. TIAMINA	46
1.3.3. RIBOFLAVINA.....	46
1.3.4. COENZIM Q10.....	47
1.3.5. CLÚSTERS DE SULFUR DE FERRO (FE-S).....	48
1.3.5.1. Estructura i funció dels clústers Fe-S.	48
1.3.5.2. Biosíntesi de clústers Fe-S.....	50
1.3.5.3. Defectes de la biogènesi de proteïnes Fe-S.....	54
<i>Atàxia de Friedreich (FRDA)</i>	54
<i>Miopatia amb intolerància a l'exercici; miopatia hereditària amb acidosi làctica</i>	55
<i>Deficiència de GLRX5</i>	55
<i>Anèmia sideroblàstica amb atàxia cerebel·lar lligada al cromosoma X</i>	56
2. OBJECTIUS.....	59
3. RESULTATS: PUBLICACIONS	63
ARTICLE 1	64
<i>Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and use of citrate synthase as a helpful tool to better characterize the patients.</i>	
ARTICLE 2	73
<i>Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue.</i>	

ARTICLE 3	79
<i>Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form.</i>	
ARTICLE 4	87
<i>Functional splicing assay supporting that c.70+5G>A mutation in the MPV17 gene is disease causing.</i>	
ARTICLE 5	92
<i>A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins.</i>	
4. RESUM GLOBAL I DISCUSSIÓ GENERAL.....	117
4.1. POSTA A PUNT DE LA DETERMINACIÓ DEL NÚMERO DE CÒPIES DE MTDNA EN TEIXITS HUMANS I OBTENCIÓ DE VALORS CONTROL.	118
4.2. DIAGNÒSTIC DE PACIENTS AMB LA SÍNDROME DE DEPLECIÓ DE MTDNA.....	122
4.2.1 <i>Pacients hepatocerebrals</i>	122
4.2.2. <i>Pacients encefalomiopàtics</i>	127
4.2.3. <i>Pacients amb síndrome d'Alpers</i>	130
4.3. IDENTIFICACIÓ D'UN GEN, INVOLUCRAT EN LA MADURACIÓ D'UN SUBGRUP DE PROTEÏNES FE-S, L'ALTERACIÓ DEL QUAL CAUSA UNA MALALTIA MITOCONDRIAL FATAL.	133
5. CONCLUSIONS.....	145
6. REFERÈNCIES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
7. APÈNDIX	169
ARTICLE ANNEX 1.....	170
<i>Coenzyme Q10 deficiency associated with a mitochondrial DNA depletion syndrome: a case report.</i>	

ARTICLE ANNÈX 2.....175
Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease.

INDEX DE FIGURES

Figura 1 - Imatge d'una mitocòndria per microscòpia electrònica.....	24
Figura 2 - Flux d'electrons a través dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial i producció d'ATP.....	26
Figura 3 - Estructura del DNA mitocondrial.....	28
Figura 4 - Esquema de la dinàmica de la síntesi de dNTPs per la ruta de salvament.....	35
Figura 5 - Esquema de la dinàmica principal de la síntesi de dNTPs per la ruta <i>de novo</i>	35
Figura 6 - Cicle de Krebs i metabolisme de l'àcid metilmalònic.....	39
Figura 7 - Principals cofactors del metabolisme energètic mitocondrial.....	45
Figura 8 - Estructura dels clústers de sulfur de ferro més característics: [2Fe-2S] i [4Fe-4S].....	49
Figura 9 - Esquema dels principals passos en la biosíntesi mitocondrial i citosòlica de proteïnes Fe-S.....	51
Figura 10 - Còpies de mtDNA, activitat citrat sintasa i número de còpies de mtDNA relacionat amb citrat sintasa en biòpsies musculars d'individus control.....	119
Figura 11. Integritat del DNA obtingut de múscul inclòs en parafina.....	121
Figura 12. Contingut de mtDNA en biòpsies musculars incloses en parafina i en biòpsies musculars congelades d'individus control i de quatre pacients amb depleció de mtDNA.....	122

Figura 13. Estudi molecular de la patogenicitat de la mutació c.70+4G>A.....	125
Figura 14. Estudi molecular de la mutació c.531+4A>T del gen <i>SUCLG1</i>	129
Figura 15. Anàlisi dels nivells de lipoilació i dels nivells de NFU1 en pacients i controls.....	136
Figura 16. Anàlisi per western blot de l'àcid lipoic unit a proteïnes i de proteïnes Fe-S havent silenciats NFU1.....	137
Figura 17. Activitats enzimàtiques d'extractes cel·lulars després del silenciament de NFU1.....	138
Figura 18. Anàlisi per western blot de l'àcid lipoic unit a proteïnes, nivells de proteïnes Fe-S i activitats enzimàtiques d'extractes cel·lulars havent silenciats ISCU.....	140
Figura 19. Demostració de la patogenicitat de la mutació Gly208Cys en llevat i evidència de NFU1 com a proteïna transferidora de clústers en un estadi tardà....	142
Figura 20. Proposta de model funcional per la funció de NFU1 en la biogènesi de les proteïnes Fe-S mitocondrials.....	143

INDEX DE TAULES

Taula 1 - Contribució del genoma mitocondrial i nuclear als complexos de la cadena respiratòria mitocondrial.....	27
Taula 2 - Gens responsables de depleció del mtDNA.....	33
Taula 3 - Principals components de la via de síntesi de clústers Fe-S.....	53
Taula 4 - Percentatge de depleció de mtDNA, activitats de la cadena respiratòria mitocondrial i els estudis moleculars de 10 pacients amb mutacions en gens relacionats amb MDS.....	132

ABREVIATURES

ACP	Proteïna transportadora de grups acil
ADP	Adenosina difosfat
ATP	Adenosina trifosfat
C3	Propionilcarnitina
C4DC	Succinilcarnitina
BCKDH	Deshidrogenasa de cetoàcids de cadena ramificada
CoQ10	Coenzim Q10
CR	Regió de control
CRM	Cadena respiratòria mitocondrial
CS	Citrat sintasa
dCK	Desoxicitidina quinasa
dGK	Desoxiguanosina quinasa
Da	Dalton
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNDP	Desoxiribonucleòtids difosfat
dNK	Desoxiribonucleòsid quinasa
dNMP	Desoxiribonucleòtids monofosfat
dNTP	Desoxiribonucleòtids trifosfat
dThd	Timidina
dTTP	Desoxitimidina trifosfat
EIM	Matriu mitocondrial i l'espai intermembrana
ETF-DH	Flavoproteïna deshidrogenasa transferidora d'electrons
FAD	Flavina adenina dinucleòtid (forma oxidada)
FADH ₂	Flavina adenina dinucleòtid (forma reduïda)
Fdx1	Ferredoxina

FdxR	Ferredoxina reductasa
FFPE	Biòpsia inclosa en parafina
FMN	Flavina mononucleòtid
FRDA	Atàxia de Friedreich
GCS	Sistema de ruptura de la glicina
GDP	Guanosina difosfat
GRLX5	Glutaredoxina monothiol mitocondrial
GTP	Guanosina trifosfat
HMG	Hidroximetilglutaril
IRP1	Proteïna reguladora de Fe
KGDH	Alfa-cetoglutarat deshidrogenasa
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
LHON	Neuropatia òptica hereditària de Leber
LAS	Lipoic àcid sintasa
MDS	Síndrome de depleció de mtDNA
MELAS	Encefalomiopatia mitocondrial amb acidosi làctica i episodis semblants a AVC
MERFF	Epilèpsia mioclònica amb RRF
MILS	Síndrome de Leigh d'herència materna
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MNGIE	Encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma reduïda)
NARP	Neuropatia, atàxia i retinitis pigmentosa
nDNA	DNA nuclear
NDPK	Nucleòtid difosfat quinasa

NMPK	Nucleòtid monofosfat quinasa
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Parells de bases
PDH	Piruvat deshidrogenasa
PEO	Oftalmoplegia progressiva externa
POLG	Polimerasa gamma
RFLT	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
qRTPCR	PCR quantitativa a temps real
RNA	Àcid ribonucleic
RNR	Ribonucleòtid reductasa
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RRF	Fibres vermelles esquinçades
rRNA	RNA ribosòmic
SCS	Succinil-CoA sintasa
siRNA	RNA d'interferència
TK1	Timidina quinasa 1
TK2	Timidina quinasa 2
TP	Timidina fosforilasa
TPP	Tiamina pirofosfat
tRNA	RNA de transferència
Δ mtDNA	Delecions parcials del DNA mitocondrial

1. Introducció general

1.1. La mitocòndria

1.1.1. Estructura i funció

La mitocòndria és un orgànul cel·lular que es troba en el citoplasma de totes les cèl·lules eucariotes i també en el citoplasma d'alguns microorganismes (algues, fongs i protozoous). És un orgànul dotat de dues membranes, l'externa i la interna, la qual es plega en estructures anomenades crestes. La membrana mitocondrial externa (MME) està constituïda per una bicapa de fosfolípids, essent el contingut de lípids d'un 50%. Aquesta bicapa conté estructures proteïques com les porines que confereixen permeabilitat a molècules més petites de 10 kDa. La membrana mitocondrial interna (MMI) és molt més complexa, ja que conté proteïnes essencials per a les funcions metabòliques de la mitocòndria. El contingut lipídic de la MMI és aproximadament d'un 20% i només és permeable a l'oxigen, CO_2 i aigua. L'existència de dues membranes permet definir dos espais ben diferenciats: la matriu mitocondrial i l'espai intermembrana (EIM) (Figura 1).

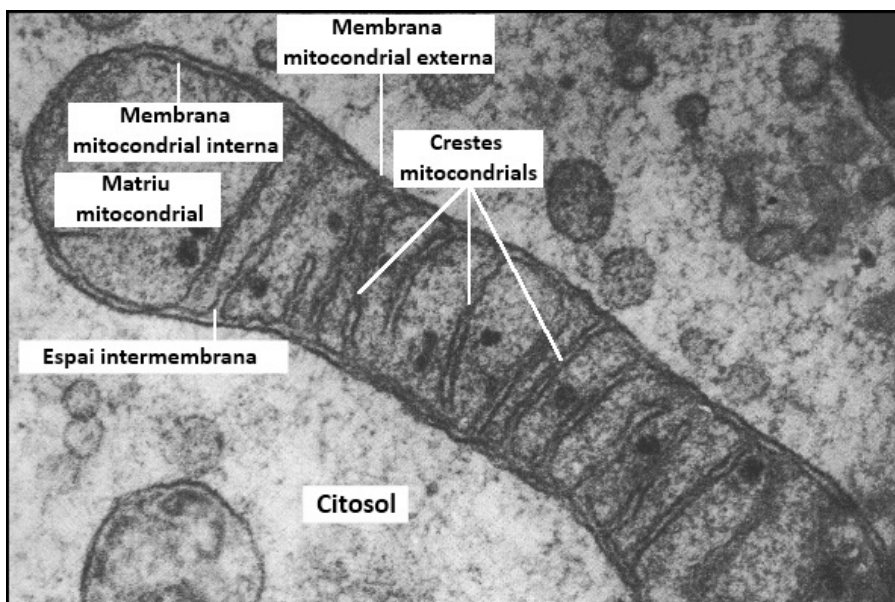


Figura 1. Imatge d'una mitocòndria per microscòpia electrònica.

La funció principal de la mitocòndria és la producció d'ATP. Aquests orgànuls estan especialitzats en la conversió d'energia procedent de l'oxidació de substrats en energia en forma d'ATP. Aquest procés es duu a terme mitjançant un sistema enzimàtic complex format per la cadena respiratòria mitocondrial (CRM) i la fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS). Aquest sistema proporciona al voltant del 90% dels requeriments energètics de la majoria de tipus cel·lulars i consta de cinc complexes multienzimàtics localitzats a la MMI. El producte final de la glucòlisis en el citoplasma cel·lular és el piruvat, que en condicions anaeròbiques es converteix en lactat mitjançant l'enzim lactat deshidrogenasa. En condicions aeròbiques, el piruvat és transportat dins la mitocòndria on es descarboxila gràcies a la piruvat deshidrogenasa i es converteix en acetil-CoA. Aquest acetil-CoA s'oxida a través del cicle de Krebs, generant dues molècules de CO_2 i quatre parells d'àtoms d'hidrogen que es transfereixen a la nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD^+) i al dinucleòtid de flavina i adenina (FAD), els quals es redueixen a NADH i FADH_2 , respectivament. Durant la respiració, els electrons cedits a la CRM pel NADH i FADH_2 són transferits des d'un complex al següent, amb potencial redox inferior (Figura 2). El complex I (NADH-deshidrogenasa) catalitza la transferència d'electrons des del NADH cap al coenzim Q (o ubiquinona). Aquest flux d'electrons genera un bombeig de protons cap a l'EIM de la mitocòndria. El coenzim Q també accepta electrons provinents de l'oxidació del succinat en el cicle de Krebs, que li són cedits pel complex II. En aquest cas no es genera cap flux de protons com succeïa en el cas del complex I. El coenzim Q reduït cedeix els electrons al complex III, i aquest els cedeix al citocrom C, generant una altra vegada un flux de protons en direcció a l'EIM. La tercera bomba de protons és el complex IV, que oxida el citocrom c i cedeix els electrons a l' O_2 per donar H_2O . Durant aquest procés la matriu mitocondrial es va basificant, mentre que l'EIM s'acidifica. Degut a la impermeabilitat de la MMI es crea una diferència de potencial electroquímico de protons, que serà utilitzada pel complex V (o ATP sintasa) en un procés anomenat fosforilació oxidativa. Aquest complex acobla la difusió facilitada de

H⁺ a la producció d'ATP. Aquest fenomen garanteix la coordinació entre les necessitats energètiques del sistema i el consum d'aquests^{1,2}.

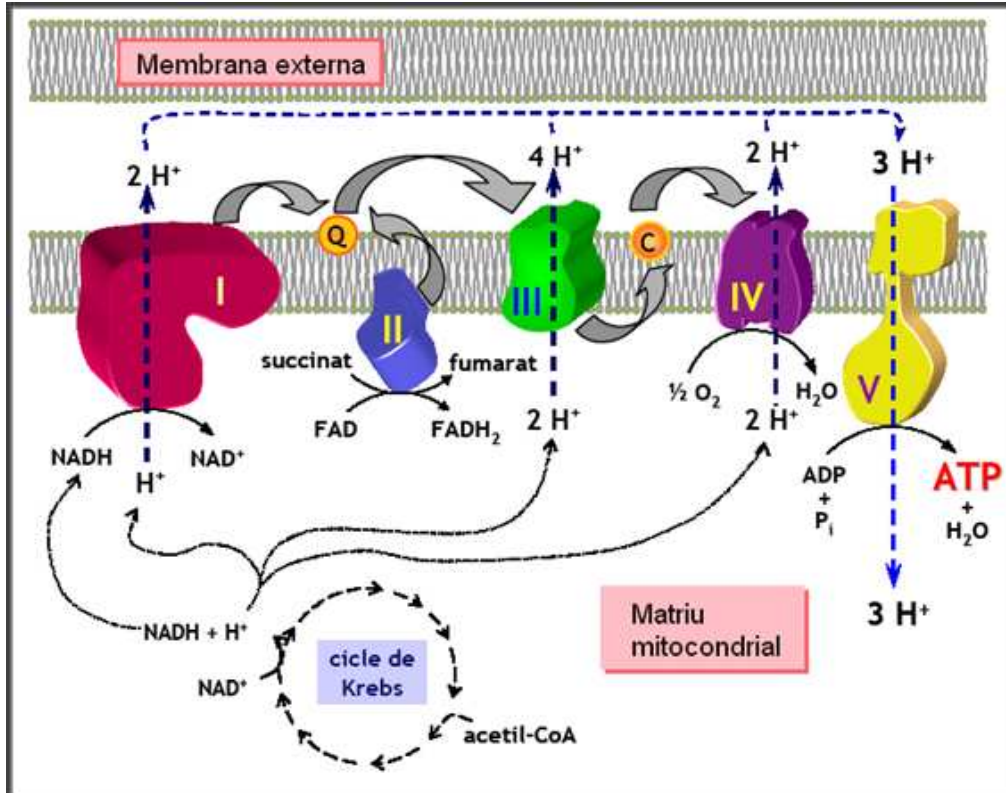


Figura 2. Flux d'electrons a través dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial i producció d'ATP.

La mitocondria també realitza altres funcions importants, com per exemple; (i) la termogènesis (producció de calor mitjançant el desacoblament de la respiració oxidativa i la síntesi d'ATP en teixit adipós marró), (ii) la β-oxidació mitocondrial, (iii) la homeòstasis del calci en la matriu mitocondrial, que està implicada en els mecanismes de mort cel·lular programada (apoptòsi), (iv) en la biosíntesi de clústers de ferro i sofre per a la formació de les proteïnes Fe-S i (v) en la síntesi del grup hemo en el fetge i en les cèl·lules precursors d'eritròcits. A part, la mitocondria també

participa en la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids, fosfolípids, pirimidines i altres metabòlits.

Així doncs, la mitocondria necessita, per a mantenir la seva estructura i la seva funció, al voltant d'unes 850 proteïnes codificades pel DNA nuclear. Aquestes proteïnes es sintetitzen en el citoplasma i són importades dins de l'òrganul, on es distribuïran en un dels seus 4 espais, la MME, la MMI, l'EIM o la matriu mitocondrial. Aproximadament 70 d'aquestes proteïnes són components estructurals de la CRM, i més de 20 són necessàries per acoblar i mantenir els complexos en l'ordre adequat per a un correcte funcionament.

1.1.2. Gens OXPHOS

La funció mitocondrial en mamífers té la característica única de la participació d'un sistema genètic diferent al nuclear que codifica per proteïnes mitocondrials. Aquest sistema genètic s'anomena genoma o ADN mitocondrial (mtDNA). L'expressió coordinada dels gens del mtDNA i del genoma nuclear (nDNA) és essencial per a la correcta síntesi d'un sistema OXPHOS funcional. La majoria de les proteïnes del sistema OXPHOS estan codificades per nDNA, mentre que només 13 estan codificades pel mtDNA (Taula 1). Aquests dos genomes tenen una organització genètica molt diferent i estan ubicats en diferents compartiments subcel·lulars, amb sistemes de transcripció i traducció independents³.

Taula 1. Contribució del genoma mitocondrial i nuclear als complexos de la cadena respiratòria mitocondrial.

	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
mtDNA	7	0	1	3	2
nDNA	>40	4	10	10	12

1.1.3. Genètica mitocondrial

El genoma mitocondrial humà és una molècula circular de doble cadena de DNA de 16,569 parells de bases (pb) (Figura 3). El mtDNA conté 37 gens; 2 gens codifiquen per a RNA ribosomal (rRNA), 22 codifiquen per a RNA de transferència (tRNA) i 13 codifiquen per a polipèptids que formaran part de les subunitats dels complexos que constitueixen la CRM (Figura 2). El mtDNA presenta una estructura molt compacte i la majoria dels gens estan codificats per la cadena pesada. La cadena lleugera només conté la informació de la subunitat 6 de la NADH deshidrogenasa i 8 tRNAs. La única regió del mtDNA que no codifica cap gen és la regió del bucle D, on hi ha la regió de control, que conté els elements que regularan la transcripció i la replicació del genoma mitocondrial.

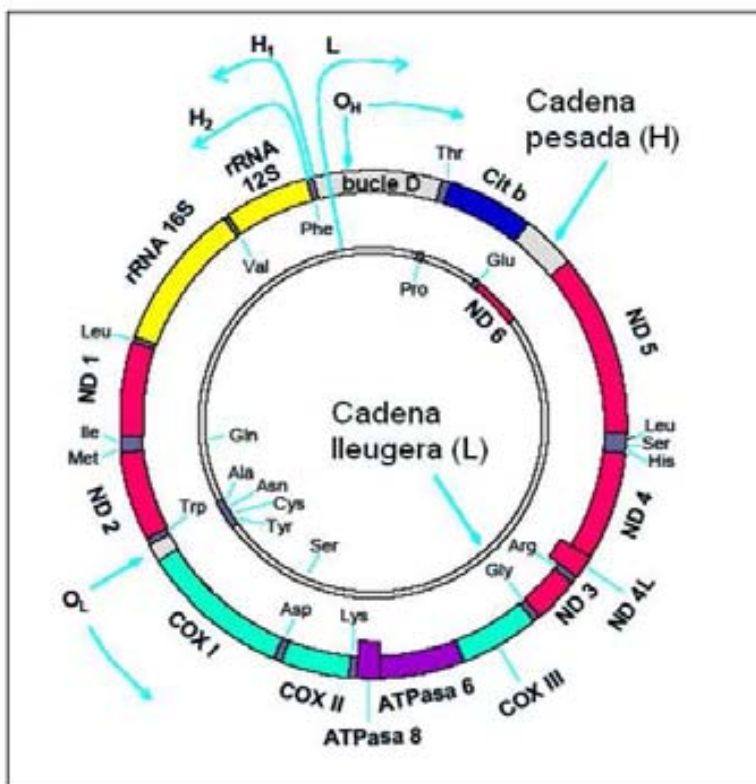


Figura 3. Estructura del DNA mitocondrial.

El genoma mitocondrial posseeix algunes característiques particulars que el distingeixen del genoma nuclear:

El DNA mitocondrial té, en comparació al nuclear, **una gran densitat**. La majoria dels gens que codifiquen per proteïnes no tenen lloc de terminació, després de l'últim codó amb sentit hi ha una T o TA i immediatament després s'inicia un altre gen. El codó de terminació es formarà posteriorment mitjançant la poliadenilació de l'extrem 3'.

El mtDNA té un codi genètic propi i difereix en cinc codons al genoma nuclear: UGA codifica triptòfan en lloc de ser codó stop; AGA i AGG són codons stop en lloc de codificar arginina, AUA i AUU codifiquen per metionina en comptes de isoleucina, que juntament amb AUG són els tres codons *Start*.

L'herència del mtDNA és essencialment de via materna⁴. L'ovòcit, amb més de 100,000 molècules de mtDNA, és el que aporta la immensa majoria de mitocòndries en la fecundació.

L'elevada taxa de mutació del mtDNA en comparació al nDNA⁵ probablement deguda a la falta d'histones que protegeixin a la doble hèlix de mtDNA. La falta de protecció reforça l'efecte perjudicial que provoquen les espècies reactives de l'oxigen (ROS) generades per la fosforilació oxidativa. El mtDNA està físicament molt pròxim a la CRM, principal font de formació de ROS dins la mitocòndria.

La **homoplàsia** correspon a la situació en que totes les molècules de mtDNA que conté la mitocòndria són iguals. La **heteroplàsmia** fa referència a la coexistència de molècules salvatges i molècules amb mutacions dins la mateixa mitocòndria. Durant

la divisió el mtDNA es reparteix a l'atzar entre les cèl·lules filles, rebent diferents percentatges de mtDNA. Aquest fenomen s'anomena **segregació replicativa**⁶, que provoca que el percentatge de molècules portadores de mutació variï entre teixits i al llarg del temps.

El **fenotip** de la cèl·lula, teixit o individu heteroplàsmic depèn del percentatge de mtDNA mutat. D'aquesta manera el fenotip s'expressa d'acord amb l'**efecte llindar**. La malaltia apareix quan la producció d'ATP en el teixit heteroplàsmic és insuficient per assumir una activitat normal. S'ha de tenir en compte que les necessitats energètiques de cada teixit són particulars i específiques, així com el nombre de mitocòndries i molècules de mtDNA que contenen. Els òrgans i teixits que més es veuen afectats per una falta de síntesi d'ATP són: ulls, sistema nerviós, múscul, cor, pàncrees, ronyó i fetge.

1.1.4. Mutacions del DNA mitocondrial

Reorganitzacions del mtDNA

Les reorganitzacions simples a gran escala del mtDNA poden ser; delecions parcials (Δ mtDNA)⁷, duplicacions parcials⁸, o menys freqüents, triplicacions⁹. Totes aquestes anomalies es troben en heteroplasmia. La majoria de Δ mtDNA són esporàdiques, perquè la deleción és *de novo* i es dona en un estadi temprà de la embriogènesi o en l'oòcit matern¹⁰. Les delecions a gran escala acostumen a ser fenòmens greus, ja que aquestes delecions tendeixen a la pèrdua d'un o més gens que codifica per tRNAs, i per tant, poden afectar a tot el sistema OXPHOS. Aquest fet s'ha demostrat transformant cèl·lules amb Δ mtDNA, les quals mostraven una respiració cel·lular i una síntesi deficient de proteïnes codificades pel mtDNA¹¹. Els pacients portadors de molècules de mtDNA parcialment duplicades són també portadors de molècules amb delecions parcials, i s'ha demostrat que molècules parcialment duplicades es poden recombinar intramolecularment, donant lloc a molècules de mtDNA *wild-type* i

molècules parcialment delecionades, o viceversa^{11, 12}. S'ha suggerit que les duplicacions parcials del mtDNA són benignes i que la patologia ve donada per la coexistència d'aquestes amb molècules de Δ mtDNA. Tot i així, existeix una família afecte de malaltia mitocondrial que només presenta mtDNA duplicat i no es troba Δ mtDNA¹³. Les duplicacions del mtDNA són transmeses amb una freqüència molt elevada, al contrari que les Δ mtDNA¹²⁻¹⁶.

Múltiples deleccions del mtDNA s'han associat a mutacions en gens nuclears que codifiquen per proteïnes que contribueixen al manteniment, replicació i metabolisme dels nucleòtids de la mitocòndria¹⁷. També s'han descrit acumulacions exponencials de múltiples deleccions mitocondrials en teixits post-mitòtics d'avançada edat i en individus amb malalties neurodegeneratives¹⁸⁻²⁰.

Mutacions puntuals del mtDNA

El 80% del mtDNA codifica per a subunitats de la CRM, tot i així, la majoria de les mutacions puntuals del mtDNA es donen en regions que codifiquen tRNAs. Les mutacions puntuals del mtDNA es transmeten de forma materna, tot i que les mutacions *de novo* també són possibles. La única regió on no s'han descrit mutacions puntuals és en la regió no codificant del mtDNA. Mutacions patogèniques en els gens codificants per tRNAs provoca una fallida general alhora de sintetitzar proteïnes mitocondrials, afectant a 4 dels 5 complexos del sistema OXPHOS, mentre que mutacions en gens codificants per a proteïnes només afectarien específicament a un sol complex de la CRM. La majoria de les mutacions del mtDNA es troben en heteroplàsmia i presenten un gran ventall de variabilitat fenotípica, en canvi, les mutacions en homoplàsmia són menys freqüents i causen un fenotip clínic molt més homogeni i restringit a un sol teixit²¹⁻²³.

1.1.5. Aspectes clínics de les mutacions del mtDNA.

La distribució ubiqua de les mitocondries i el gran nombre i varietat de mutacions del mtDNA, així com la heteroplàsmia, explicaria l'ampli espectre de manifestacions clíniques de les malalties mitocondrials. Tot i aquesta varietat de símptomes, molts síndromes multisistèmics ben definits s'han associat a mutacions específiques. Les entitats clíniques més comunes són; (i) síndrome de Kearns-Sayre (KSS)²⁴, (ii) el síndrome de Pearson²⁵, (iii) oftalmoplègia progressiva externa (PEO) esporàdica amb fibres vermelles esquinçades (RRF)²⁴, (iv) epilèpsia mioclònica amb RRF (MERFF)²⁶, (v) encefalomiopatia mitocondrial amb acidosi làctica i episodis semblants a AVC (MELAS)²⁷, (vi) neuropatia, atàxia i retinitis pigmentosa (NARP)²⁸, (vii) síndrome de Leigh d'herència materna (MILS)²⁹ i (viii) la neuropatia òptica hereditària de Leber (LHON)³⁰.

1.2. Depleció de DNA mitocondrial

Les deplecions de mtDNA són alteracions causades per mutacions en gens nuclears i es caracteritzen per una reducció en el contingut de molècules de mtDNA. Els mecanismes moleculars responsables d'aquest fenomen no es coneixen del tot, però se sap que la majoria de mutacions recauen sobre gens que estan directament, o indirectament, involucrats en la replicació del mtDNA pròpiament dit o en el manteniment del pool mitocondrial de desoxiribonucleòtids trifosfat necessaris per a la síntesis del mtDNA. El fet que la depleció de mtDNA pugui afectar tant a un teixit específic (majoritàriament múscul, fetge i cervell) com a una combinació de diferents òrgans i teixits, implica l'existència de diferents manifestacions fenotípiques³¹. S'han descrit tres presentacions clíniques característiques: (i) miopàtica (OMIM#609560), (ii) encefalomiopàtica (OMIM#612073) i (iii) hepatocerebral (OMIM#251880). Actualment es coneixen mutacions en 8 gens nuclears associats a depleció del contingut del genoma mitocondrial: *TK2* i *RRM2B* responsables de la forma miopàtica,

SUCLA2 i *SUCLG1* responsables de la forma encefalomiopàtica i finalment *POLG1*, *DGUOK*, *MPV17* i *C10orf2* responsables de la forma hepatocerebral (Taula 2). Mutacions en el gen *TYMP*, que codifica per la timidina fosforilasa (TP), s'associen amb del síndrome d'encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), els pacients presenten depleció i delecions múltiples del mtDNA.

Degut a que el mtDNA codifica per diferents subunitats dels complexos I,III,IV i V de la CRM, la depleció del mtDNA causa deficiències combinades en aquests complexos, però no en el complex II, que és de codificació exclusivament nuclear. De totes maneres, els anàlisis de les activitats dels diferents complexos de la CRM poden ser normals en el cas que el teixit estudiat no sigui el principalment afectat³¹.

Taula 2. Gens responsables de la depleció de mtDNA.

Gen	Proteïna	Localització	OMIM
<i>DGUOK</i>	Desoxiguanosina quinasa	2p13.1	*601465
<i>TK2</i>	Timidina quinasa 2	16q22.1	*188250
<i>SUCLA2</i>	Subunitat β de la succinil-CoA sintasa	13q14.2	*603921
<i>SUCLG1</i>	Subunitat α de la succinil-CoA sintasa	2p11.2	*611224
<i>RRM2B</i>	Ribonucleòtid reductasa (p53R2)	8q22.3	*604712
<i>TYMP</i>	Thymidina fosforilasa	22q13.33	*131222
<i>POLG1</i>	Subunitat catalítica de la polimerasa γ	15q26.1	*174763
<i>C10orf2</i>	Helicasa Twinkle	10q24.31	*606075
<i>MPV17</i>	Mpv17	2p23.3	*137960

1.2.1. Metabolisme dels nucleòtids.

El mtDNA es replica durant tot el cicle cel·lular, independentment de la replicació del nDNA, per tant es necessita una aport constant de desoxiribonucleòtids trifosfat

(dNTP). Com que la mitocondria no té capacitat de síntesis *de novo* de dNTP, el pool mitocondrial es manté gràcies al reciclatge i reaprofitament de nucleòtids, a través de la ruta de salvament, i a l'import de dNTP citosòlics (utilitzant transportadors específics)³².

La ruta de salvament està formada per varis enzims, mitocondrials i citosòlics, encarregats de la fosforilació progressiva de nucleòsids fins a l'obtenció dels dNTP. En primer lloc, els desoxiribonucleòsids són fosforilats per una desoxiribonucleòsid quinasa (dNK) per a obtenir desoxiribonucleòtids monofosfat (dNMP). Seguidament hi ha dues fosforilacions consecutives, en que la nucleòtid monofosfat quinasa (NMPK) i la nucleòtid difosfat quinasa (NDPK) afegiran els fosfats necessaris per a la formació dels dNTP finals. Les dNK mitocondrials més importants són la desoxiguanosina quinasa (dGK) i la timidina quinasa 2 (TK2), codificades pels gens *DGUOK* i *TK2*, respectivament. En el citoplasma també trobem dNK que formen part de la ruta de salvament, la desoxicitidina quinasa (dCK) i la timidina quinasa 1 (TK1), encarregades del primer pas en la cadena de fosforilacions per a obtenir dNTP.

En cèl·lules quiescents, la subunitat R2 de l'enzim clau en la síntesi *de novo* dels dNTPs, la ribonucleòtid reductasa (RNR), està regulada negativament. En aquesta situació la síntesi de mtDNA depèn principalment dels enzims de la ruta de salvament; dins la mitocondria la TK2 fosforila nucleòsids de pirimidina i la dGK fosforila nucleòsids de purina. En el citoplasma la TK1 fosforila la timina i la dCK fosforila la guanosina, adenosina i citidina (Figura 4). S'ha demostrat que en situació de quiescència la ruta de síntesi *de novo* dels nucleòtids només funciona a uns nivells molt baixos, gràcies a l'actuació de la proteïna p53R2 que supleix la funció de R2 de la RNR³³. Quan la cèl·lula es troba en fase de creixement, el DNA nuclear es replica activament i necessita desoxinucleòtids trifosfat, per tant, la síntesi *de novo* s'activa. En aquesta situació la mitocondria pot importar desoxiribonucleòtids difosfat (dNDP) i dNTP des del citoplasma (Figura 5).

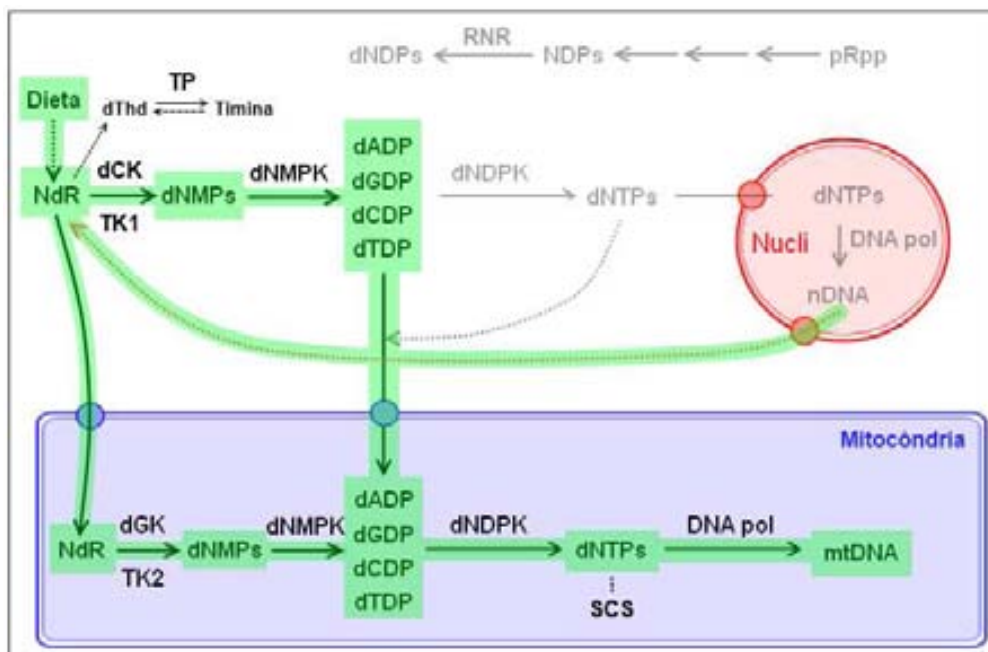


Figura 4. Esquema de la dinàmica de la síntesi de dNTP per la ruta de salvament.

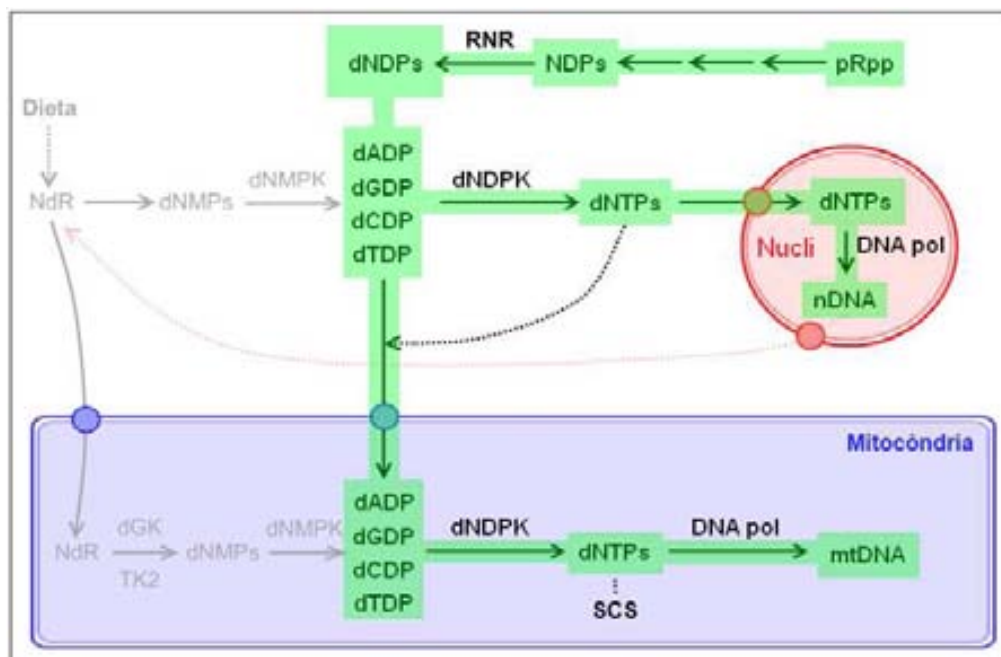


Figura 5. Esquema de la dinàmica principal de la síntesi de dNTP per la ruta de novo.

1.2.2. Síndromes de depleció de mtDNA

Fins al moment s'han descrit pacients amb mutacions en enzims que formen part de la ruta de salvament (TK2 i dGK) o en enzims relacionats directament o indirectament amb la síntesi i manteniment del pool de nucleòtids dins la mitocondria (p53R2, TP i SCS). També s'han descrit pacients amb depleció de mtDNA que presenten alteracions en enzims relacionats directament amb la replicació del mtDNA (POLG i Twinkle). Mitjançant tècniques de mapatge per homozigositat s'han pogut associar defectes en el gen *MPV17* amb pacients amb depleció de mtDNA, tot i desconèixer la funció exacta de la proteïna MPV17. Seguidament s'exposen breument els gens associats a MDS.

Timidina quinasa 2 (TK2)

La timidina quinasa 2 és una quinasa intramitocondrial de nucleòtids de pirimidina, encarregada de fosforilar desoxitimidina, desoxicitidina i desoxiuridina, formant part de la ruta de salvament de síntesi de dNTP de la mitocondria³⁴. Tal com s'ha comentat en apartats anteriors, la TK2 és essencial per a l'obtenció i manteniment del pool de dNTP en teixits no replicatius³⁴.

Mutacions en el gen *TK2* afecten principalment al teixit muscular, amb poc o gens efectes sobre fetge, cervell, cor o pell³⁵. La manifestacions clíniques típiques dels defectes de TK2 són una miopatia progressiva severa de presentació infantil o juvenil de progressió ràpida. L'electromiografia és miopàtica, la creatina quinasa està elevada fins a varis mil·lers d'unitats (>1000 U/L) i l'àcid làctic es troba moderadament elevat (< 2x valors normals). Morfològicament, la biòpsia muscular dels pacients TK2 presenten característiques dismòrfiques amb fibres citocrom c oxidasa negatives i RRF.

El primer pacient descrit amb mutacions al gen *TK2* va presentar una miopatia infantil severa amb regressió motora i mort per insuficiència respiratòria³⁴. Mutacions en el

gen *TK2* solen estar associades específicament a la forma miopàtica de depleció de mtDNA, tot i que un fenotip semblant a l'atròfia muscular espinal s'ha descrit ocasionalment³⁶. L'evolució de la malaltia és ràpida, portant al pacient a patir fallida respiratòria i mort en mesos o anys, però s'han descrit fenotips menys severos amb una evolució més lenta i una supervivència perllongada³¹.

Fins al moment s'han descrit 25 mutacions patogèniques diferents que afecten a *TK2*. La prevalença de mutacions en *TK2* entre les formes miopàtiques és d'un 20%. Cap dels pacients descrits han presentat variants amb pèrdua total de funció, donant a entendre que una activitat residual és necessària per evitar la mort embrionària. En concordança amb aquest fet, ratolins *knock-out* per *TK2* presenten una alta letalitat embrionària³⁷.

Desoxiguanosina quinasa (dGK)

La desoxiguanosina quinasa és l'enzim encarregat de catalitzar el primer pas de fosforilació dels desoxiribonucleòsids en la via de salvament mitocondrial, específicament fosforila els desoxiribonucleòsids de purina als corresponents dNMP^{17, 35}. El gen que codifica la dGK (*DGUOK*) està localitzat en el cromosoma 2p13. El fenotip més freqüent dels pacients amb mutacions al gen *DGUOK* es caracteritza per presentar una fallida hepàtica progressiva d'aparició neonatal, dificultat en l'alimentació i afectació neurològica (hipotonia, nistagmes i retràs psicomotor). Les manifestacions clíniques com neuropatia perifèrica i tubulopatia renal s'han descrit ocasionalment en algun pacient³⁸. Tots els pacients acostumen a presentar nivells alts de tirosina i fenilalanina en plasma, marcadors del dany hepàtic i la hiperlactacidèmia, sempre present. La ressonància magnètica pot mostrar un pic de làctic en cervell³⁹. La depleció apareix en fetge i va acompanyada de deficiències múltiples de CRM, mentre que la quantitat de mtDNA en múscul i fibroblasts acostuma a ser normal. Anàlisis histològics del fetge mostren varies alteracions; esteatosis microvascular, colèstasis,

fibrosis i cirrosis. En la majoria dels casos hi ha una ràpida evolució de l'afectació hepàtica i neurològica, provocant la mort del pacient a l'edat de 12 mesos³⁹.

S'han descrit més de 80 pacients de 50 famílies i s'han identificat al voltant d'unes 40 mutacions diferents³¹. La forma hepatocerebral infantil és majoritàriament la manifestació clínica dels pacients. Tot i que s'han practicat transplants hepàtics en varis pacients a fi d'evitar la fallida hepàtica, la presència de símptomes neurològics indica una afectació multisistèmica i, per tant, el transplant està contraindicat en pacients afectes de *DGUOK*⁴⁰. Els casos de *DGUOK* són aproximadament entre un 10 i un 15% dels casos de depleció de mtDNA^{31, 39, 41}.

Succinil-CoA sintasa (SCS)

La succinil-CoA sintasa és un enzim de matriu mitocondrial que catalitza la síntesi reversible d'àcid succínic i adenosina/guanosina trifosfat (ATP/GTP) a partir de succinil-CoA i adenosina/guanosina difosfat (ADP/GDP) en el cicle dels àcids tricarbòxílics o cicle de Krebs (Figura 6). Aquest enzim està format per dues subunitats, α i β , codificades respectivament pel gen *SUCLG1* i el gen *SUCLA2*. Mutacions en *SUCLA2* i *SUCLG1* causen la forma encefalomiopàtica del síndrome de depleció de mtDNA, però defectes en *SUCLG1* pot causar, a més, una malaltia molt severa que presenta dimorfisme antenatal, crisis metabòlica neonatal i mort prematura^{42, 43}. Un marcador molt útil en els defectes de SCS és l'elevació moderada d'àcid metilmalònic en orina (Figura 6), a més de la presència de metabòlits del cicle de Krebs (metílcitric, làctic, esters de carnitina i 3-hidroxi-isovalèric) en molts casos. Alguns dels pacients moren durant la fase neonatal, mentre que d'altres tenen una major supervivència.

Les característiques clíniques que presenten els pacients amb mutacions en *SUCLA2* són; hipotonia, retràs del desenvolupament, i quasi sempre, distonia progressiva i sordera neurosensorial. La depleció de mtDNA pot ser detectada en múscul, i els anàlisis enzimàtics mostres deficiències combinades de les activitats d'enzims del

metabolisme oxidatiu. S'han associat més de 30 pacients amb mutacions al gen *SUCLA2*, la majoria d'ells del nord d'Itàlia i de les illes Faroe, on hi ha un efecte fundador, amb una freqüència de portadors de $1/25^{42}$. En canvi, mutacions en el gen *SUCLG1* s'han descrit en unes poques famílies.

Mutacions en el gen *SUCLA2* o *SUCLG1* afecten a l'associació entre la succinil-CoA sintasa i la nucleòtid difosfat quinasa mitocondrial (figures 4 i 5), alterant l'equilibri del pool de nucleòtids mitocondrials i causant depleció de mtDNA. En el múscul, el grau de depleció acostuma a no ser molt elevat⁴⁴.

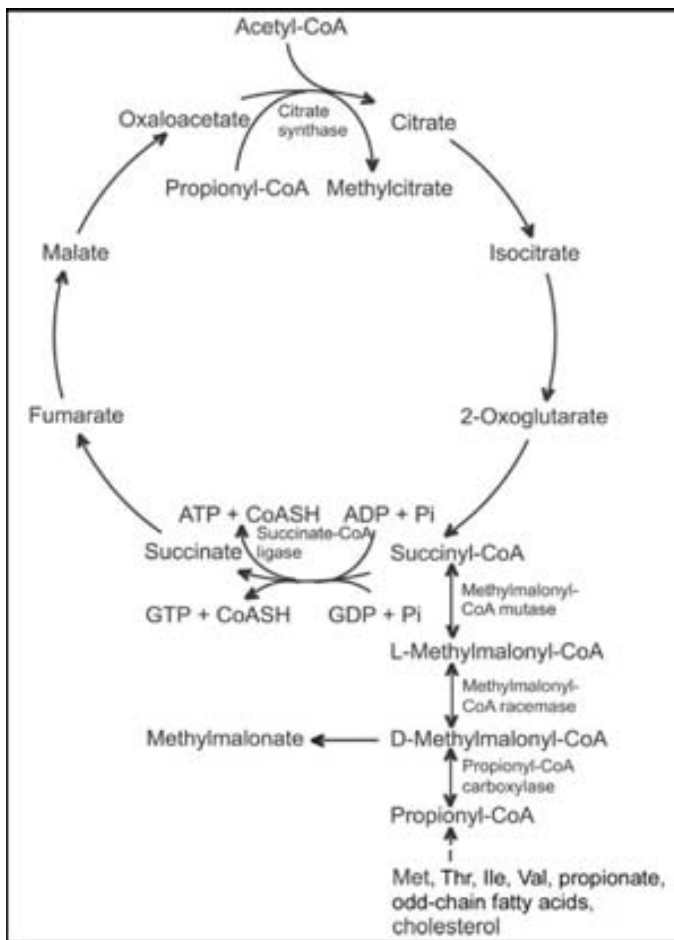


Figura 6. Cicle de Krebs i metabolisme de l'àcid metilmalònic.

Timidina fosforilasa (TP)

L'enzim timidina fosforilasa, essencial per a la ruta de salvament, està involucrada en el metabolisme citosòlic dels desoxiribonucleòtids i catalitza la fosforilació de timidina (dThd) o deoxiduridina a timina o uracil (Figura 4)⁴⁵. Un defecte de TP provoca un desequilibri important entre els dNTP, sobretot dels nucleòtids de timina, que no poden ser metabolitzats correctament i s'acumulen en fluids corporals. Una massiva acumulació de desoxitimidina trifosfat (dTTP) en la mitocondria interfereix amb el bon funcionament de la DNA polimerasa mitocondrial, provocant mutacions, delecions múltiples i deplecions en el mtDNA⁴⁶.

Mutacions al gen *TYMP* son la causa més freqüent del síndrome MNGIE, els trets clínics més característics són; ptosis, oftalmoparesis, dismotilitat gastrointestinal, caquèxia, neuropatia perifèrica i leucoencefalopatia⁴⁷. Mentre que la majoria dels pacients de MDS inicien els símptomes durant el període neonatal o durant la infància, els símptomes del defecte de TP s'inicien en durant l'adolescència i els pacients sobreviuen fins a l'edat adulta.

p53R2

El gen *RRM2B* codifica per una petita subunitat (la subunitat p53R2 induïble per p53) de la ribonucleòtid reductasa (RNR). La RNR és un enzim heterotetramèric responsable de la conversió dels ribonucleòtids difosfat a desoxiribonucleòtids difosfat, crucials per a la síntesi de DNA³³. Aquest enzim és el principal regulador dels nivells de nucleòtids en el citoplasma, i les seves subunitats s'expressen en cèl·lules postmitòtiques, on probablement té un paper clau regulador del pool de desoxiribonucleòtids per a la síntesi de DNA (figura 5).

Els pacients amb mutacions en el gen *RRM2B* acostumen a presentar hipotonia, acidosi làctica, retràs en el creixement i tubulopatia en els primers mesos de vida. La malaltia evoluciona ràpidament i provoca la mort del pacient durant els primers

mesos de vida. S'han descrit, fins al moment, 15 pacients que presenten aquest fenotip. Les mutacions en *RRM2B* que provoquen una deficiència total de l'enzim són causants de formes infantils i neonatals de depleció de mtDNA, amb una reducció dràstica del número de còpies de mtDNA en múscul³³.

Polimerasa gamma (POLG)

Mutacions en el gen *POLG1*, que codifica la subunitat catalítica de la polimerasa γ , representen el defecte nuclear més freqüent causant de malalties mitocondrials. Fins al moment s'han descrit més de 150 mutacions (<http://tools.niehs.nih.gov/polg>). L'enzim pol γ és la única polimerasa mitocondrial existent i està format per un domini exonucleasa amb funció *proofreading* localitzat en l'extrem N-terminal, i un domini polimerasa localitzat en l'extrem C-terminal i que s'encarrega principalment de la replicació del mtDNA. Com que juga un paper principal en la replicació del mtDNA, no és sorprenent que el seu defecte estigui associat a delecions i deplecions de mtDNA⁴⁸. Les malalties resultants de mutacions en el gen *POLG1* estan associades a un espectre de presentacions clíniques molt heterogènies; (i) formes dominants o recessives de PEO, (ii) atàxies juvenils espinocerebelars, amb o sense disàrtria, i al (iii) síndrome d'Alpers-Huttenlocher^{44, 49}.

Aproximadament unes 45 mutacions en el gen *POLG1* són causants del síndrome d'Alpers-Huttenlocher, una depleció de mtDNA de caràcter autosòmic recessiu caracteritzada per l'aparició de símptomes en edat pediàtrica; retard psicomotor, *epilepsia partialis continua* i fallida hepàtica en infants i nens^{50, 51}. La ressonància magnètica mostra anormalitats a nivell de ganglis basals i el tàlem, eixamplament irregular dels ventricles i paquigira parcial. Normalment els pacients, no tots, presenten una deficiència múltiple dels complexos de la CRM i depleció del mtDNA en fetge, però ambdós poden ser normals en múscul esquelètic. El quadre clínic es solapa amb el síndrome hepatocerebral, probablement un dels diagnòstics més severos de l'infància⁴⁴.

Mutacions en heterozigosi classificades com a severes, habitualment afectant a dominis d'unió al DNA o al centre catalític de la polimerasa, causen depleció de mtDNA i es manifesta en la infància amb afectació severa del fetge i cervell³¹. Les dues mutacions més comunes del gen *POLG1* detectades en pacients amb síndrome d'Alpers-Huttenlocher són la A467T i la W748S, i es poden presentar en homozigosi o en heterozigosi amb altres variants.

C10orf2 (Twinkle)

La proteïna mitocondrial Twinkle, codificada pel gen *C10orf2/PEO1*, és una helicasa replicativa del mtDNA, activa en forma de homohexàmer i unida al mtDNA en els nucleòids mitocondrials⁵². Mutacions en el gen *c10orf2* poden ser causants de malalties dominants, com PEO de presentació adulta associada a delecions múltiples del mtDNA, i de malalties recessives, com la hepatoencefalopatia severa de presentació neonatal/infantil o l'atàxia espinocerebelar associada amb depleció del mtDNA en cervell i fetge, però no en múscul³¹.

L'atàxia espinocerebelar infantil és una malaltia neurodegenerativa severa de caràcter autosòmic recessiu que es manifesta entre els 9-18 mesos de vida amb una atròfia progressiva del cerebel, del tron cerebral i del cordó espinal, atàxia durant els primers 2 anys, hipotonia i neuropatia sensorial axonal, atròfia òptica, pèrdua d'audició i oftalmoplegia³¹. Els pacients acostumes a sobreviure fins a edat adulta. El greu fenotip neurològic observat en aquests pacients, amb absència d'afectació muscular, suggereix que la proteïna Twinkle pot jugar un paper important en el manteniment i funció de subpoblacions neuronals específiques¹⁷. La forma hepatocerebral de MDS pot ser causada per diferents mutacions recessives en *C10orf2*⁵³.

MPV17

El gen *MPV17* codifica per una proteïna de membrana mitocondrial interna de funció desconeguda i el seu defecte causa depleció de mtDNA. Els pacients amb mutacions

en *MPV17* presenten, durant el primer mes de vida, els següents símptomes: fallida hepàtica severa, hipoglucèmia, retràs de creixement, símptomes neurològics i múltiples lesions cerebrals⁵⁴. Les alteracions bioquímiques més representatives d'aquest pacients serien les múltiples deficiències de la CRM associades a una severa depleció de mtDNA en fetge. Les activitats de la CRM i els nivells de mtDNA també es poden veure afectats en teixit muscular, tot i que alguns pacients poden presentar valors normals⁵⁵. Anàlisis histològics del fetge mostren hepatòcits d'aspecte inflat i granular, esteatosi microvesicular i fibrosi focal pericel·lular i periportal.

1.2.3. Diagnòstic dels síndromes

El diagnòstic de les deplecions de mtDNA es realitza mitjançant l'anàlisi per Southern-blot o per PCR quantitativa a temps real (qRTPCR). En ambdues metodologies, la quantitat de mtDNA s'estudia relacionant el nombre de còpies d'un gen mitocondrial amb el número de còpies d'un gen nuclear de referència. Per tal de determinar i interpretar correctament el contingut de mtDNA d'una mostra cal considerar la dinàmica natural del contingut de mtDNA en diferents teixits i edats del pacient i és important establir bons controls que tinguin en compte aquests factors^{56,57}.

1.2.4. Consell genètic, diagnòstic prenatal i tractament de les MDS.

Deguda la complexitat de la genètica i bioquímica mitocondrial, tota la informació referent al fenotip clínic, la història familiar, les dades del laboratori i la neuroimatge ha de ser integrada per encarar el diagnòstic i el consell genètic. Si la malaltia mitocondrial és deguda a una mutació en el genoma nuclear, la cerca de mutacions en vellositats corials a les 10 setmanes de gestació o el diagnòstic genètic preimplantacional són les opcions més vàlides.

No existeix una teràpia efectiva per a les malalties mitocondrials. Tot i així, mesures de suport, com millora la nutricional, suplementes vitamínics, cofactors i substrats

“respiratoris”, el tractament de les convulsions, la correcció dels nivells de làctic i altres complicacions poden millorar problemes específics dels pacients i millorar la qualitat de vida en alguns casos. Si no desenvolupen símptomes neurològics, el trasplantament de fetge pot ser beneficiós per a pacients amb hepatopatia causada per mutacions en el gen *DGUOK*, tot i que es desaconsella per la possible aparició posterior d’una afectació neurològica⁴⁰. En pacients MPV17, s’ha dut a terme 10 trasplantaments, 5 dels quals van morir posteriorment de fallida multiorgànica i sèpsis. Mentre que els altres 5, portadors de la mutació relativament lleu p.R50Q, van desenvolupar símptomes neurològics⁵⁸⁻⁶⁰. Una dieta controlada, evitant hipoglucèmies, amb una combinació de CoQ10 i una dieta rica en greixos, han demostrat reduir la velocitat de progressió de la hepatopatia en pacients MPV17^{61, 62}. El diagnòstic genètic correcte és de vital importància en casos com la polidistrofia d’Alpers-Huttenlocher, ja que, en aquests pacients, l’administració de valproat per controlar les convulsions poden desencadenar una fallida hepàtica fulminant. En pacients MNGIE, l’hemodiàlisi i la transfusió repetida de plaquetes ha demostrat ser eficaç a l’hora de disminuir els nivells de timina en sang^{63, 64}. El trasplantament allogenètic de cèl·lules de moll d’os (stem cells) ha tingut èxit alhora de restaurar certa activitat TP i disminuir els nivells de timina en plasma⁶⁵.

1.3. Cofactors del metabolisme energètic mitocondrial.

En el procés d’obtenció d’ATP, a part de l’adequada funcionalitat de totes les proteïnes enzimàtiques, la mitocòndria necessita una adequada absorció, transport i biosíntesis de molècules de mida petita anomenades cofactors. A continuació descriurem l’estat actual del coneixement científic dels principals cofactors del metabolisme energètic mitocondrial en humans; l’àcid lipoic, la tiamina, la riboflavina, el coenzim Q10 i els clústers de Fe-S (figura 7).

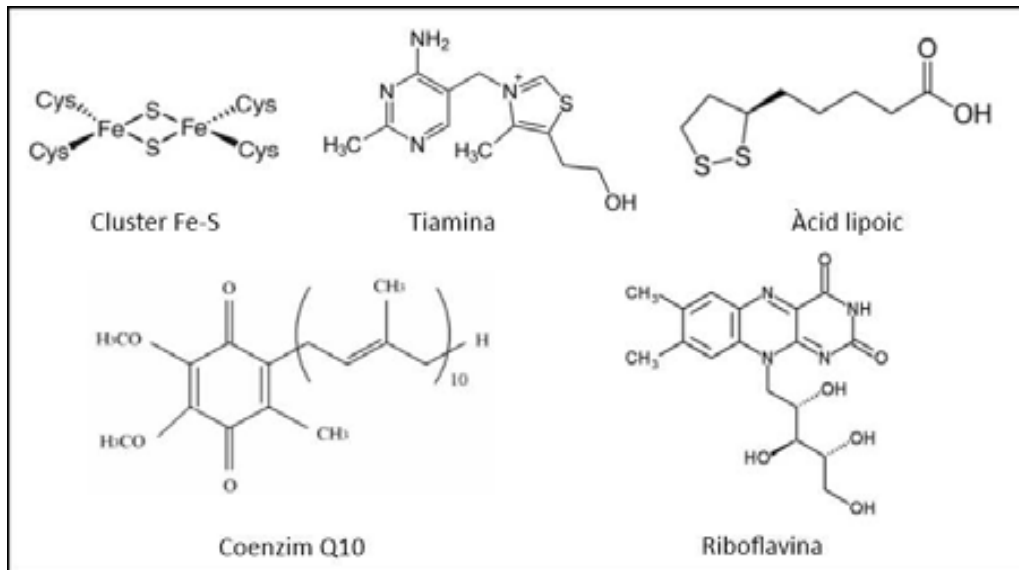


Figura 7. Principals cofactors del metabolisme energètic mitocondrial.

1.3.1. Àcid lipoic

L'àcid lipoic és un cofactor essencial per a l'activitat de tres complexes cetoàcid deshidrogenasa; la piruvat deshidrogenasa (PDH), la alfa-cetoglutarat deshidrogenasa (α -KGDH) i la deshidrogenasa de alfa-cetoàcids de cadena ramificada (BCKDH), implicats en la descarboxilació oxidativa del piruvat, alfa-cetoglutarat i els aminoàcids ramificats, respectivament. A més a més, l'àcid lipoic també és un cofactor implicat en el sistema d'escissió de la glicina o *glycine cleavage system* (GCS). Aquest cofactor es sintetitza dins la mitocondria mitjançant múltiples reaccions enzimàtiques, incloent la síntesi d'àcid octanoic via àcid gras sintasa (FASII) unit a la proteïna transportadora de grups acil (ACP)⁶⁶. Un cop sintetitzat l'àcid octanoic, aquest serà transferit a una lisina conservada de les subunitats E2 de les mencionades deshidrogenases (PDH, KGCH i BCKDH) i a la proteïna H del sistema GCS. Finalment, s'introduiran dos grups sulfur en les posicions 6 i 8 per l'acció de l'enzim àcid lipoic sintasa (LAS) la qual es troba altament conservada tan en procariotes com en eucariotes, i a diferència del que

passa en *Escherichia coli*, els eucariotes són estrictament dependents de la síntesi endògena d'àcid lipoic dins de la mitocòndria⁶⁷.

1.3.2. Tiamina

La tiamina o vitamina B1 és una substància aromàtica hidrosoluble, la seva demanda diària en un adult és aproximadament de 0.2 mg/dia. Aquesta vitamina s'absorbeix en l'intestí prim en forma de tiamina o de tiamina monofosfat, però la forma activa com a cofactor és la tiamina pirofosfat (TPP). La TPP és un cofactor essencial de la transketolasa citosòlica i de tres enzims mitocondrials: PDH, KGDH i BCKDH. El seu metabolisme complert en mamífers requereix del transport intracel·lular de la tiamina o de la tiamina monofosfat. S'han descrit dues isoformes del transportador, codificades pels gens *SLC19A2* i *SLC19A3*. Un cop dins la cèl·lula, la tiamina o tiamina monofosfat és fosforilada per acció de la tiamina pirofosfat quinasa, que generarà TPP i podrà ser transportada dins de la mitocòndria a través del transportador codificat pel gen *SLC25A19* (OMIM#249270, #607483, #603941). A part dels pacients identificats amb defectes dels diferents transportadors, molt recentment s'han identificat cinc pacients amb mutacions al gen *TPK1* que codifica per a l'enzim tiamina pirofosfat quinasa⁶⁸. Clínicament els pacients presenten una patologia eminentment neurològica, de presentació infantil. El fenotip bioquímic es caracteritza per l'acidèmia làctica, l'augment de 2-cetoglutarat en orina, deficiència de PDH (si s'elimina el cofactor tiamina de la prova enzimàtica) i la deficiència de tiamina pirofosfat tan en múscul com en fibroblasts.

1.3.3. Riboflavina

La riboflavina o vitamina B2 és el precursor de la flavina adenina dinucleòtid (FAD) i de la flavina mononucleòtid (FMN), ambdós són cofactors essencials de nombroses deshidrogenases implicades en el metabolisme energètic mitocondrial, com per

exemple: les deshidrogenases de la β -oxidació d'àcids grassos, el component E3 de PDH, KGDH, BCKDH i la succinat deshidrogenasa⁶⁹. A més, el FAD es sintetitza en el citosol i ha de ser transportat dins de la mitocondria⁷⁰. Recentment s'han descrit dos defectes diferents en els transportadors de riboflavina: *GPR172B* o *RTF1*⁷¹ (MIM#607883) i *C20orf54* o *RTF2*⁷² (MIM#613350). Ambdós defectes presenten un perfil bioquímic similar a una forma lleu de deficiència múltiple d'acil-CoA deshidrogenases, i els pacients responen a l'administració de B2. S'han descrit pacients amb resposta a la riboflavina associats a mutacions al gen *ETFDH*⁷³, probablement situades en la regió d'unió amb FAD. En l'actualitat no es coneixen malalties metabòliques hereditàries associades a deficiència de la biosíntesi de FMN/FAD, encara que s'han descrit pacients amb resposta a la riboflavina sense causa genètica⁷⁴.

1.3.4. Coenzim Q10

El coenzim Q₁₀ (CoQ₁₀) forma part de la família dels compostos ubiquinona. Tots els animals, incloent l'home, poden sintetitzar ubiquinones, per tant el CoQ₁₀ no es podria considerar una vitamina⁷⁵. Les ubiquinones són molècules liposolubles amb unitats d'isoprè de 5 carbonis repetides (des d'una a dotze repeticions). La ubiquinona d'humans, o coenzim Q₁₀, té una cua de 10 isoprens unida al cap de benzoquinona⁷⁶ (figura 7).

El coenzim Q₁₀ el produeixen la majoria dels teixits humans i la seva síntesi es pot dividir en tres grans passos: (i) la síntesi de l'estructura benzoquinona a partir de dos aminoàcids, tirosina o fenilalanina; (ii) la síntesi de la cadena lateral d'isoprens a partir d'acetil-CoA via mevalonat; i (iii) la unió d'aquestes dues estructures. L'enzim hidroximetilglutaril (HMG)-CoA reductasa juga un paper molt important en la regulació de la síntesi de coenzim Q₁₀^{77,78}.

El coenzim Q₁₀ és soluble en lípids i es troba en totes les membranes cel·lulars, com també en les lipoproteïnes⁷⁹. La habilitat del grup benzoquinona d'acceptar i donar

electrons i el seu rol dins de la CRM és de vital importància dins del metabolisme energètic mitocondrial. La seva funció dins la CRM és la d'acceptar electrons generats pels complexos I i II, així com els transferits des de la flavoproteïna deshidrogenasa transferidora d'electrons (ETF-DH), i els dona al complex III (figura 2). Al mateix temps transfereix protons a l'espai intermembrana, contribuint a la formació del gradient de protons d'hidrogen⁸⁰. Dins el lisosoma, el CoQ_{10} podria estar involucrat en el transport de protons per a mantenir el pH òptim dins d'aquests orgànuls⁸¹. En la seva forma reduïda, el CoQ_{10} és un potent antioxidant liposoluble.

Les deficiències de CoQ_{10} no s'han descrit en població general, per tant s'assumeix que una dieta variada i la biosíntesi endògena produeixen suficient CoQ_{10} en individus sans⁸². Les deficiències primàries de CoQ_{10} són causades per defectes genètics autosòmics recessius en la via de la biosíntesi de Q_{10} . En aquestes deficiències els baixos nivells de coenzim Q_{10} afecten de manera severa la funció muscular i neuronal de l'organisme.

La suplementació oral de Q_{10} ha demostrat ser eficaç a l'hora de millorar la simptomatologia clínica dels pacients amb dèficits primaris de CoQ_{10} ⁸³. La suplementació de CoQ_{10} també ha demostrat ser clínicament eficaç en pacients afectes d'encefalomiopaties mitocondrials que presentaven defectes de la CRM⁸⁴.

Nivells baixos de coenzim Q_{10} en plasma s'han associat a diverses patologies, com la diabetis, càncer i la fallida cardíaca congestiva. També s'han descrit nivells baixos de CoQ_{10} en pacients sota tractament amb inhibidors de la HMG-CoA reductasa, ja que és un enzim clau en la biosíntesi de colesterol i CoQ_{10} .

1.3.5. Clústers de sulfur de ferro (Fe-S).

1.3.5.1. Estructura i funció dels clústers Fe-S.

Els clústers de sulfur de ferro (Fe-S) són un dels cofactors més antics que es coneixen i participen en processos de regulació, transferència d'electrons i catàlisis⁸⁵. Els clústers més simples que existeixen serien del tipus [2Fe-2S] i [4Fe-4S], que contenen ferro en

forma fèrrica (Fe^{3+}) o ferrosa (Fe^{2+}) i sulfit (S^{2-}). Aquests clústers estan integrats en les proteïnes mitjançant la coordinació dels ions de Fe a través de residus de cisteïna o histidina (figura 8).

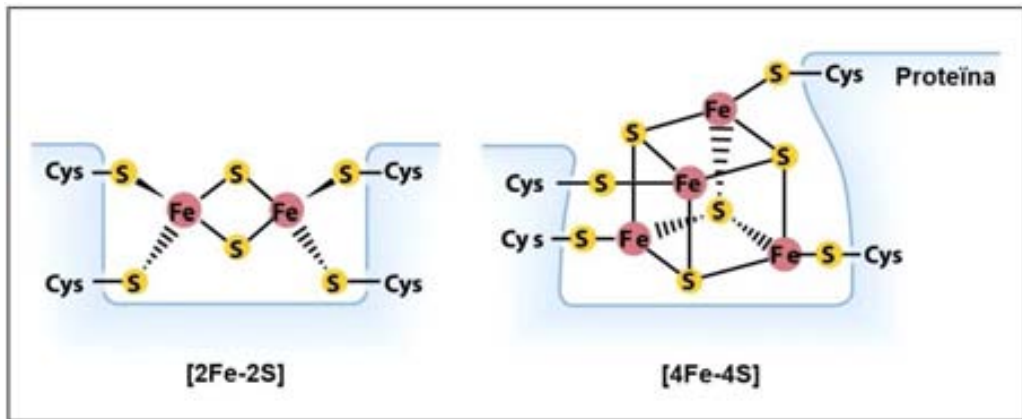


Figura 8. Estructura dels clústers de sulfur de ferro més característics: [2Fe-2S] i [4Fe-4S].

A través de la bioquímica s'han aconseguit acoblaments de clústers Fe-S en proteïnes *in vitro*, però estudis genètics i de biologia cel·lular han demostrat que la síntesi i maduració dels clústers Fe-S no és un procés que es dona espontàniament, sinó que es tracta d'un seguit de reaccions enzimàtiques ben coordinades i altament regulades. Tot i que l'estructura dels clústers Fe-S és molt simple, el procés pel qual es formen és molt complex i requereix de nombrosos elements. Estudis pioners en bacteris han demostrat l'existència de tres sistemes diferents de biosíntesi de les proteïnes Fe-S; el sistema NIF, específic per a la maduració de la nitrogenasa en bacteris azototròfics, l'acoblament per la maquinària ISC i el sistema NUF per a la generació de proteïnes Fe-S *housekeeping* sota situacions normals i d'estres oxidatiu, respectivament^{86, 87}. Els dos últims sistemes mencionats han estat heretats pels eucariotes i contenen molts elements homòlegs al sistema d'acoblament bacterià ISC. Dins la mitocondria dels eucariotes trobem el sistema d'acoblament ISC^{88, 89} i dins dels plastidis hi trobem els components del sistema SUF⁹⁰.

En eucariotes podem trobar proteïnes Fe-S en la mitocòndria, citosol i nucli. Estan involucrades en funcions molt diverses com el cicle de Krebs, la biosíntesi d'aminoàcids, la respiració mitocondrial, la biosíntesi de cofactors, l'acoblament ribosomal, la regulació de la transcripció de proteïnes, la replicació i la reparació del DNA. El model cel·lular per excel·lència a l'hora d'estudiar la biosíntesi de les proteïnes Fe-S ha estat el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Investigacions recents en cultius cel·lulars humans i ratolins transgènics han demostrat que el procés que es dona en llevats està altament conservat en humans^{91, 92}.

En els primers estudis en eucariotes es va saber que la mitocòndria jugava un paper clau en la formació d'aquestes proteïnes i que era necessària per a la biogènesi de totes les proteïnes Fe-S, no només les mitocondrials^{93, 94}.

1.3.5.2. Biosíntesi de clústers Fe-S.

La biosíntesi de proteïnes Fe-S mitocondrials es duu a terme gràcies a la maquinària d'acoblament ISC i ha estat heretada de les bactèries durant la evolució. Al menys 15 proteïnes estan involucrades en aquest complex procés biosintètic que pot ser subdividit en dos grans passos⁹⁵ (figura 9). El primer pas és la formació *de novo* del clúster Fe-S sobre una proteïna que serveix de plataforma d'acoblament i unió, en llevat aquesta proteïna *scaffold* s'anomena Isu1, ISCU en humans⁹⁶ (Taula 3). El segon pas és la transferència d'aquest clúster Fe-S de ISCU a les apoproteïnes dianes per a la incorporació del clúster i formació de l'holoproteïna Fe-S. Aquests dos passos necessiten de l'assistència i l'actuació coordinada de diferents components de la maquinària d'acoblament ISC. L'acoblament del clúster Fe-S sobre la proteïna ISCU depèn de la funció d'un complex enzimàtic anomenat cisteïna desulfurasa, format per Nfs1 i Ind11^{97, 98}. Tot i que la funció desulfurasa la duu a terme la proteïna Nfs1, que allibera sofre d'un residu de cisteïna per formar alanina, el complex amb Ind11 és necessari per a la correcta interacció entre Nfs1 i la proteïna ISCU. La subseqüent unió amb el Fe formarà el clúster Fe-S per un mecanisme que encara es desconeix. La

frataxina (FXN) funciona com a donador de Fe en la interacció amb Isu1-Nfs1, tot i que la funció d'aquest petit polipèptid segueix sent controvertit⁹⁹⁻¹⁰¹. El ferro és importat dins la matriu mitocondrial en la seva forma Fe^{2+} , aquest procés requereix un potencial de membrana facilitat per les proteïnes mitoferrina 1 (MFRN1, SLC25A37) i mitoferrina 2 (MFRN2, SCL25A28)^{102, 103}. En llevat, la correcta formació del clúster Fe-S depèn també de la transferència d'electrons de la proteïna ferredoxina Yah1 i de la ferredoxina reductasa Arh1, acoblats a la oxidació de NADH. Aquests electrons seran utilitzats en la reducció del sofre (S^0) a sulfid (S^{2-}). En mamífers, els homòlegs corresponents a la ferredoxina reductasa (FdxR) i la ferredoxina (Fdx1 o Fdx1L) serien les encarregades de dur a terme aquest pas.

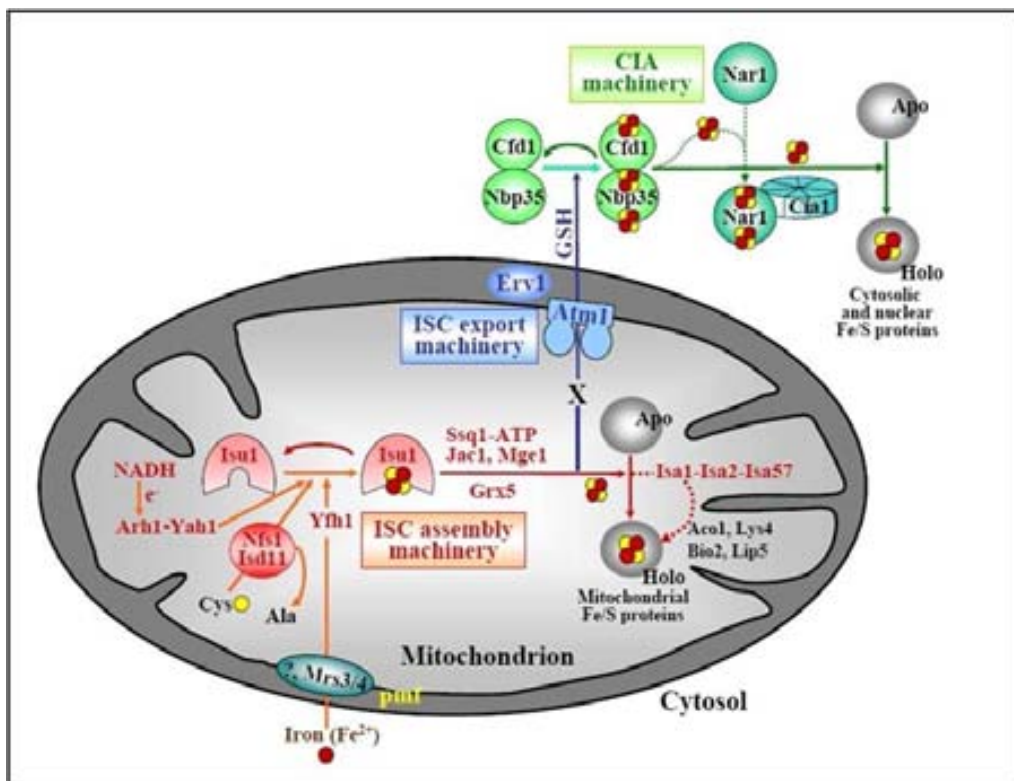


Figura 9. Esquema dels principals passos en la biosíntesi mitocondrial i citosòlica de proteïnes Fe-S.

El segon gran pas en la biosíntesi de les proteïnes Fe-S implica l'alliberament del clúster del seu lligam amb ISCU. Aquest clúster alliberat s'haurà de transferir i acoblar a les apoproteïnes receptores mitjançant enllaços coordinats dels seus aminoàcids. Aquest procés està específicament assistit per la glutaredoxina monothiol mitocondrial (GRLX5)^{104, 105}. En llevat també trobem involucrades un sistema de chaperones específic; la Ssq1 de la família de proteïnes Hsp70, la cochaperona Jac1 DnaJ-like i el factor d'intercanvi nucleotídic Mge1¹⁰⁶. En mamífers també trobem homòlegs molt propers a aquestes chaperones (Taula 3).

La maduració de les proteïnes Fe-S en el citosol i nucli depèn del bon funcionament del sistema mitocondrial d'acoblament ICS. Aparentment, el funcionament de ISC és de vital importància per la formació de proteïnes Fe-S extramitocondrials. Aquest fet és degut a que el sistema ISC produeix un factor X que es creu seria la font de sofre per a la formació de nous clústers en el citosol (figura 9). La reacció de transport fora de la mitocòndria d'aquest factor X la duria a terme la proteïna de MMI Atm1 (ABCB7 en mamífers). La sulfidril oxidasa Erv1 (ALR humana), situada a l'espai intermembrana, i la glutatona (GSH) també serien requerides en aquest procés. Aquests tres components es coneixen com la maquinària d'exportació ISC.

La biogènesi de clústers Fe-S en el citosol i nucli està catalitzada pel sistema d'acoblament citosòlic Fe-S (CIA)¹⁰⁶. Aquest procés també es pot subdividir en dos grans passos o reaccions parcials¹⁰⁷; primer es forma i s'acobla un clúster Fe-S transitori en les NTPases P-loop Cfd1 i Nbp35. Seguidament, aquest clúster Fe-S es transfereix a les apoproteïnes mitjançant les proteïnes Nar1, Cia1 i Cia2, els homòlegs mamífers serien IOP1¹⁰⁸ i CIAO1¹⁰⁹. La maduració de les proteïnes Fe-S nuclears encara es desconeix. Poden ser acoblades en el citoplasma per posteriorment ser transportades en el nucli en la seva forma holo, o bé l'acoblament de la proteïna Fe-S té lloc en el nucli. S'han trobat evidències de petites quantitats de components del sistema CIA dins del nucli (Cdf1, Nbp35, Nar1 i Cia2), fent plausible ambdós escenaris a l'hora de formar proteïnes Fe-S nuclears.

Taula 3. Principals components de la via de síntesi de clusters Fe-S.

Proteïna	Homòleg <i>S.Cerevisiae</i>	Localització	Funció	Deficiència associada
Maquinària d'acoblament ISC				
NFS1	Nfs1	MM, N	Donador sofre	-
ISD11	Isd11	MM, N	Forma complex amb Nfs1	-
FDXR	Arh1	MM, MMI	Ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	-
FDX1	Yah1	MM	Transport d'electrons	-
FDX1L	Yah1	MM	Transport d'electrons	-
MFRN1	Mrs3, Mrs4	MMI	Transport ferro	-
MFRN2	Mrs3, Mrs4	MMI	Transport ferro	-
FXN	Yfh1	MM / C(?)	Unió i donador ferro	Atàxia de Friedreich
ISCU	Isu1, Isu2	MM	Proteïna <i>scaffold</i>	Miopatia amb intolerància a l'exercici
GLRX5	Grx5	MM	Transferència cluster	Anèmia microcítica
Grp75	Ssq1	MM / C(?)	Transferència cluster	-
HSCB	Jac1	MM	Transferència cluster	-
GrpE-L1/2	Mge1	MM	Transferència cluster	-
Maquinària d'exportació ISC				
ABCB7	Atm1	MMI	Translocació del factor X a la maquinària CIA	Anèmia sideroblàstica lligada al cromosoma X amb atàxia cerebel·lar
ALR	Erv1	EIM	?	Miopatia mitocondrial amb cataractes i deficiència múltiple de CRM.

GSH	GSH	M / C	?	-
Maquinària CIA				
NBP35	Nbp35	C	Proteïna <i>scaffold</i>	-
CFD1	Cfd1	C	Proteïna <i>scaffold</i>	-
IOP1	Nar1	C / N	Transferència cluster	-
CIAO1	Cia1	C / N	Transferència cluster	-

1.3.5.3. Defectes de la biogènesi de proteïnes Fe-S.

Més de 20 components de la maquinària ISC i CIA son essencials per a la viabilitat de cèl·lules humanes i de llevat^{110, 111}. De fet, la biogènesi de proteïnes Fe-S és l'única funció de la mitocòndria que és indispensable per a la viabilitat de cèl·lules de llevat. Els llevats amb mutacions en el sistema OXPHOS tenen defectes de creixement, però en un medi amb glucosa continuen vivint.

La importància de la biogènesi de proteïnes Fe-S està molt ben documentada per les múltiples malalties associades a defectes en diversos components de la maquinària de biosíntesi de clusters de Fe-S (Taula 1). A continuació es comenten breuement els casos ben coneguts de malalties associades a defectes en la síntesi de clusters de Fe-S.

Atàxia de Friedreich (FRDA)

Està causada per una deficiència de la frataxina i és la causa d'atàxia recessiva més comuna. El defecte és causat majoritàriament per una repetició d'un triplet GAA en el primer exó del gen *FXN*¹¹². El defecte de *FXN* es manifesta com una degeneració progressiva del sistema nerviós central i perifèric amb cardiomiopatia hipertròfica. La funció molecular de la frataxina no és clara del tot, però quan està alterada, proteïnes mitocondrials i extramitocondrials es veuen alterades en models de cultiu cel·lular¹¹³, en models animals^{114, 115} i en teixit cardíac de pacients FRDA. Aquest efecte sobre

altres proteïnes Fe-S seria l'efecte més devastador de la deficiència, mentre que l'acumulació de Fe i les seves conseqüències apareixerien més tard. També s'ha suggerit que la frataxina estaria involucrada en la biosíntesi del grup hemo, tot i així, els pacients FRDA no presenten anèmia i que els nivells de frataxina disminueixen durant la diferenciació d'eritròcits¹¹⁶.

Miopatia amb intolerància a l'exercici; miopatia hereditària amb acidosi làctica

En la dècada dels 60 es van descriure una miopatia hereditària on els pacients presentaven una moderada o severa acidosi amb intolerància al exercici¹¹⁷. Més tard es va demostrar que aquests pacients tenien afectat el complex II de la CRM¹¹⁸, l'activitat aconitasa i que presentaven dipòsits de Fe dins les mitocòndries¹¹⁹. També es van observar diversos efectes sobre altres proteïnes Fe-S, incloent la subunitat Rieske del complex III i varies subunitats del complex I¹²⁰. Recentment es va descobrir el defecte genètic associat a aquesta patologia, una mutació d'*splicing* en el gen codificant per la proteïna ISCU^{121, 122}.

Deficiència de GLRX5

La proteïna GLRX5 és un altre membre de la maquinària mitocondrial d'acoblament de clusters de Fe-S. Funciona a un nivell inferior de ISCU, facilitant la dissociació del cluster cap a proteïnes diana^{123, 124}. Quan la proteïna GLRX5 és deficient, es bloqueja la transferència de clusters de Fe-S i augmenta l'expressió de la proteïna reguladora de Fe (IRP1). Quan els nivells de ferro dins la cèl·lula són baixos disminueix l'expressió de la isoforma de la γ -aminolevulinic àcid sintasa específica eritroide (ALAS2), enzim limitant de la síntesi de protoporfirina IX i del grup hemo. El primer pacient descrit amb deficiència de GLRX5 va presentar anèmia microcítica, sobrecàrrega de Fe i anells sideroblàstics¹²⁵.

Anèmia sideroblàstica amb atàxia cerebel·lar lligada al cromosoma X

Aquesta malaltia està causada per una mutació *missense* (I400M) en el transportador ABC de la membrana mitocondrial interna ABCB7¹²⁶⁻¹²⁸. La manifestacions clíniques d'aquesta malaltia inclouen una atàxia spinocerebel·lar no progressiva, una severa hipoplàsia cerebel·lar selectiva acompanyada d'una lleugera anèmia hipocròmica i microcítica^{129, 130}. La proteïna ABCB7 juga un paper molt important en el sistema de exportació de la maquinària d'acoblament de clusters de Fe-S. Si aquests sistema no funciona bé, la maquinària citosòlica d'acoblament de Fe-S es veu afectada i hauria una deficiència de proteïnes Fe-S extramitocondrials¹³¹⁻¹³³.

2. Objectius

La causa primària de la patologia en un bon nombre pacients amb acidèmia làctica i en general en pacients amb trastorns del metabolisme energètic mitocondrial roman encara desconeguda. Per aquest motiu ens varem proposar esbrinar les causes genètiques de la malaltia en dos grups de pacients en els que sovint no s'aconsegueix un diagnòstic etiològic: pacients amb possible depleció de DNA mitocondrial i pacients amb alteració de múltiples marcadors del metabolisme energètic mitocondrial.

Per aconseguir aquests objectius ens varem proposar els següents objectius concrets:

1.- Pacients amb possible depleció de DNA mitocondrial

1.1.- Estratificació dels pacients en base a la selecció clínica, a la caracterització del fenotip bioquímic i a l'anàlisi del número de còpies de DNA mitocondrial.

1.2.- Seqüenciació dels gens candidats en base a l'estratificació prèvia i validació funcional de la patogènia de les mutacions trobades.

2.- Pacients amb alteració de múltiples marcadors del metabolisme energètic mitocondrial.

2.1.- Estratificació dels pacients en base a la selecció clínica i a la caracterització del fenotip bioquímic.

2.2.- Cerca de gens implicats en la patologia mitjançant mapatge per homozigositat o mitjançant altres tècniques de seqüenciació massiva.

2.3.- Validació funcional del gen i de les mutacions trobades com a causa de la patogènia.

3. Resultats: publicacions

Article 1

Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and use of citrate synthase as a helpful tool to better characterize the patients.

Navarro-Sastre A, Tort F, Garcia-Villoria J, Pons MR, Nascimento A, Colomer J, Campistol J, Yoldi ME, López-Gallardo E, Montoya J, Unceta M, Martinez MJ, Briones P, Ribes A.

Revista: Molecular Genetics and Metabolism. 2012 Agost [Epub ahead of print].

Factor d'impacte: 3,193

La realització d'aquest treball ha permès la posta a punt de la quantificació del número de còpies de DNA mitocondrial (mtDNA) per tal de poder arribar al diagnòstic de pacients amb el síndrome de depleció de mtDNA (MDS), un síndrome que comporta una pèrdua progressiva de mtDNA i que està causada per mutacions en gens implicats en la replicació del mtDNA o de la homeòstasi del nucleòtids trifosfat. En aquests treball s'han estudiat un total de 50 pacients pediàtrics amb sospita de patir el síndrome de la depleció del mtDNA (MDS). Aquests pacients van ser dividits en tres grups diferents i els gens MDS van ser estudiats depenent del fenotip bioquímic i clínic presentat. L'estudi mutacional dels gens *DGUOK*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1* i *POLG* ens van permetre identificar 3 mutacions noves (c.1048G>A i c.1049G>T en el gen *SUCLA2* i c.531+4A>T en el gen *SUCLG1*) i 7 mutacions descrites prèviament en un total de 10 pacients (8 famílies). Disset pacients van presentar depleció de mtDNA en fetge o múscul, però la causa de la depleció encara es desconeix en 8 d'ells. Quan va ser possible, es va quantificar el ràtio mtDNA/nDNA i la citrat sintasa en la mateixa mostra de teixit, proveint noves dades per l'estudi de les MDS. La depleció relacionada amb la citrat sintasa ((mtDNA/nDNA)/CS) ha donat resposta a certes discrepàncies observades entre els resultats de depleció i els resultats de la CRM en alguns pacients.

El doctorand, primer autor d'aquesta publicació, ha tingut tot el protagonisme en l'obtenció experimental de les dades, entre elles; (i) la posta a punt del mètode analític que permet la quantificació del nombre de molècules de DNA mitocondrial en diversos teixits, (ii) els valors control en individus control, (iii) els valors de depleció de pacients, (iv) l'estudi i diagnòstic molecular de tots els pacients, (v) la confirmació patològica experimental d'aquelles mutacions no descrites i (vi) ha participat amb gran protagonisme en la discussió dels resultats.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme



Mitochondrial DNA depletion syndrome: New descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients

Aleix Navarro-Sastre ^{a,i}, Frederic Tort ^{a,i}, Judit Garcia-Villoria ^{a,i}, Mónica Ruiz Pons ^b, Andrés Nascimento ^c,
Jaume Colomer ^c, Jaume Campistol ^c, Maria Eugenia Yoldi ^d, Ester López-Gallardo ^{e,i}, Julio Montoya ^{e,i},
Maria Unceta ^f, Maria Jesús Martínez ^g, Paz Briones ^{a,h,i}, Antonia Ribes ^{a,i,*}

^a Division of Inborn Errors of Metabolism, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Instituto de Investigación Biomédica IV Sanyer, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Pediatric Nutrition and Metabolism, Hospital Universitario N.S. de la Candelaria, Tenerife, Islas Canarias, Spain

^c Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^d Department of Pediatrics, Hospital Virgen del Camino, Pamplona, Spain

^e Biochemistry and Molecular and Cellular Biology Department, Universidad de Zaragoza, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

^f Biochemistry Department, Hospital Universitario de Cruces, Bizkaia, Spain

^g Neuropediatrics Department, Hospital Universitario de Cruces, Bizkaia, Spain

^h Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 08028 Barcelona, Spain

ⁱ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2012

Accepted 25 August 2012

Available online xxxxx

Keywords:

mtDNA depletion

SUCLA2

SUCLG1

DGLUOK

MPV17

POLG

ABSTRACT

Mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is a clinically heterogeneous group of mitochondrial disorders characterised by a quantitative reduction of the mitochondrial DNA copy number. Three main clinical forms of MDS: myopathic, encephalomyopathic and hepatocerebral have been defined, although patients may present with other MDS associated clinical symptoms and signs that cover a wide spectrum of onset age and disease. We studied 52 paediatric individuals suspected to have MDS. These patients have been divided into three different groups, and the appropriate MDS genes have been screened according to their clinical and biochemical phenotypes. Mutational study of DGLUOK, MPV17, SUCLA2, SUCLG1 and POLG allowed us to identify 3 novel mutations (c.1048G>A and c.1049G>T in SUCLA2 and c.531+4A>T in SUCLG1) and 7 already known mutations in 10 patients (8 families). Seventeen patients presented with mtDNA depletion in liver or muscle, but the cause of mtDNA depletion still remains unknown in 8 of them. When possible, we quantified mtDNA, ndNA and CS activity in the same tissue sample, providing an additional tool for the study of MDS. The ratio (mtDNA/ndNA):CS has shed some light in the discrepant results between the mtDNA copy number and the enzymatic respiratory chain activities of some cases.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is a clinically heterogeneous group of mitochondrial disorders characterised by a reduced copy number of mtDNA or mtDNA depletion. This syndrome has been reported to be inherited as an autosomal recessive trait [1]. Patients affected by this group of diseases present with a wide variety of symptoms depending on the altered gene.

Patients carrying mutations in DGLUOK [2] (OMIM *601456) present with the hepatocerebral form of MDS, which is a multisystem disorder with a significant liver involvement; although some patients present with an isolated hepatic disease in late infancy or childhood [3]. In the first year of life, MPV17 [4] (OMIM *137960) patients

present with hypoglycaemia, jaundice and elevated levels of lactate and hepatic enzymes in blood. Most of the MPV17 patients die of liver failure during the first year of life and those who survive the early liver dysfunction develop neurological symptoms [5]. Mutations in C10orf2 [6] (OMIM *606075) can cause dominant disorders characterised by multiple mtDNA deletions and pure progressive external ophthalmoplegia (PEO), as well as recessive MDS with neonatal or infantile hepatocerebralopathy and infantile onset spinocerebellar ataxia (IOSCA) [6–8]. The POLG [9] (OMIM *174763) related disorders are currently defined by several neurodegeneration phenotypes that include Alpers–Huttenlocher syndrome, ataxia–neuropathy syndromes, autosomal recessive PEO and autosomal dominant PEO [10–12]. The first described patients that carried RRM2B [13] (OMIM *604712) mutations presented with severe trunk hypotonia, lactic acidosis and proximal tubulopathy [14]; but, less severe clinical presentations were also reported, including MNGIE-like syndrome [15] and a patient with adult onset mitochondrial myopathy with mtDNA deletions [16]. TK2 [17] (OMIM *188250) defects have been

* Corresponding author at: Sección de Errores Congénitos del Metabolismo (IBC), Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Edificio Helios III, planta baja, C/Mejía Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 227 56 68.
E-mail address: aribes@clinic.cat (A. Ribes).

ARTICLE IN PRESS

2

A. Navarro-Sastre et al. / Molecular Genetics and Metabolism xxx (2012) xxx–xxx

associated with a wide phenotypic spectrum, including spinal muscular atrophy (SMA)-like motor neuron disease [18], rigid-spine syndrome [19], mild myopathic phenotype associated with longer survival [19] and severe muscular atrophy with marked weakness, sometimes combined with encephalopathy and seizures [20]. *SUCLA2* [21] (OMIM *603921) defects present with muscle hypotonia, severe psychomotor retardation, impaired hearing, general seizures followed by knee and hip contractures, finger dystonia and ptosis [21–23]. *SUCLG1* [24] (OMIM *611224) defects are associated with a more severe phenotype, including a combination of muscle and liver dysfunction and dysmorphic features [24], but similar phenotypes to that of patients with *SUCLA2* mutations have been described [25,26]. A characteristic metabolic profile (mild increase of methylmalonic acid and C4-DC carnitine in urine) and Leigh syndrome with basal ganglia MRI lesions were previously identified as the hallmarks of *SUCLA2* and *SUCLG1* mutations [27].

Here we present the study of 52 individuals suspected to have MDS. According to their clinical symptoms and biochemical data, they were divided into three main groups: hepatocerebral, encephalomyopathic and patients with Alpers syndrome.

The diagnosis was established in 10 patients: 5 with mutations in *DGUK*, 2 with mutations in *POLG* and single patients carrying mutations in *MPV17*, *SUCLA2* and *SUCLG1*.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

2.1.1. Controls

The mtDNA content in skeletal muscle biopsies from 48 control individuals, with ages ranging from 1 day to 65 years, was studied. The mtDNA content in liver was analysed in 11 biopsies from control individuals with ages ranging from 1 day to 2 years. All the biopsies were taken from individuals who underwent prosthetic operations or individuals with suspected mitochondrial disease that were ruled out due to normal respiratory chain activities.

2.1.2. Patients and selection criteria

We selected a total of 52 paediatric patients. According to the clinical and biochemical criteria these patients were divided into three groups.

The first group consisted of 30 individuals with a hepatocerebral presentation. The major clinical criteria to be included in this group were liver diseases (cholestasis, hepatomegaly, altered hepatic enzymes or liver failure) with lactic acidemia and neurological dysfunction (hypotonia, developmental delay or cerebral atrophy) (30/30). In addition, some patients presented with renal dysfunction (15/30) and hypoglycaemia (12/30). Muscle or liver samples were available for 22 patients. The respiratory chain activities were previously studied in all of them. Patients included showed either altered respiratory chain activities except for complex II, or generalised deficiencies of all complexes, or normal activities in muscle. Tissue samples from 8 patients were not available, but were included in the genetic study due to a clinical history that was highly suggestive of the hepatocerebral form of MDS. DNA was obtained from liver, muscle, blood or fibroblasts.

The second group consisted of 15 individuals with an encephalomyopathic presentation. The major criterion to be included in this group was mild methylmalonic aciduria with normal homocystinuria (15/15) and neurological symptoms such as hypotonia (11/15), developmental delay (10/15), sensorineural deafness (4/15) and Leigh or Leigh-like syndrome (2/15). In addition, some patients showed lactic acidemia (11/15) and increase of succinylcarnitine (2/15). Muscle tissue was available only for 2 patients, and DNA of the remaining 13 was obtained from blood or fibroblasts.

The third group consisted of 5 individuals presenting with Alpers syndrome. Two of them presented the classical form, characterised by psychomotor regression, seizures and liver disease. The remaining 3 patients presented the Alpers-like form, without liver involvement. Muscle tissue from all of the patients was available.

Informed consent was obtained for all the samples used.

2.2. Tissue preparation

mtDNA copy number and citrate synthase (CS) activity were determined from the same preparation of tissue homogenate. Briefly, 40 mg of tissue was homogenated with a motor-driven homogeniser (B. Braun, Melsungen, Germany) in 500 μ l of SET buffer (10 mM of Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M of sucrose, 2 mM of EDTA), and the remaining fragments of connective tissue were taken off with the tip of a pipette, leaving a homogeneous preparation. We used 100 μ l of this homogenate to determine CS activity and 400 μ l for DNA extraction.

2.3. DNA and RNA extraction

Liver or muscle DNA was extracted from 400 μ l of tissue homogenate using a QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, with the final volume reduced to 30 μ l.

Blood or fibroblast DNA was extracted using a GenElute® Puregene Blood Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

RNA was obtained from cultured skin fibroblasts. Prior to RNA extraction, the fibroblasts were treated with a solution containing cycloheximide (CHX), which is an inhibitor of RNA degradation by nonsense mediated decay (NMD). CHX was diluted to a final concentration of 500 μ g/ml in DMEM medium, containing 10% bovine foetal serum, penicillin and streptomycin. After 7 h of incubation, fibroblasts were treated with trypsin and harvested. Total RNA extraction was carried out using a QIAshredder Kit and an RNeasy Mini Kit (Qiagen). We obtained cDNA in a modified two-step protocol, first-strand synthesis was performed using oligo-d(T)18 primers and MMLV-RT Plus retrotranscriptase (Epicentre, Madison, USA).

2.4. Determination of mtDNA copy number

Analysis of mtDNA copy number was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) according to Andreu et al. [28] with slight modifications, previously reported by our group for the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue [29]. Briefly, the analysis was performed in a Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This method is based on the amplification of the mitochondrial 12S rRNA (forward primer: 5'-ccacg ggaacagcagctgatt-3', reverse primer: 5'-ctattgactgggtaacgtgtga-3', probe: 5'-[6FAM]tgccagccacgccc[BHQ1]-3') and the mtDNA quantity was corrected by simultaneous measurement of a single copy nuclear *RNAseP* gene (cat. Number 4316844, Applied Biosystems). PCR was performed in a final reaction volume of 20 μ l with 2 mM of MgCl₂, 0.5 μ M each of the mitochondrial probe, forward and reverse primers, 1 μ l of TaqMan® *RNAseP*, 25 ng of DNA and 10 μ l of TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). The PCR conditions were 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 55 cycles of 10 s of denaturation at 95 °C, 5 s of annealing at 60 °C and 18 s of extension at 72 °C, with acquisition mode at segment 3. Samples were analysed in quadruplicate.

Quantitative results of mtDNA and nDNA copy numbers were obtained using a standard curve that was built using serial dilutions of self-designed plasmids (available on request). These plasmids were constructed cloning the 12S rRNA and *RNAseP* targets into a Zero Blunt® TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocols. The number of plasmid copies was calculated by spectrophotometry, the standard range for nDNA copies

Please cite this article as: A. Navarro-Sastre, et al., Mitochondrial DNA depletion syndrome: New descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients, Mol. Genet. Metab. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.08.018>

was from 3.6×10^5 to 2.2×10^3 and the range for mtDNA copies was from 3.6×10^7 to 2.22×10^5 .

2.5. Expression of the results

Control values were expressed in relative units: mtDNA copies/nDNA copy. When possible, the ratio (mtDNA/nDNA)/citrate synthase (CS) was calculated. This ratio is representative of the number of mtDNA copies into the mitochondrial mass. MtDNA depletion in patients was given as a percentage of the age-matched control mean. As it has been previously reported [30,31], the values were considered pathological when residual mtDNA copy number was less than 30% when compared with age-matched controls.

2.6. Enzymatic determinations

CS and respiratory chain activities were determined in skeletal muscle and liver tissue by previously described spectrophotometric methods [32–34].

2.7. Mutational studies

Exon and intron boundaries of the known genes causing MDS (*DGUOK*, *MPV17*, *C10orf2*, *SUCLA2* and *SUCLG1*) were PCR-amplified using standard conditions and self-designed primers (available on request). *POLG* was studied using cDNA. To study patient 8, we used specific primers for synthesising *SUCLG1* full-length cDNA (forward: 5'-CATTGTTCTACACAGCTCTCG-3', reverse: 5'-CATAGCATCTCTCTTTTCAA-3').

3. Results and discussion

3.1. Control values

mtDNA copy number was determined in a total of 48 control muscle biopsies, and significant differences ($p < 0.05$) among the following age ranges: 0–1 year, 1–5 years, 5–20 years and 20 years or greater were found (Fig. 1A). As previously described, mtDNA content increases with age [29,35]. CS activity did not change significantly until 20 years of age, but increased significantly beyond this age (Fig. 1B). Therefore, if we relate the mtDNA content to CS ((mtDNA/nDNA)/CS), the ratio increases in the first three age groups (Fig. 1C), but in the fourth group this ratio does not increase (Fig. 1C) due to the increase of CS (Fig. 1B). CS activity is an indicator of mitochondrial mass and is universally used to report respiratory chain activities. We speculate that the ratio (mtDNA/nDNA)/CS (Fig. 1C) might also be helpful in the diagnosis of MDS.

The mean mtDNA/nDNA ratio in 11 control liver samples was 397 ± 46 , but the number of samples was too low to study age variations.

3.2. Hepatocerebral patients

mtDNA copy number was studied in 22 patients. The results showed that 14 patients had mtDNA depletion in liver, muscle or in both tissues. All the available liver biopsies (eight in total) presented a residual mtDNA copy number ranging from 30% to 0%, while the study of 20 muscle samples only exhibited depletion in 10 samples, ranging from 25% to 12% residual mtDNA. It is well known that the liver is the target organ in the hepatocerebral form and previous reports have shown that muscle involvement was not always present [36]. Therefore, mutational study of the target genes *DGUOK*, *MPV17* and *C10orf2* was performed in all 22 patients, regardless of the normal mtDNA copy number in muscle biopsy of some of them. The remaining 8 patients, without any tissue available, were selected for genetic study due to their clinical history of lactic acidemia, liver involvement and neurological dysfunction.

Within the hepatocerebral group we found 3 families (5 patients) carrying mutations in *DGUOK*, and 1 patient with pathogenic mutations in *MPV17* (Table 1). Patients 1 and 2 were siblings and carried a homozygous c.677A>G mutation in *DGUOK*. Patients 3 and 4 were also siblings and carried the same mutation as the previous family. These families were not consanguineous between them but they both were from the same island (Tenerife, Canary Islands). The c.677A>G mutation changes a conserved histidine to arginine at position 226 (p.His226Arg) and has previously been reported in a compound heterozygous patient [37]. The mutation was present in heterozygosity in the parents of both families. All four patients presented in the neonatal period with hypotonia, hypoglycaemia, mild lactic acidosis and severe hepatic dysfunction with altered hepatic enzymes. Clinical evolution of all patients was characterised by a progressive hyporeflexia, abnormal ocular movements, hepatomegaly and lethargy. All patients died between the ages of one and eight months due to hepatic failure.

Patient 5 carried a previously described homozygous c.763_766dupGATT duplication [38], resulting in frameshift and a premature stop codon. This patient presenting with fatal hepatic failure, lactic acidemia and Fanconi syndrome had been previously reported by our group in 1991 [39], and at that time, a deficiency of succinate: cytochrome c reductase had been established as the most likely diagnosis.

Patient 6 carried a homozygous splicing mutation in *MPV17* affecting exon 2 (c.70+4G>A) and resulting in a lack of wild-type mRNA and protein. This patient has been exhaustively studied by our group in previous reports [40,41].

Patients carrying mutations in *DGUOK* or *MPV17* showed a high percentage of mtDNA depletion in the liver, and a less severe depletion in the muscle (Table 1). P3 and P6 showed multiple respiratory chain deficiencies in the liver; whereas, the respiratory chain activities of P6 were normal in the muscle tissue. The high mtDNA depletion versus the normal respiratory chain activities in the same muscle biopsy is surprising and difficult to explain, but similar results have also been found in other studies [42]. In addition, the mtDNA depletion in the muscle tissue of patient 4 (20% residual mtDNA) was also inconsistent with the normal mitochondrial respiratory chain activities in that tissue. In fact, the mtDNA copy number determination (mtDNA/nDNA) cannot predict the distribution of these copies into the mitochondrial mass. However, the measurement of mtDNA/nDNA and CS in the same homogenate allows us to have an idea of the mtDNA levels per mitochondrial mass; and when related to CS, patient 4 (Table 1) showed a less pronounced depletion in the muscle (58% residual (mtDNA/nDNA)/CS), which could explain why the respiratory chain activities are normal in muscle tissue. No muscle sample of P6 was left to calculate this ratio. In contrast, the liver sample of P6 showed even more mtDNA depletion when the ratio (mtDNA/nDNA)/CS was calculated (2% residual mtDNA) (Table 1), revealing a more profound defect according to the marked deficiency of all the respiratory chain complexes.

To summarise, among the 30 patients of this group, 14 had mtDNA depletion in liver or muscle, or in both tissues, but mutations were only found in 6 patients (4 families). Therefore, the diagnosis remains unknown in 8 patients with mtDNA depletion, being suitable candidates to be studied by next generation sequencing analysis. Other mitochondrial genes associated with fatal liver failure and lactic acidosis [43] should be studied in the patients without mtDNA depletion.

We would like to add that 5 patients of this group, including P6 with mutations in *MPV17*, were previously analysed by southern blot in another laboratory. The results by qRT-PCR were only coincident for the *MPV17* patient, while the results were normal in four of them that previously showed a profound depletion by southern blot (data not shown). The candidate genes were studied and mutations were not found in any of these four patients. Similar discrepancies were found by other authors when reanalysing the mtDNA

ARTICLE IN PRESS

4

A. Navarro-Sastre et al. / Molecular Genetics and Metabolism xxx (2012) xxx-xxx

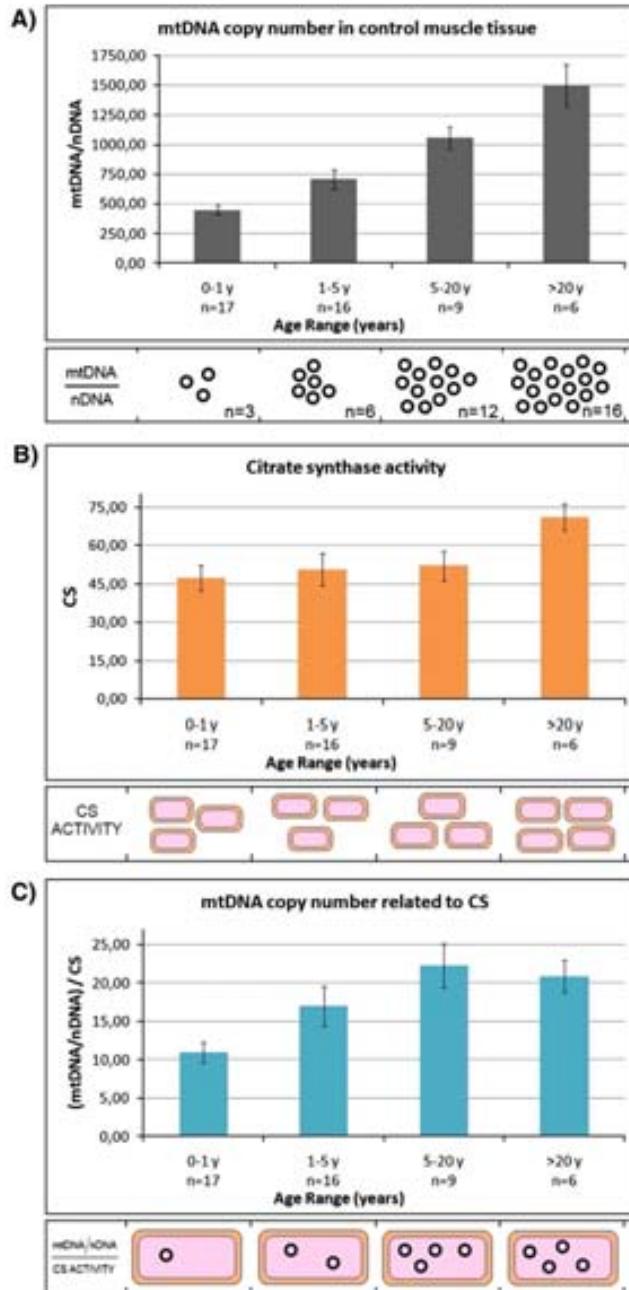


Fig. 1. mtDNA copy number, citrate synthase activity and mtDNA copy number related to CS. A) mtDNA copy number in control muscle biopsies. Results differ significantly at different age ranges ($p < 0.05$). B) Citrate synthase activity in muscle samples. Units are expressed in $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg}$ protein. C) Each mitochondrial DNA copy number was related to its citrate synthase activity, and each column represents the mean of (mtDNA/nDNA)/CS values. Boxes below each graphic are a schematic representation of the biological meaning of the different determinations; box A: mtDNA copy number, box B: mitochondrial mass and box C: mtDNA copy number per mitochondrial mass. Bars indicate the mean \pm SEM (standard error of the mean).

Please cite this article as: A. Navarro-Sastre, et al., Mitochondrial DNA depletion syndrome: New descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients, *Mol. Genet. Metab.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.08.018>

Table 1
Percentage of mtDNA depletion, respiratory chain activities and molecular studies of 10 patients presenting with mutations in MDS related genes.

Patient	Liver tissue		Muscle tissue		Gene	Genotype	Effect on protein
	Residual % mtDNA	Respiratory chain activities	Residual % mtDNA	Respiratory chain activities			
Patients with the hepatocerebral form of MDS							
P1	0%	–	12%	II + III	DGUKK	c[677A>G];[677A>G]	p[His226Arg];[His226Arg]
P2	–	–	9%	II + III,III,IV	DGUKK	c[677A>G];[677A>G]	p[His226Arg];[His226Arg]
P3	4%	I + II,II + III,IV	–	I + III	DGUKK	c[677A>G];[677A>G]	p[His226Arg];[His226Arg]
P4	–	–	20% (58%) ^a	Normal	DGUKK	c[677A>G];[677A>G]	p[His226Arg];[His226Arg]
P5	7%	III,IV	–	–	DGUKK	c[763_766dupGATT];[763_766dupGATT]	p[Pro256X];[Pro256X]
P6	11% (2%) ^a	I + II,II + III,III,IV	20%	Normal	MPV17	c[70 + 5G>A];[70 + 5G>A]	Splicing mutation
Patients with the encephalomyopathic form of MDS							
P7	–	–	50% (27%) ^a	I + III,III + III,III,IV	SUCLA2	c[1048G>A] ^b ;[1049G>T] ^b	p[Gly350Ser];[Gly350Val]
P8	–	–	–	–	SUCLG1	c[626C>A];[c.531 + 4A>T] ^b	p[Ala209Glu];[Val153_Asn177del]
Patients with Alpers–Huttenlocher syndrome							
P9	–	–	10%	I + III,III + III,III,IV	POU2	c[911T>G];[2663G>A]	p[Leu304Arg];[Gly888Asp]
P10	–	–	11% (8%) ^a	II + III,III,IV	POU2	c[844T>G];[911T>G]	p[Tyr282Asp];[Leu304Arg]

^a Percentage in brackets represents (mtDNA/nDNA)/CS results.

^b Mutations described for the first time in the present study. P1 and P2 were siblings, and P3 and P4 were also siblings.

content by qRT-PCR [44]. We emphasise the relevance of reanalysing the mtDNA copy number by qRT-PCR before undertaking more sophisticated studies.

3.3. Encephalomyopathic patients

Among the 15 individuals with encephalomyopathic presentation and methylmalonic aciduria ranging from 32 to 433 mmol/mol creatinine (control range 0.2–8.5 mmol/mol creatinine) we only found one patient with mutations in *SUCLA2* (P7) and one patient with mutations in *SUCLG1* (P8) (Table 1).

P7 is a 14 month old girl, the second child of non-consanguineous parents. Delayed motor milestones and failure to thrive were noticed from the age of 4 months. At that time the main clinical symptoms were severe hypotonia, lack of head and trunk control and dyskinesia. Analysis of the brainstem auditory evoked potentials showed neurosensory deafness. Brain MRI revealed mild cerebral atrophy. Biochemical studies showed hyperlactataemia, mildly increased levels of methylmalonic acid in the urine (47 mmol/mol creatinine) and increased levels of propionyl carnitine (4.2 μmol/L, control range 0.12–1.1 μmol/L) and succinylcarnitine (0.35 μmol/L, control range 0.03–0.08 μmol/L). Muscle biopsy did not show mtDNA depletion when the ratio mtDNA/nDNA was calculated (50% residual mtDNA), which did not correlate with the severe respiratory chain deficiencies observed in this tissue (Table 1). However, when the ratio (mtDNA/nDNA)/CS was used, it resulted in a depletion (27% residual mtDNA) that could better explain those respiratory chain defects. In this case, the (mtDNA/nDNA)/CS ratio was a helpful tool to better characterise the patient. Curiously, this patient carried two novel heterozygous missense mutations in *SUCLA2*, c.1048G>A and c.1049G>T, affecting the same amino acid residue, which is a highly conserved glycine that is changed to serine and valine, respectively (p.Gly350Ser/p.Gly350Val). Both parents are heterozygous (Fig. 2A), and these changes have not been found in 200 control alleles.

P8 is the first child of healthy and non-consanguineous parents. During the first months of life, she presented with poor psychomotor development and generalised hypotonia. Slight lactic acidosis, mild methylmalonic aciduria (in a range of 80–200 mmol/mol creatinine), increased levels of propionyl carnitine (22.0 μmol/L) and succinylcarnitine (0.48 μmol/L) were found. The patient is now 20 years old, and she remains irritable with some extrapyramidal symptoms and neurosensory deafness.

Brain MRI showed basal ganglia lesions compatible with Leigh-like syndrome. Mutational screening revealed a previously described mutation c.626C>A (p.Ala209Glu) [45] and a novel mutation c.531 +

4A>T in *SUCLG1* (Fig. 2B). To know the pathogenic effect of c.531 + 4A>T mutation on *SUCLG1* mRNA and protein, we analysed the patient's cDNA. After RT-PCR, the controls showed the expected 922 bp fragment of the corresponding full-length mRNA, while the patient showed the wild-type band and extra upper and lower bands (Fig. 2C). Subsequent sequencing of these three fragments demonstrated the presence of the normal product (922 bp), an aberrant spliced form lacking 75 bp (lower band of 847 bp) and a heteroduplex formed between the wild-type and aberrant spliced forms of *SUCLG1* mRNAs (upper band). Mutation c.531 + 4A>T disrupts the normal function of the exon 4 donor site. In this case, the splicing machinery find an alternative splicing donor site inside exon 4 and uses the same exon 5 splicing acceptor site, forming an aberrant form of *SUCLG1* mRNA (Figs. 2D–E). By using this alternative splicing donor site, the resulting cDNA is 75 bases shorter and would produce a protein lacking 25 amino acids.

In general, *SUCLG1* patients have an extremely severe phenotype [46], but the clinical and biochemical phenotypes of our patient are less severe and strikingly similar to those of patients with *SUCLA2* mutations. Similar phenotypes with *SUCLG1* mutations have been described by other authors [25,26].

To summarise, only 2 cases with mutations in *SUCLA2* or *SUCLG1* were found. Both patients showed a moderate increase of methylmalonic acid, together with high levels of C3 and C4DC. The latter, becomes a specific biomarker for the diagnosis of succinyl-CoA synthase (SCS) deficiencies [47]. In these cases, metabolite studies are more informative than mtDNA depletion, that is not always present in the muscle biopsy of SCS patients [27,48]. None of the remaining patients within this group showed high levels of C4DC. Follow-up of 5 of them revealed that the increase of methylmalonic acid was transitory. Therefore, the initial methylmalonic acid excretion of these patients was unspecific and other causes of pathology should be ruled out. Among the remaining patients, propionate incorporation into proteins was low in 1, but the genetic cause still remains to be elucidated.

3.4. Alpers syndrome patients

We performed mutational screening of *POU2* in 5 patients presenting with Alpers syndrome. Two patients (P9 and P10) had 10% and 11% residual mtDNA in muscle, respectively; whereas, the three remaining patients presented with normal muscle mtDNA copy number. Mutations were only found in the two patients with positive mtDNA depletion (Table 1). P9 presented with the classical form of Alpers syndrome, showing psychomotor retardation, epileptic encephalopathy, progressive cerebral atrophy and altered liver enzymes. This patient carried the already described mutations c.911T>G and

ARTICLE IN PRESS

6

A. Navarro-Sastre et al. / Molecular Genetics and Metabolism xxx (2012) xxx–xxx

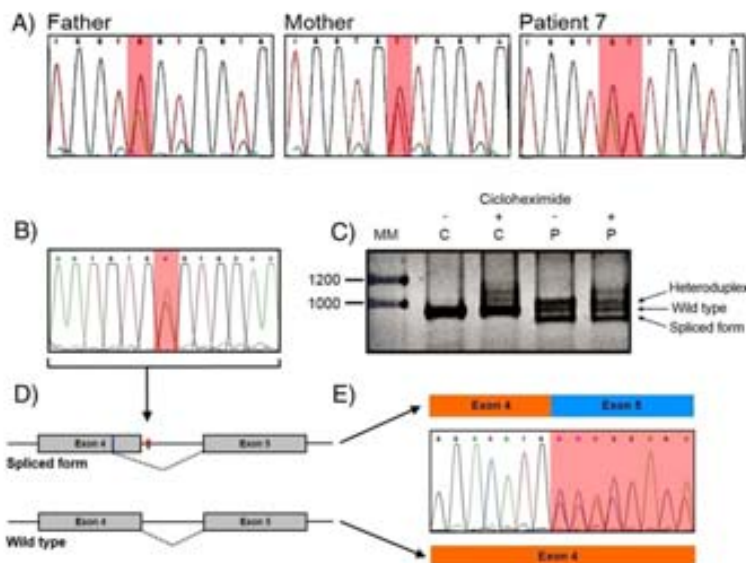


Fig. 2. Molecular results for the new *SUCLA2* and *SUCLG1* mutations. A) Electropherogram of a *SUCLA2* patient and his parents showing the genomic mutations c.1048G>A and c.1049G>T. B) Electropherogram of the *SUCLG1* patient showing the genomic mutation c.531+4A>T. C) Band pattern of cDNA amplification in the presence and in the absence of cycloheximide of the *SUCLG1* patient (P) and control individual (C). D) Schematic picture of the effect of the intronic mutation c.531+4A>T. E) Electropherogram of *SUCLG1* patient showing the effect of mutation c.531+4A>T on the cDNA sequence.

c.2663G>A. Mutation c.911T>G changes a lysine to arginine in position 304 (p.Leu304Arg) and was described for the first time in patients presenting with progressive external ophthalmoplegia [49], and later on in patients with Alpers syndrome [50]. Mutation c.2663G>A, which changes a glycine to aspartic acid (p.Gly888Asp), was previously described in a compound heterozygous patient [51].

P10 presented Alpers-like syndrome, with intractable convulsions and severe epileptic status. He was compound heterozygous for p.Leu304Arg and another previously described mutation, c.844T>G (p.Tyr282Asp), located at a conserved position in the exonuclease domain [52]. Similar to P9, the muscle biopsy from P10 showed mtDNA depletion (11% residual mtDNA) and multiple respiratory chain deficiencies (Table 1); in this case, the ratio (mtDNA/ndDNA)/CS also showed high mtDNA depletion (8% residual mtDNA).

The remaining 3 patients, 1 with classic Alpers syndrome and 2 Alpers-like did not show mtDNA depletion in muscle and mutational screening for *POLG* was negative. Therefore, in our patients mtDNA depletion in muscle correlates with the presence of mutations in *POLG*, independently whether the patients presented the classical or the Alpers-like form. But it must be noted that muscle mtDNA depletion can lag behind the onset of disease and its absence cannot be used to exclude a depletion disorder [10].

4. Conclusions

Mutational study of *DGUOK*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1* and *POLG* allowed us to identify 3 novel mutations (c.1048G>A and c.1049G>T in *SUCLA2* and c.531+4A>T in *SUCLG1*) and 7 already known mutations in 10 patients (8 families).

Seventeen patients presented with mtDNA depletion in liver or muscle, but the cause of the depletion still remains unknown in 8 of them.

The mtDNA/ndDNA and CS activity in the same tissue samples provides an additional tool for the study of MDS and has shed some light

in the discrepant results between the mtDNA copy number and the enzymatic respiratory chain activities of some cases.

Acknowledgments

This research was supported in part by the Instituto de Salud Carlos III (FIS-P108/90348 and FIS-P110/00662), CIBERER is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. This work was performed in the context of the PhD programme of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona (UAB). The excellent technical assistance of Sonia Moliner, Patricia Alcalá, Carlota Ogg and Cristina Fernández is acknowledged. The contribution of Aida Font through the analysis of some samples is also acknowledged.

References

- [1] M. Hirano, T.H. Vu, Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol.* 10 (2000) 451–461.
- [2] H. Mandel, R. Szargel, V. Labay, O. Elpeleg, A. Saada, A. Shalata, Y. Arbibinder, D. Berkowitz, C. Hartman, M. Barak, S. Eriksson, N. Cohen, The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 29 (2001) 337–341.
- [3] F. Scaglia, D. Dimmock, L.J. Wong, DGUOK-related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome. *Hepatocerebral Form.*, 1993.
- [4] A. Spinazzola, C. Visconti, E. Fernandez-Vizarra, F. Castara, P. D'Adamo, S. Calvo, R.M. Marsano, C. Donnini, H. Wehrer, P. Striccioglio, R. Parini, E. Sarzi, A. Chan, S. DiMauro, A. Rotig, P. Gasparini, I. Ferrero, V.K. Mootha, V. Tiranti, M. Zeviani, MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* 38 (2006) 570–575.
- [5] A.W. El-Hattab, F.Y. Li, E. Schmitt, S. Zhang, W.J. Craigen, L.J. Wong, MPV17-associated hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: new patients and novel mutations. *Mol. Genet. Metab.* 99 (2010) 300–308.
- [6] E. Sarzi, S. Goffart, V. Serre, D. Chretien, A. Slama, A. Munnich, J.N. Spelbrink, A. Rotig, Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 62 (2007) 579–587.
- [7] A.H. Hakonen, P. Isohanni, A. Partau, R. Hervu, A. Suomalainen, T. Lonnqvist, Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain* 130 (2007) 3032–3040.

Please cite this article as: A. Navarro-Sastre, et al., Mitochondrial DNA depletion syndrome: New descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients, *Mol. Genet. Metab.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.08.018>

- [8] K. Nikali, A. Suomalainen, J. Saharinen, M. Kuokkanen, J.N. Spelbrink, T. Lottqvist, L. Peltonen, Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinkle, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2981–2990.
- [9] R.K. Naviaux, K.V. Nguyen, POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 706–712.
- [10] B.H. Cohen, R.K. Naviaux, The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders, *Methods* 51 (2010) 364–373.
- [11] R.P. Saneto, R.K. Naviaux, Polymerase gamma disease through the ages, *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16 (2010) 163–174.
- [12] L.J. Wong, R.K. Naviaux, N. Brunetti-Pierri, Q. Zhang, E.S. Schmitt, C. Truong, M. Milone, B.H. Cohen, B. Wical, J. Ganesh, A.A. Basinger, B.K. Burton, K. Swoboda, D.L. Gilbert, A. Vandervler, R.P. Saneto, B. Maramba, G. Arnold, J.E. Ahleslar, P.J. Waters, W.C. Copeland, Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations, *Hum. Mutat.* 29 (2008) E150–E172.
- [13] A. Bourdon, L. Minal, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chretien, P. de Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, A. Rotig, Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion, *Nat. Genet.* 39 (2007) 776–780.
- [14] B. Bornstein, E. Area, K.M. Flanigan, J. Ganesh, P. Jayakar, K.J. Swoboda, J. Coku, A. Naini, S. Shanske, K. Tanji, M. Hirano, S. DiMauro, Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene, *NeuroMuscul. Disord.* 18 (2008) 453–459.
- [15] A. Shaubani, O.A. Shechelovsk, S. Zhang, P. Katsonis, O. Lichtarge, L.J. Wong, M. Shinawi, Mitochondrial neurodegeneration encephalopathy due to mutations in RRM2B, *Arch. Neurol.* 66 (2009) 1028–1032.
- [16] H. Yonizima, E. Ylikallo, M. Patel, M.J. Molnar, R.G. Haller, A. Suomalainen, A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 290–295.
- [17] A. Saada, A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson, O. Elpeleg, Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy, *Nat. Genet.* 29 (2007) 342–344.
- [18] M. Mancuso, L. Salvati, S. Sacconi, D. Otaqui, P. Camano, A. Marina, S. Bacman, C.T. Moraes, J.R. Carli, M. Garcia, M. Garcia-Alvarez, L. Monzon, A.B. Naini, M. Hirano, E. Bonilla, A.L. Tarantini, S. DiMauro, T.H. Vu, Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA, *Neurology* 59 (2002) 1197–1202.
- [19] M. Okison, G. Davidsson, J. Pascual, R. Erazo, J. Gargal-Gianetti, S. Krishna, E. Bonilla, D.C. De Vivo, S. Shanske, S. DiMauro, Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene, *Arch. Neurol.* 63 (2006) 1122–1126.
- [20] S. Galbiati, A. Bordon, D. Papadimitriou, A. Tiscano, C. Rodolico, E. Katsarou, M. Sciacco, A. Garuffi, A. Prehe, M. Agamrouse, M. Borogonare, M. Cifri, A. Martinuzzi, N. Bresolin, A. Papadimitriou, G.P. Corri, New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion, *Pediatr. Neurol.* 34 (2006) 177–183.
- [21] O. Elpeleg, C. Miller, E. Hershkovitz, M. Bitner-Glindzky, G. Bondi-Kubinstein, S. Rahman, A. Paganamenta, S. Eshbar, A. Sada, Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 1081–1086.
- [22] R. Carrozzio, C. Dionisi-Vici, U. Stenarwald, S. Lucifora, F. Deodato, S. Di Giandomenico, E. Bertini, B. Franke, L.A. Khatimani, M.C. Meschino, C. Kizzo, F. Pfenninger, R. Riolden, R. Santer, F.M. Santorelli, A. van Rooij, K. Vermeir-de Koning, E. Morava, R.A. Werres, SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness, *Brain* 130 (2007) 862–874.
- [23] E. Ostergaard, F.J. Hansen, N. Sorenson, M. Duno, J. Vissing, P.L. Larsen, O. Faerov, S. Thorgimsson, F. Wilbrand, E. Christensen, M. Schwartz, Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations, *Brain* 130 (2007) 853–861.
- [24] E. Ostergaard, E. Christensen, E. Kristensen, B. Mogensen, M. Duno, E.A. Shoubridge, F. Wilbrand, Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 383–387.
- [25] E. Ostergaard, M. Schwartz, M. Bathayli, E. Christensen, O. Hjalmarson, G. Kolberg, E. Holme, A novel missense mutation in SUCLG1 associated with mitochondrial DNA depletion, encephalomyopathic form, with methylmalonic aciduria, *Eur. J. Pediatr.* 189 (2010) 201–205.
- [26] C. Rouzier, S. Le Guedard-Mereste, K. Fragaki, V. Serre, J. Miro, S. Tuffery-Giraud, A. Chauvenot, S. Banerwarth, C. Caruba, E. Ostergaard, J.F. Pellissier, C. Richeime, C. Espil, B. Chabrol, V. Paquis-Flucklinger, The severity of phenotype linked to SUCLG1 mutations could be correlated with residual amount of SUCLG1 protein, *J. Med. Genet.* 47 (2010) 670–676.
- [27] V. Valayannopoulos, C. Haady, V. Serre, M. Barth, N. Boddart, J.B. Arno, V. Cormier-Daire, M. Rio, D. Rabier, A. Vassault, A. Maroich, J.P. Bonnefont, P. de Lonlay, A. Rotig, A.S. Leber, New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria, *Mitochondrion* 10 (2010) 335–341.
- [28] A.L. Andrus, R. Martinez, R. Marti, E. Garcia-Armi, Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors, *Mitochondrion* 9 (2009) 242–246.
- [29] A. Font, F. Tort, A. Navarro-Sastre, V. Cusi, J. Garcia-Villoria, P. Briones, and A. Ribes, Quantitative analysis of mtDNA content in formalin-fixed paraffin-embedded muscle tissue, 2011, 125–129.
- [30] K.J. Morten, N. Ashley, E. Wilburg, N. Hadzic, J. Parr, S. Jayasant, S. Adams, L. Bindoff, H.D. Bakker, C. Melli-Vergani, M. Zeviani, J. Poulton, Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion, *Mitochondrion* 7 (2007) 386–395.
- [31] T.H. Vu, M. Sciacco, K. Tanji, C. Nichter, E. Bonilla, S. Chakraborty, P. Maertens, S. Shanske, J. Mendell, M.R. Koenigsberger, L. Sharrer, E.A. Schon, S. DiMauro, D.C. DeVivo, Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion, *Neurology* 50 (1998) 1783–1790.
- [32] R. Montero, R. Artuch, P. Briones, A. Nascimento, A. Garcia-Cazorla, M.A. Vilaseca, J.A. Sanchez-Alcaraz, P. Navas, J. Montoya, M. Pineda, Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders, *Biofactors* 25 (2005) 109–115.
- [33] P. Rastin, D. Chretien, T. Bourgeois, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35–51.
- [34] Sere, P. A. [1] Citrate synthase, [EC 4.1.3.7, Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)], [13C], 3–11, 1969, Ref Type: Serial (Book Monograph).
- [35] D. Dimmock, L.Y. Tang, E.S. Schmitt, L.J. Wong, Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome, *Clin. Chem.* 56 (2010) 1119–1127.
- [36] L.J. Wong, N. Brunetti-Pierri, Q. Zhang, N. Yazigi, K.E. Rowe, B.B. Dahms, M.A. Puchowicz, I. Gonzalez-Gomez, E.S. Schmitt, C.K. Truong, C.L. Hoppel, P.C. Chou, J. Wang, E.E. Baldwin, D. Adams, N. Leslie, R.C. Boles, D.S. Kerr, W.J. Craigen, Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy, *Hepatology* 46 (2007) 1218–1227.
- [37] D.P. Dimmock, Q. Zhang, C. onisi-Vici, R. Carrozzio, J. Shieh, L.Y. Tang, C. Truong, E. Schmitt, M. Sifry-Platt, S. Lucifora, F.M. Santorelli, C.H. Ficocioglu, M. Rodriguez, K. Wierenga, G.M. Enns, N. Longo, M.H. Lipson, H. Vallance, W.J. Craigen, F. Scaglia, L.J. Wong, Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 330–331.
- [38] L. Salvati, S. Sacconi, M. Mancuso, D. Otaqui, P. Camano, A. Marina, S. Rabinowitz, R. Shiffman, K. Thompson, C.M. Wilson, A. Feigenbaum, A.B. Naini, M. Hirano, E. Bonilla, S. DiMauro, T.H. Vu, Mitochondrial DNA depletion and dCK gene mutations, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 311–317.
- [39] M.A. Vilaseca, P. Briones, A. Ribes, E. Carreras, A. Llaçer, J. Querol, Fatal hepatic failure with lactic acidemia, Fanconi syndrome and defective activity of succinate: cytochrome c reductase, *J. Inher. Metab. Dis.* 14 (1991) 285–288.
- [40] A. Navarro-Sastre, E. Martín-Hernández, Y. Campos, E. Quintana, E. Medina, R.S. de Las Heras, M. Lluch, A. Muñoz, P. del Hoyo, R. Martín, L. Gort, P. Briones, A. Ribes, Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 234–239.
- [41] A. Navarro-Sastre, M.T. Garcia-Silva, E. Martín-Hernández, M. Lluch, P. Briones, A. Ribes, Functional splicing assay supporting that c70+5G>A mutation in the MPV17 gene is disease causing, *J. Inher. Metab. Dis.* (2010) [Epub ahead of print].
- [42] E. Sarzi, A. Bourdon, D. Chretien, M. Zahrate, J. Corcos, A. Slaama, V. Cormier-Daire, P. de Lonlay, A. Munnich, A. Rotig, Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood, *J. Pediatr.* 150 (2007) 531–534.
- [43] V. Felimas, H. Kotarsky, Mitochondrial hepatopathies in the newborn period, *Semin. Fetal Neonatal Med.* 16 (2011) 222–228.
- [44] A. Saada, A. Shaag, S. Arzon, T. Doffin, C. Miller, D. Fuchs-Telem, A. Lombes, O. Elpeleg, Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation, *J. Med. Genet.* 44 (2007) 784–788.
- [45] H. Rivera, B. Merinero, M. Martinez-Pardo, I. Arroyo, P. Ruiz-Salá, B. Bornstein, C. Serra-Suhe, E. Gallardo, R. Martí, M.J. Moran, C. Ugaldé, L.A. Perez-Jurado, A.L. Andreu, R. Garesse, M. Ugarte, J. Arenas, M.A. Martín, Marked mitochondrial DNA depletion associated with a novel SUCLG1 gene mutation resulting in lethal neonatal acidosis, multi-organ failure, and interrupted aortic arch, *Mitochondrion* 10 (2010) 362–368.
- [46] E. Ostergaard, Disorders caused by deficiency of succinate-CoA ligase, *J. Inher. Metab. Dis.* 31 (2) (2008) 226–229.
- [47] B. Fowler, J.V. Leonard, M.R. Baumgartner, Causes of and diagnostic approach to methylmalonic aciduria, *J. Inher. Metab. Dis.* 31 (2008) 350–360.
- [48] O. Sakamoto, T. Ohura, K. Murayama, A. Ohtake, H. Harashima, D. Abukawa, J. Takayama, K. Hagiwara, S. Miyabayashi, S. Kure, Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene, *Pediatr. Int.* 53 (2011) 921–925.
- [49] G.G. Van, B. Dermaut, A. Lofgren, J.J. Martin, B.C. Van, Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions, *Nat. Genet.* 28 (2001) 211–212.
- [50] R. Horvath, G. Hudson, G. Ferrari, N. Fatterer, S. Abola, E. Lamminta, H. Prokisch, H. Lochmuller, R. McFarland, V. Kamesh, T. Klopstock, P. Freisinger, F. Salvi, J.A. Mayr, R. Santer, M. Tesarova, J. Zeman, B. Udd, R.W. Taylor, D. Turnbull, M. Hanna, D. Falham, A. Suomalainen, M. Zeviani, P.J. Chinnery, Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene, *Brain* 129 (2006) 1674–1684.
- [51] S. Tang, J. Wang, N.C. Lee, M. Milone, M.C. Halberg, E.S. Schmitt, W.J. Craigen, W. Zhang, L.J. Wong, Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum, *J. Med. Genet.* 48 (2011) 669–681.
- [52] W. Wang, P. Shen, S. Thyagarajan, S. Lin, C. Palm, R. Horvath, T. Klopstock, D. Cafier, L. Pique, I. Schrijver, R.W. Davis, M. Mindronis, T.P. Spend, C. Scharle, Identification of rare DNA variants in mitochondrial disorders with improved array-based sequencing, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 44–58.

Article 2

Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue.

Font A, Tort F, Navarro-Sastre A, Cusí V, Garcia-Villoria J, Briones P, Ribes A.

Revista: JIMD reports. 2011 Juny 1:125-129.

La quantificació del contingut de mtDNA és essencial pel diagnòstic del síndrome de depleció de mtDNA (MDS). Les mostres obtingudes en estudis anatomopatològics són una font de material biològic molt valuós i sovint és l'únic material disponible. Per tant, l'estudi del contingut de mtDNA d'aquestes mostres és, moltes vegades, la única manera de diagnosticar possibles pacients afectes de MDS. En aquest treball, hem dissenyat i validat la metodologia per determinar el número de còpies de mtDNA per PCR a temps real en mostres incloses en parafina. Els nostres resultats mostren una variabilitat similar entre biòpsies congelades i parafinades. Pacients amb MDS detectat en múscul congelat també s'han confirmat en la seva corresponent biòpsia parafinada, validant la utilitat d'aquesta aproximació. Per tant, l'anàlisi del número de còpies de mtDNA en biòpsies parafinades és un mètode útil per la cerca de mutacions de possibles pacients amb MDS quan no hi ha disponibilitat de mostres congelades. L'anàlisi d'aquestes mostres també facilitarà estudis retrospectius i procediments diagnòstics.

El doctorand, tercer autor de la publicació, ha realitzat i analitzat els estudis experimentals del càlcul de còpies de mtDNA en biòpsies congelades d'individus control i pacients, en directa col·laboració experimental i intel·lectual amb la directora de tesi, el primer i segon autor de l'article.

JIMD Reports
DOI: 10.1007/8904_2011_27
© SSIEM and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011
Received: 10 December 2010; Revised: 31 January 2011;
Accepted: 3 February 2011; Published online: 22 June
Communicated by: Garry Brown

Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue

Aida Font, Frederic Tort, Aleix Navarro-Sastre, Victòria Cusi, Judit Garcia-Villoria, Paz Briones, and Antonia Ribes

Abstract Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) content is an essential tool for the diagnosis of mtDNA depletion syndrome (MDS). Samples collected and processed for anatomopathology studies represent a unique source of archived biological material. Thus, the possibility to study mtDNA copy number in these specimens would be a useful way to screen for MDS. In this study, we designed and validated the methodology to determine mtDNA content by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) muscle tissue. We studied 14 frozen muscle biopsies and compared the results with a portion of the same biopsy embedded in paraffin. Our results showed a similar variability among

frozen and FFPE muscle biopsies. Patients with MDS detected in frozen muscle were also confirmed in their corresponding FFPE samples, which validate the usefulness of this approach. We conclude that the analysis of mtDNA copy number in FFPE muscle tissue by qRT-PCR is a useful method for the molecular screening of patients suspected to have MDS when frozen biopsies are not available. Analysis of these samples would facilitate retrospective studies and diagnostic procedures.

Introduction

Biogenesis and homeostasis of the mitochondria is tightly regulated, and requires the expression and coordination of both, nuclear and mitochondrial encoded proteins. Therefore, mitochondrial disorders are a group of complex dual genome diseases that can be caused by molecular defects in both nuclear or mitochondrial genomes including point mutations, deletions, duplications, and reduction in mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, known as mtDNA depletion (Rötig and Poulton 2009).

mtDNA depletion syndromes (MDS) are a heterogeneous group of autosomal recessive disorders characterized by a reduction of the mtDNA content in a tissue-specific manner. They are caused by molecular defects in nuclear genes responsible for the biogenesis and maintenance of mtDNA integrity and usually affect different tissues and organs with high energetic demand, such as liver, skeletal muscle, and nervous system (Suomalainen and Isobanni 2010). Currently, MDS are divided into different syndromes caused by mutations in at least nine genes: myopathic form associated with mutations in *TK2* (OMIM # 609560); encephalomyopathic with renal tubulopathy form associated with *RRM2B* (OMIM #612075); encephalomyopathic with methylmalonic aciduria associated with mutations in *SUCLA2* and *SUCLG1* (OMIM #612073 and 245400); hepatocerebral

A. Font
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

F. Tort, A. Navarro-Sastre, and J. García-Villoria
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain and
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

V. Cusi
Servicio de Anatomía Patológica, Hospital San Joan de Déu, Barcelona, Spain

P. Briones
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain and
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain and
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

A. Ribes (✉)
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo, Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain and
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain and
Edificio Helios III, planta baja, C/Mejía Lequerica s/n, 08028. Barcelona, Spain
e-mail: aribes@clinic.ub.es

form associated with mutations in *DGUOK*, *MPV17*, and *TWINKLE* (OMIM # 251880, 256810 and 271245); MNGIE syndrome associated with mutations in *TYMP* and *POLG* (OMIM # 603041 and 613662). Mutations in *POLG* are also associated with Alpers Syndrome (OMIM #203700) (Dimmock et al. 2010).

Quantification of mtDNA content is an essential tool for the diagnosis of MDS and is based on Southern blot or quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis (Suomalainen and Isohanni 2010). Although DNA from fresh frozen tissues is the suitable sample for the diagnosis of MDS, the most widely used method to collect samples is formalin fixation followed by paraffin block inclusion. The feasibility of performing mtDNA quantification on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues would facilitate diagnostic procedures and allow a large number of retrospective studies.

Material and Methods

Biological Samples

We studied 14 frozen skeletal muscle biopsies and compared them with a portion of the same biopsy embedded in paraffin. The age distribution and number of controls were: 0–1 year ($n = 12$); 6 years ($n = 1$), and 50 years ($n = 1$). To validate the methodology, we analyzed four patients with known reduction of mtDNA copy number. Briefly:

Patient 1: She was admitted to the hospital at 7 days of life with bradypnea. She progressively developed hypothermia, mydriasis, and edema. She died few hours after admission. Biochemical analysis showed hyperammonemia, increased excretion of lactate, and hypertransaminasemia; 90% of mtDNA depletion in muscle biopsy by qRT-PCR was detected, while respiratory chain activities in the same muscle biopsy were normal. Mutations in *DGUOK* and *MPV17* were excluded.

Patient 2: He was admitted to the hospital at 30 h of life with feeding refuse, irritability, dehydration, severe metabolic acidosis, hyperammonemia, hyperlactatemia, and altered hepatic enzymes. At 8 days of age, neurological deterioration, as well as renal and hepatic insufficiency, was evident. He presented two further episodes of metabolic acidosis and liver involvement. He died of hepatic failure at 2 months of age; mtDNA content in muscle biopsy, determined by southern blot, showed 89% mtDNA depletion. Mitochondrial respiratory chain activities (complex I–IV) were low. Genetic studies excluded mutations in *DGUOK* and *RRM2B*.

Patient 3: She presented at 5 days of age with axial hypotonia, poor eye contact, and sweating. Biochemical studies revealed an increased excretion of lactate and methylmalonate. Mitochondrial respiratory chain activities

(complex I–IV) showed a slight reduction of all the complexes; mtDNA content, determined by qRT-PCR, showed 87% mtDNA depletion in muscle biopsy. A new mutation in *SUCLA2* was identified, which has been predicted to be disease causing according to Polyphen database (unpublished results and currently under study in our laboratory).

Patient 4: She is the third daughter of a family with two other affected siblings. Few hours after birth, she presented a severe hepatic insufficiency, metabolic acidosis, hypoglycemia, hyperammonaemia, and high lactate. Mitochondrial respiratory chain activities were normal (complex I–IV); mtDNA content, determined by qRT-PCR in muscle biopsy, showed 80% depletion. Genetic analysis of *DGUOK* identified the previously described p.H226R mutation (Dimmock et al. 2008) in homozygosity.

Informed consent has been obtained for all the samples used.

Experimental Design and Sample Preparation

To minimize the natural variability of mtDNA content within tissue samples, we prepared and processed separately two adjacent portions from each frozen tissue. DNA was directly extracted from one of the portions, while the other one was subjected to formalin fixation and paraffin block inclusion. Briefly, before DNA isolation, paraffin sections were dewaxed in xylene at room temperature and subjected to a series of alcohol washing steps, following standard procedures (Gilbert et al. 2007). Then, the samples were air-dried and DNA was isolated using Qiamp DNA mini kit (Qiagen, GmbH, Germany).

Quantification of mtDNA Content

Analysis of mtDNA copy number was performed by qRT-PCR using Taqman technology in a Step One plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1). This method is based on the amplification of the *12S rRNA* (mtDNA target gene) and the *RNaseP* (endogenous nuclear control gene) to normalize the DNA content in each sample. PCRs were carried out in triplicate using 15 ng of DNA from both frozen and FFPE samples. Levels of mtDNA were relatively quantified by evaluating Ct values using the comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) method. Briefly, mtDNA content was calculated from the difference of the delta Ct of each sample ($Ct_{12SrRNA} - Ct_{RNaseP}$) compared with the reference value obtained as the average of delta Ct from the controls studied. Final values were expressed in relative units and were obtained through the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Table 1 Oligonucleotides and reagents used for qRT-PCR

Gene	Primers	Probes	Fluorescent product
12S rRNA ^a	CCACGGGAAACAGCAGTGAT CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA	(6FAM)TGCCAGCCACCGCG(BHQ1)	6FAM/BlackHole Quencher
RNaseP ^b	Taqman RNase P Control Reagents Kit. Part Number 4316844		VIC-TAMRA

^aOligonucleotides are located at positions 158 and 280 according to 12S rRNA sequence NC_012920; PCR amplification yields a 122 bp product

^bAccording to the manufacturer, Taqman technology uses amplicons around 100 bp in length

where: $\Delta\Delta Ct = (Ct/12S rRNA \text{ sample} - Ct/RNaseP \text{ sample}) -$
(average ΔCt controls).

Statistical Analysis

Wilcoxon signed-rank (nonparametric two-related sample test) and Spearman correlation test were performed using SPSS16.0 statistical software.

Results and Discussion

FFPE specimens represent an important and unique source of archived biological material. According to the literature, molecular studies have been successfully performed in this type of samples (Gnanaprasagam 2009; Yu et al. 2008). However, as far as we know, the reliability of qRT-PCR technology for mtDNA copy number determination in FFPE tissues remains still to be elucidated. Moreover, the heterogeneous clinical spectrum of MDS makes the mtDNA copy number study an essential tool before undertaking specific gene sequencing analysis (Bai et al. 2004; Dimmock et al. 2010). Thus, the possibility to detect mtDNA content in FFPE specimens would represent a useful way to screen for MDS. Our aim was to optimize the methodology to determine mtDNA content by qRT-PCR in FFPE muscle tissue.

Limitations of molecular biology studies in FFPE tissues have been widely reported to be due to the high fragmentation of nucleic acids. We visualized the integrity of the DNA from frozen and FFPE samples in agarose gels and results showed that the DNA was highly fragmented in comparison with that extracted from frozen samples (Fig. 1a). Despite the concentration of DNA is lower in FFPE than in frozen muscle samples, the purity of both is almost identical and suitable for molecular studies (data not shown). According to the literature, the median DNA fragment length in FFPE samples is around 400 bp and mainly depends on the tissue type and the methodology of fixation (Gilbert et al. 2007; Lehmann and Kreipe 2001). To determine the extent of the degradation of the DNA in FFPE samples, we performed conventional PCR. Two nuclear and one mtDNA fragments

of around 1,200, 700 and 500 bp, respectively, were successfully amplified (Fig. 1b). The lower intensity of the 1,200 bp fragment in the FFPE samples is probably due to DNA degradation during formalin fixation and sample processing. Because the qRT-PCR amplicons had around 100 bp, we considered that the DNA obtained from FFPE samples was suitable for mtDNA determination. However, FFPE samples showed higher Ct values in comparison with their corresponding frozen tissue (Fig. 1c). This phenomenon could be explained by the fact that the DNA degradation in FFPE samples might reduce the number of intact amplicons, although the starting DNA amounts in the qRT-PCR were the same in both FFPE and frozen muscle. Because the delta Ct values obtained in both kind of samples were slightly different (mean; -10.54 and -11.72 , respectively) the two groups were analyzed separately.

A similar variability in the mtDNA content between both groups has been observed, reference range: 0.57–2.90 and 0.41–2.02, in frozen and FFPE samples, respectively (Fig. 2a). Wilcoxon signed-rank test showed no statistically significant differences (p -value = 0.95). To assess the level of agreement of paired samples, the Spearman's correlation test was applied and showed a good correlation within specimens ($r = 0.864$; $p < 0.01$). Altogether these data demonstrate that the mtDNA content in frozen and FFPE muscle samples was comparable. Despite the variability observed within these two groups, the comparative study showed similar behavior for each sample (Fig. 2b–c). Nevertheless, as has been reported previously (Bai et al. 2004; Morten et al. 2007; Dimmock et al. 2010), the observed variability could be explained by the differences in the age of control individuals. Interestingly, one of the control samples (C11), showing the highest mtDNA content, belongs to an adult while the remaining samples are from pediatric controls (Fig. 2c).

The four patients (P1–P4) with MDS detected in frozen muscle were clearly confirmed in their corresponding FFPE samples when compared with age-matched controls (Fig. 2d), which validates the usefulness of this material. Thus, despite the degradation of the DNA, mtDNA depletion can be detected in FFPE specimens in a similar manner to that performed in frozen tissues. However, the relatively small number of specimens analyzed in this study should

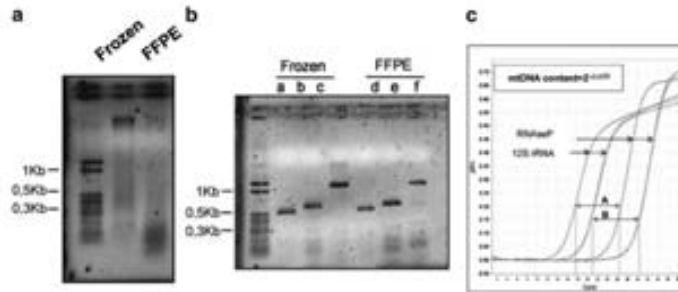


Fig. 1 Integrity of the DNA obtained from frozen and FFPE muscle biopsy. (a) Total genomic DNA was visualized in 1% agarose gel. MW, molecular weight marker (b) DNA products from frozen and FFPE muscle biopsy obtained by PCR amplification. MW, molecular weight marker; lanes *b*, *c*, *e*, and *f* correspond to nuclear DNA fragments; lanes *a* and *d* correspond to a mtDNA fragment. (c) qRT-PCR amplification plot in frozen (A) and FFPE (B) samples

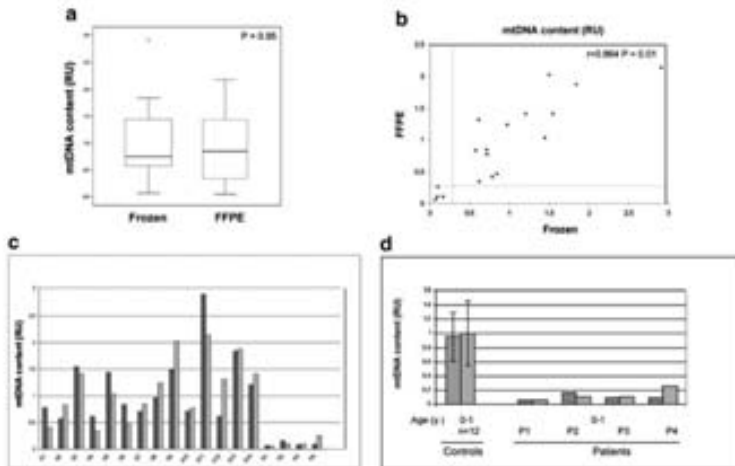


Fig. 2 Comparative analysis of mtDNA content in frozen and FFPE muscle biopsies. (a) Similar levels of mtDNA were found in frozen and FFPE samples as determined by the Wilcoxon ranked test. (b) Spearman test showed statistically significant correlation between FFPE and frozen paired samples. Dotted line separates tissues with confirmed mtDNA depletion and delimits the threshold for mtDNA depletion (30% of mtDNA content in control samples). (c) mtDNA content in frozen and FFPE paired samples. C1–C14 correspond to control samples and P1–P4 to patients with previously confirmed mtDNA depletion. Results are shown in relative units (RU). Gray bars indicate frozen tissue, striped bars indicate FFPE samples. (d) Comparison of the mtDNA content of the four patients (P1–P4) with age-matched controls. Results are shown in relative units (RU). Gray bars indicate frozen tissue, striped bars indicate FFPE samples. Error lines represent the mean \pm standard deviation

be supported by further studies in larger series of cases to fully confirm our observations.

It has also been reported that many variables can influence the validity and reliability of molecular biology studies in FFPE tissues, such as tissue amount, length, storage, and fixation conditions (Gnanapragasam 2009; Gilbert et al. 2007). Therefore, the above-mentioned aspects should also be considered when analyzing mtDNA content in FFPE tissues.

In conclusion, analysis of mtDNA copy number in FFPE by qRT-PCR is a useful method for molecular screening of

patients suspected to have MDS when frozen biopsies are not available. Analysis of these samples, which are a rich source of biological material, would facilitate retrospective studies and diagnostic procedures.

Acknowledgements This research was supported in part by the Spanish Ministerio de Sanidad Grant PI08/90348. CIBERER, is an initiative of Instituto de Salud Carlos III.

References

Bai RK, Peng CL, Hsu CH, Wong LJ (2004) Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann NY Acad Sci* 1011:304–309

Dimmock D, Zhang Q, Dionisi-Vici C et al (2008) Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum Mutat* 29(2):330–331

Dimmock D, Tang L, Schmitt E, Wong L (2010) Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clin Chem* 56:1119–1127

Gilbert M, Haselkorn T, Bunce M et al (2007) The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful and when? *PLoS ONE* 2(2):e537

Gnanapragasam VJ (2009) Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU Int* 105:274–278

Lehmann U, Kreipe H (2001) Real-Time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 25:409–418

Morten KJ, Ashley N, Wijburg F et al (2007) Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion* 7(6):386–395

Rötig A, Poulton J (2009) Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim Biophys Acta* 1792:1103–1108

Suomalainen A, Isohanni P (2010) Mitochondrial DNA depletion syndromes-many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord* 20:429–437

Yu J, Miller R, Zhang W et al (2008) Copy-number analysis of topoisomerase and thymidylate synthase genes in frozen and FFPE DNAs of colorectal cancers. *Pharmacogenomics* 9: 1459–1466

Article 3

Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in MPV17 gene: description of an alternative MPV17 spliced form.

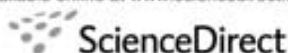
Navarro-Sastre A, Martín-Hernández E, Campos Y, Quintana E, Medina E, de Las Heras RS, Lluch M, Muñoz A, del Hoyo P, Martín R, Gort L, Briones P, Ribes A.

Revista: Molecular Genetics and Metabolism. 2008 94:234-9. Factor d'impacte: 3,193

Mutacions en el gen MPV17 són causants d'una de les formes hepatocerebrals de depleció de mtDNA. Els pacients amb mutacions en aquest gen presenten fallida hepàtica, hipoglucèmia, retràs del desenvolupament i símptomes neurològics durant el primer any de vida. En aquest article descrivim les troballes clíniques, bioquímiques i moleculars d'un pacient que presenta hepatopatia letal, polineuropatia, regressió neurològica i leucodistrofia associada a mutacions a *MPV17*. Es va trobar que les activitats de la CRM estaven disminuïdes en fetge però que en múscul eren normals. Tot i això, els nivells de mtDNA estaven reduïts en ambdós teixits. Es va identificar una nova mutació d'splicing afectant a l'exò 2 del gen MPV17 (c.70+5G>A) i que provoca la pèrdua total del cDNA. Estudis *in silico* proposen que la pèrdua total de mRNA seria provocada per la pèrdua de força del donador d'splicing involucrat en el procés. L'anàlisi per western blot corrobora aquestes afirmacions, ja que els nivells de proteïna MPV17 es van trobar disminuïts en el teixit hepàtic del pacient. A més a més, s'ha identificat una forma d'splicing alternativa en individus control que no ha estat prèviament descrita.

El doctorand, primer autor de l'article, ha realitzat les tasques experimentals de tot l'estudi; la caracterització molecular de pacients i familiars afectes de la deficiència de *MPV17*, el cultiu de fibroblasts amb i sense cicloheximida, l'anàlisi del cDNA i el

western blot de pacient i controls emprats en l'estudi. A més a més, ha participat amb gran protagonisme en l'anàlisi dels resultats.

Available online at www.sciencedirect.com

Molecular Genetics and Metabolism 94 (2008) 234–239

Molecular Genetics
and Metabolismwww.elsevier.com/locate/jymgme

Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in *MPV17* gene: Description of an alternative *MPV17* spliced form

Aleix Navarro-Sastre^a, Elena Martín-Hernández^b, Yolanda Campos^c, Ester Quintana^a, Enrique Medina^d, Rogelio Simón de las Heras^c, Montserrat Lluch^a, Alberto Muñoz^f, Pilar del Hoyo^c, Rebeca Martín^c, Laura Gort^a, Paz Briones^{a,g}, Antonia Ribes^{a,*}

^a *Division of Inborn Errors of Metabolism (IBC), Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic and CIBERER, Edifici Helios III, planta baixa, C/ Meja Lequerica s/n, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Mitochondrial and Inherited Metabolic Diseases, Pediatrics Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

^c *Centro de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

^d *Pediatric Gastroenterology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

^e *Pediatric Neurology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

^f *Pediatric Neuroradiology, Department of Radiology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain*

^g *CSIC, Barcelona, Spain*

Received 10 December 2007; received in revised form 29 January 2008; accepted 29 January 2008

Available online 10 March 2008

Abstract

It has recently been reported that mutations in *MPV17* gene may be causative of mtDNA depletion syndrome (MDS). Patients with this alteration presented with severe liver failure, hypoglycemia, growth retardation and neurological symptoms during the first year of life. We report on the clinical, biochemical and molecular findings of a patient presenting with lethal hepatopathy, polyneuropathy, neurological regression and leukodystrophy associated with mutations in *MPV17*. Mitochondrial respiratory chain activities were low in liver and within reference values in muscle. However, levels of mtDNA were markedly reduced both in muscle and liver. A novel homozygous mutation in *MPV17*, c.70+5G>A (IVS1+5G>A), was identified. This intronic change causes the full-length cDNA loss, probably due to loss of strength of the splice donor site of exon 1. Western blot analysis, performed in liver homogenates, further corroborates these results as the amount of patient's protein was highly reduced, or almost absent, compared with that of controls. We also identified an additional alternative spliced form in controls and in the patient, due to exon 2 skipping, that has not previously been reported.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *MPV17* gene; mtDNA depletion; Hepatocerebral; Leukodystrophy; Splicing

Mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (MDS; MIM 251880) is clinically a heterogeneous group of disorders characterized by a severe reduction of mtDNA copy number [1]. Replication and maintenance of mtDNA depend upon numerous nuclear DNA-encoded enzymes and also require a balanced nucleotide pool, which is maintained by either import of cytosolic dNTPs through dedicated transporters, or by dNTP synthesis via the

mitochondria salvage pathway [2]. A defect in one of those factors, resulting in a replication failure or imbalanced pool of nucleotides, leads to severe mtDNA depletion and a decrease in the activity of mtDNA-encoded respiratory chain complexes [3].

In the last years, several genes have been identified as responsible for MDS: the myopathic form, characterized by a severe proximal muscle atrophy and weakness, has been associated with mutations in the mitochondrial thymidine kinase 2 gene (*TK2*; RefSeq NM_004614, MIM 188250) [4]; the encephalomyopathic form has been associated with mutations in the gene encoding for the β subunit

* Corresponding author. Fax: +34 93 227 56 68.

E-mail address: aribes@clinic.ub.es (A. Ribes).

of the ADP-forming succinyl-CoA synthase (*SUCLA2*; RefSeq NM_003850, MIM 603921) [5]; and MDS causing the hepatocerebral form has been associated with alterations in the genes for mitochondrial deoxyguanosine kinase (*DGUOK*; RefSeq NM_080915, MIM 601465) [6], DNA polymerase γ (*POLG*; RefSeq NM_002693, MIM 174763) [7] or *MPV17* (RefSeq NM_002437, MIM 137960) [8]. However, the number of genes known to cause MDS is still increasing; during the present year three additional associated genes have been reported: *RRM2B* (RefSeq NM_015713, MIM 604712) [9], *SUCLG1* (RefSeq NM_003849, MIM 611224) [10] and *PEO1* (RefSeq NM_021830, MIM 606075) [11,12].

We report here a new patient with MDS caused by a novel pathogenic mutation (IVS1+5G>A) in *MPV17*, and describe an additional alternative spliced form in controls that has not previously been reported.

Materials and methods

Patient

The patient was a boy, the first child of healthy consanguineous parents. Pregnancy, delivery and neonatal period were normal. He presented at 2 months of age with vomiting, jaundice, hypertransaminasemia and failure to thrive. Biochemical studies including 9-l-antitripsin, sweat test, metabolism of iron, ammonia, succinylacetone, free- and total-carnitine, acylcarnitines, galactose-1-phosphate, very long chain fatty acids, sterols, lactate and organic acids were all normal. Amino acids were also normal except for an increase of methionine, and the study of serum sialotransferins showed an increase of the less sialylated bands (corresponding to asialo-, monosialo- and disialo-transferrins), probably secondary to the hepatopathy. Nieman-Pick type C was also discarded.

At 13 months of age, he started with hypoglycemia and hepatic insufficiency, apparently triggered by an intercurrent illness. At this age he was admitted to our hospital. Physical examination showed global hypotonia and decreased motility of the lower limbs with absent deep tendon reflexes. Motor and sensitive conduction velocity was 40% of normal values, consistent with polyneuropathy. Due to his clinical condition the psychomotor development was difficult to evaluate, although a mild delay in some acquisitions was noticed. At this time, amino acids, organic acids and bile acids studies showed alterations secondary to hepatic damage. Few days later he underwent emergency liver transplantation. The explanted liver showed micronodular cholestatic cirrhosis with giant-cell transformation and low grade dysplasia. Muscle biopsy showed abundant vacuoles PAS+ and glycogen+ of small to medium size in the muscle fibres. Ultrastructural analysis of liver and muscle was unremarkable. Respiratory chain activities in muscle were normal (Table 2). His transplanted liver functioned adequately and he was discharged from hospital at 15 months of age. During the following 3 months clinical evolution was favourable.

At 18 months of age, during the course of gastroenteritis, he was readmitted with lactic acidosis, hyponatremia, hypocalcemia, seizures and encephalopathy. Brain MRI showed leukodystrophy (Fig. 1). Due to these clinical features MDS was suspected, and the muscle biopsy performed at 13 months of age was reanalyzed showing high levels of mtDNA depletion; the depletion was also evident in a frozen sample of the explanted liver (Table 2). Afterwards, the patient presented a multi-systemic affection including psychomotor regression, tubulopathy with loss of sodium, intestinal dysmotility, hypoparathyroidism and pigmentary retinopathy. Apnoeas of central origin were also observed. He died at the age of 22 months.

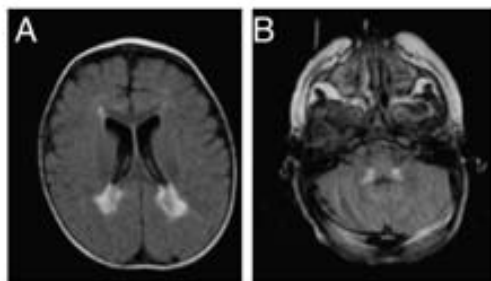


Fig. 1. MR imaging in FLAIR sequence acquisition (10,000/150/80;TR/TI/TE). (A) Axial scan through mid-ventricular level shows posterior periventricular deep white matter hyperintense lesions. (B) Axial scan through the lower pons level shows symmetric middle cerebellar peduncles white matter hyperintense lesions.

Biochemical studies

Urine organic acids were analyzed as TMS-derivatives by gas chromatography-mass spectrometry as previously described [13]. Respiratory chain activities were determined on skeletal muscle and liver extracts (800g supernatants) as reported elsewhere [14,15].

mtDNA studies

Total DNA was isolated from peripheral blood cells using standard protocols. The relative amount of mitochondrial versus nuclear DNA was determined by real-time PCR as described [16], with some modifications. Primer sequences for the mitochondrial (*MT-ND5* gene, 326 bp) and nuclear (*CFTR* gene, 460 bp) fragments were: forward: 5'-AGGCGC-TATCACCCTCTGTTCG-3', reverse: 5'-AACCTGTGAGGAAAGG-TATTCTCTG-3' and forward: 5'-AGCAGAGTACTGAAACAGGAA-3', reverse: 5'-AGCTTACCCATAGAGGAAACATAA-3', respectively. PCR was performed in a 10 μ l reaction volume containing 2 mM MgCl₂, 0.5 μ M each of the forward and reverse primers, 2 μ l of DNA and 1 μ l of master mixture (LightCycler-Fast Start DNA master SYBR Green I; Roche Diagnostics) containing TaqDNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates and SYBR Green I. The same DNA dilutions were used for both nuclear DNA (nDNA) and mtDNA calibration curves with a standard DNA. The reaction was conducted as follows: an initial denaturing step at 95 °C for 10 min, followed by 55 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 5 s and 72 °C for 18 s, with acquisition mode at segment 3. Samples were analyzed in triplicate, and average mtDNA:nDNA ratio was calculated.

Single or multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions were excluded by Southern blot analysis as previously described [17].

MPV17 analysis

Exons and intron boundaries of the *MPV17* gene were PCR-amplified using standard conditions. The PCR program was performed with an initial denaturing step at 96 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 96 °C for 30 s and 60 °C for 30 s and a final extension step at 72 °C for 10 min. We used specific primers described elsewhere [8], except for those fragments corresponding to exons 3–4 and 5–6 (Table 1). Fragments were then sequenced.

The analysis of changes in the consensus sequence in healthy controls was carried out by SSCP (Single Chain Conformational Polymorphism) technique.

Cultured skin fibroblasts were treated with a solution containing cycloheximide (CHX), which is an inhibitor of RNA degradation by nonsense-mediated decay (NMD) [18]. The reagent was diluted to a final concentra-

Table 1
Primers used to amplify the whole coding sequence of *MPV17*, as well as for RT-PCR

Amplified fragment	Length	Forward primer	Reverse primer
Exon 1*	248 bp	5'-tgcaccttaagtcacattg	5'-cttcaaatcagctgccc
Exon 2*	248 bp	5'-aatggcagccatccacagga	5'-gtccaaggggaagccaaagga
Exon 3–4	480 bp	5'-tgcaccttcccattctga	5'-acctgaacttaacccctttt
Exon 5–6	568 bp	5'-agggttatggcaggaatgt	5'-tccgtttgggggtctaaag
Exon 7*	628 bp	5'-gcatttcatgctccat	5'-ctctagaatgactccc
cDNA**	490 bp	5'-ctcttgcttgacaggaagc	5'-agggcaacctgtaatgaag

* Reported by Spinazzola et al. [8].

** The cDNA fragment encompasses from the 5' UTR to the beginning of exon 7.

tion of 500 µg/ml in DMEM medium containing 10% bovine fetal serum, penicillin and streptomycin. After 7 h of incubation, fibroblasts were harvested after trypsin treatment and total RNA extraction was carried out by standard procedures; cDNA was obtained in a modified two-step protocol, first-strand synthesis was performed using oligo-d(T)₁₈ primers and MMLV-RT Plus reverse transcriptase (Epicentre, Madison, USA). The first-strand PCR programme consisted of one-step at 41 °C for 30 min, then we added the specific primers (Table 1) and MasterAmp TAQurate DNA Polymerase (Epicentre, Madison, USA) to the whole first-strand reaction. The second-strand PCR program was performed with an initial denaturation step at 96 °C for 1 min, followed by 35 cycles at 96 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 45 s, with a final extension step at 72 °C for 10 min.

Western blot

One hundred micrograms of liver extract (800g supernatants) were separated in a 15% SDS-polyacrylamide gel. The samples were then transferred to nitrocellulose membranes, incubated with the primary rabbit MPV17 antibody (Proteintech, Chicago, USA) and finally detected with OPTI-4CN Detection Kit (Bio-Rad Laboratories, Italy).

Splicing software

To clarify the potential significance of splicing mutation we used the Splice Site Score Calculator (www.rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTLM/score.html) and splice-prediction programs as Splice Site Finder (www.violin.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html), NetGene2 (www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/) and BDGP Splice Site Prediction (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Results and discussion

Clinical features

There are few reports describing patients associated with alterations in *MPV17*, and only seven different mutations have been reported [8,19,20]. The first patients presented with lethal early-onset hepatopathy, but liver transplantation in one child and dietary control in another led them to long survival [8]. Nevertheless, one of them had delayed growth and the other developed multiple brain lesions, progressive spino-cerebellar ataxia, myoclonus of hands and feet, mental retardation and severe neurogenic kyphoscoliosis. The other report [19] showed that homozygosity for mutation p.R50Q in *MPV17* was the cause of Navajo Neurohepatopathy (NNH; MIM 256810) presenting three different phenotypes: infantile, childhood and classic

forms. The infantile and childhood forms are dominated by severe hepatopathy and early death, while the classic form is characterized by moderate liver dysfunction and progressive neuropathy. As they all presented the same mutation, the genotype is not able to predict the phenotype, which suggests that other factors may contribute to the severity of the disease. Four patients carrying mutations in *MPV17* have recently been described [20] and, like the first cases [8], all presented with progressive liver failure during infancy. It is important to remark that two of the four cases presented with isolated liver failure without noticeable neurologic dysfunction, although neurological deterioration would likely have occurred if these patients had survived through infancy [20].

The most significant clinical features of our patient were severe hepatopathy, polyneuropathy and neurological regression with leukodystrophy (Fig. 1A and B). In addition, other characteristic symptoms of mitochondrial diseases such as hypoparathyroidism, tubulopathy, intestinal dysmotility and pigmentary retinopathy, were also present, and were not described in the other reported patients [8,19,20].

Biochemical data

When our patient was first studied, the normal levels of urine and plasma lactate as well as the normal respiratory chain activities in muscle were not suggestive of MDS (Table 2). However, the clinical evolution as well as the biochemical data, including increased plasma lactate at 18 months of age, prompted us to perform mtDNA depletion studies that led us to demonstrate a marked reduction of mtDNA both in muscle and liver (Table 2). The decreased mtDNA content versus normal respiratory chain activities in the same muscle biopsy is surprising and difficult to explain, but similar results have also been found by other authors [20,21]. Respiratory chain activities in liver were low, including complex II activity (Table 2) that should be normal, because its subunits are exclusively encoded by nuclear DNA. Such multiple deficiencies have also been observed in other patients with MDS, suggesting that primary mtDNA depletion may secondarily trigger complex II deficiency [21]. Therefore, muscle respiratory chain investigations are not always useful for the diagnosis

Table 2
mtDNA depletion and respiratory chain activities in liver and muscle homogenates

	CI + III	CI	CII + CIII	CII	SDH	CIII	CIV	% mtDNA
<i>Liver</i>								
Patient	480	—	46	154	460	—	233	20
Parallel control	1726	—	102	815	1438	—	981	100
<i>Muscle</i>								
Patient	32	22	8	—	12	75	50	20
Control mean (SD) n = 100	24 (6)	20 (4.5)	9.2 (5.8)	—	10.3 (3.5)	63 (18)	42 (12)	100

Respiratory chain activities are referred to citrate synthase (mUnits/Unit CS), CI + III, rotenone-sensitive NADH-cytochrome c reductase; CI, NADH-decylubiquinone reductase; CII + III, succinate cytochrome c reductase; CII, succinate-dichlorophenol indophenol reductase; SDH, succinate dehydrogenase; CIII, decylubiquinol-cytochrome c reductase; CIV, cytochrome c oxidase (COX); mtDNA quantification is reported as % of the control mean.

of the hepatocerebral forms of MDS and liver biopsy may be necessary; alternatively, direct mutational study of the known associated genes could be useful in the identification of the disease.

Molecular and protein studies

Analysis of the genes involved in the hepatocerebral form of MDS, showed no alterations in *DGUOK* or *POLG*, while a homozygous transition in *MPV17* gene in position +5 in intron 1, c.70+5G>A (IVS1+5G>A) was found (Fig. 2). No other mutations within the coding sequence or within the flanking intronic sequences of *MPV17* were identified. The parents were heterozygous, and none of

100 control alleles carried the alteration, suggesting it could be a disease-causing variant.

To know the possible effect of the c.70+5G>A change on the protein, we analyzed the cDNA. After RT-PCR, controls showed the expected 490 bp fragment, but also an additional band of 374 bp (Fig. 3A). Subsequent sequencing of these two fragments demonstrated the normal product (490 bp) and an alternative spliced product due to exon 2 skipping (374 bp) (Fig. 3B). This alternative spliced fragment was seen as a minor form, but was always present in controls. We also observed a third band immediately below the full-length cDNA that was the result of heteroduplex formation between wild-type *MPV17* and exon 2 skipped fragments (Fig. 3A). *MPV17* cDNA of the patient showed only the fragment corresponding to this minor form, and the whole coding *MPV17* fragment was absent, while *GCDH* (glutaryl-CoA dehydrogenase gene) cDNA, used as control for RNA extraction and cDNA synthesis, was successfully amplified (Fig. 4A).

The Splice Site Score Calculator gave a 10.2 score to the donor splice site of intron 1 in the wild-type *MPV17* sequence, while when the c.70+5G>A change was introduced the calculator gave a score of 6.7. Maximum score is 12.6 and average score for constitutive exons is 8.1. When the molecular change was introduced in the sequence and was loaded on the three different splice site prediction programs, all of them predicted that the *MPV17* gene would completely lose the constitutive intron 1 donor splice site. In fact, the absence of the full-length transcript in the patient was in agreement with the prediction and the loss of intron 1 donor splice site probably causes the addition of part of intron 1. Taking into account that there is an in-frame TGA-stop codon after eight “intronic codons”, it would probably result in a truncated *MPV17* protein of about 31 amino acids. However, despite we performed the cDNA analysis in CHX treated fibroblast (Fig. 4B) we could not demonstrate the presence of such mRNA species. Therefore, the hypothetical aberrant transcript was probably degraded by a mechanism other than NMD.

The alternative *MPV17* mRNA is not degraded via NMD (Fig. 4B), maybe because the premature stop codon

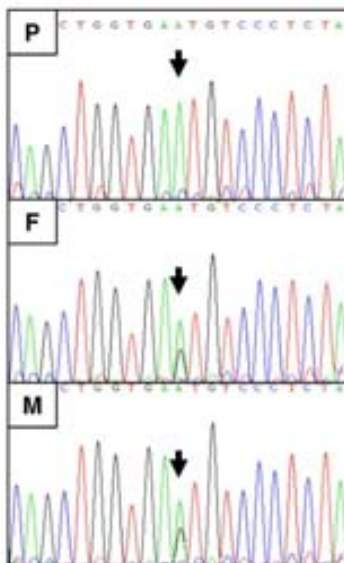


Fig. 2. Mutation analysis of *MPV17* showing the homozygous c.70+5G>A mutation in the patient (P), and the heterozygosity of his father (F) and mother (M).

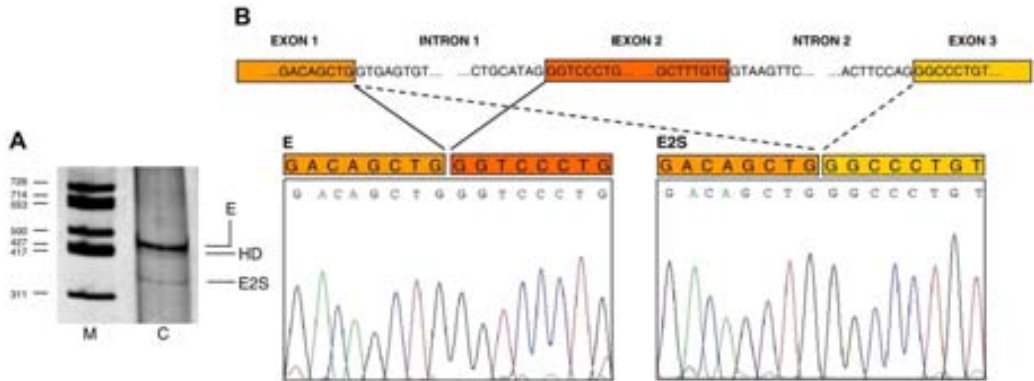


Fig. 3. (A) RT-PCR of control sample using specific primers in 12% polyacrylamide gel. (B) Direct sequences of extracted polyacrylamide gel bands showing exon skipping of exon 2. E, expected RT-PCR fragment of *MPV17* gene; HD, heteroduplex; E2S, exon 2 skipped fragment; C, control; M, molecular weight marker (expressed in bp).

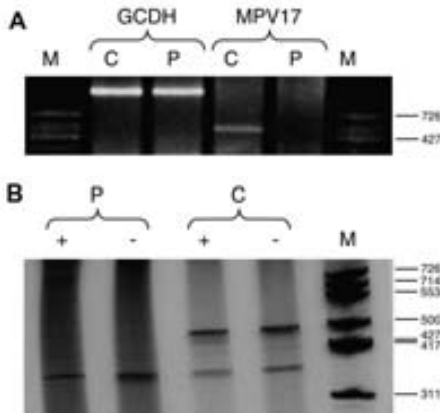


Fig. 4. (A) Agarose gel of *GCDH* and *MPV17* cDNA of the patient and control. (B) Polyacrylamide gel of cDNA amplified fragment in CHX treated (+) and nontreated (-) fibroblasts of patient (P) and control (C). M, molecular weight marker (expressed in bp).

does not follow the 55 bp-NMD rule [22,23]. Theoretically, the change c.70+5G>A would affect both spliced transcripts, but the reason or the mechanism to explain the presence of the alternative spliced form in the patient remains to be elucidated.

Western blot analysis, performed in liver homogenates, further corroborates previous molecular results. In fact, the amount of patient's protein is highly reduced, or almost absent, compared with that of controls (Fig. 5).

We conclude that, analysis of *MPV17* should be included in the differential diagnosis of patients with MDS presenting particular neurological symptoms, such as those reported in our patient. The knowledge of the

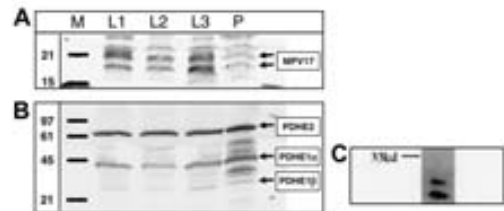


Fig. 5. *MPV17* Western blot. (A) One hundred micrograms of mitochondrial enriched preparation from liver in 15% SDS-polyacrylamide gel. (B) The same Western blot stripped and blotted again with PDH antibody. (C) *MPV17* antibody signal in a mouse heart lysate (provided by Proteintech, Chicago). L1/2/3, hepatic samples of control; P, hepatic sample of the patient; M, protein weight marker (expressed in kDa).

MPV17 genotype is the only tool to perform further prenatal diagnosis in these families.

Acknowledgments

The excellent technical assistance of Patricia Alcalá, Sonia Moliner and Lotti Ogg is acknowledged. Supported by Grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Nos. 03/0283, 06/1030 and 04/1351. Ministerio de Sanidad, Spain. Y. Campos is the recipient of a fellowship by the Programa de Estabilización de Investigadores del Sistema Nacional de Salud from Instituto de Salud Carlos III and Comunidad de Madrid (Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital 12 de Octubre).

References

- [1] M. Hirano, T.H. Vu, Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol.* 10 (2000) 451–461.

- [2] C.K. Mathews, S. Song, Maintaining precursor pools for mitochondrial DNA replication, *FASEB J.* 21 (2007) 2294–2303.
- [3] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2656–2668.
- [4] A. Saada, A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson, O. Elpeleg, Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy, *Nat. Genet.* 29 (2001) 342–344.
- [5] O. Elpeleg, C. Miller, E. Hershkovitz, M. Bitner-Glindzicz, G. Bondi-Rubinstein, S. Rahman, A. Pagnamenta, S. Eshhar, A. Saada, Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 1081–1086.
- [6] H. Mandel, R. Szargel, V. Labay, O. Elpeleg, A. Saada, A. Shalata, Y. Anbinder, D. Berkowitz, C. Hartman, M. Barak, S. Eriksson, N. Cohen, The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA, *Nat. Genet.* 29 (2001) 337–341.
- [7] R.K. Naviaux, K.V. Nguyen, POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 706–712.
- [8] A. Spinazzola, C. Viscomi, E. Fernandez-Vizarra, F. Carrara, P. D'Adamo, S. Calvo, R.M. Marsano, C. Donnini, H. Weiber, P. Strisciuglio, R. Parini, E. Sarzi, A. Chan, S. DiMauro, A. Rötig, P. Gasparini, I. Ferrero, V.K. Mootha, V. Tiranti, M. Zeviani, MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion, *Nat. Genet.* 38 (2006) 570–575.
- [9] A. Bourdon, L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chrétien, P. De Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, A. Rötig, Mutation of RRM2B encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), cause severe mitochondrial DNA depletion, *Nat. Genet.* 39 (2007) 776–780.
- [10] E. Ostergaard, E. Christensen, E. Kristensen, B. Mogensen, M. Duno, E.A. Shoubridge, F. Wilbrand, Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 383–387.
- [11] E. Sarzi, S. Goffart, V. Serre, D. Chrétien, A. Slama, A. Munnich, J. Spelbrink, A. Rötig, Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion, *Ann. Neurol.* (2007) (Epub ahead of print).
- [12] A.H. Hakonen, P. Isohanni, A. Paetau, R. Herva, A. Suomalainen, T. Lönnqvist, Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion, *Brain* 130 (2007) 3032–3040.
- [13] A. Ribes, E. Riudor, P. Briones, E. Christensen, J. Campistol, D.S. Millington, Significance of bound glutarate in the diagnosis of glutaric aciduria type I, *J. Inher. Metab. Dis.* 15 (1992) 367–370.
- [14] P. Briones, M.A. Vilaseca, A. Ribes, A. Vernet, M. Lluch, V. Cusi, A. Huckriede, E. Aqsterbbe, A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decrease amount of heat shock protein 60, *J. Inher. Metab. Dis.* 20 (1997) 569–577.
- [15] V. Tiranti, P. Chariot, F. Carella, A. Toscano, P. Soliveri, P. Girlanda, F. Carrara, G.M. Fratta, F.M. Reid, C. Mariotti, M. Zeviani, Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA^{Ser(UCC)} gene, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1421–1427.
- [16] A. Wong, G. Cortopassi, Reproducible quantitative PCR of mitochondrial and nuclear DNA copy number using the Light Cycler, *Methods Mol. Biol.* 197 (2002) 129–137.
- [17] Y. Campos, M.A. Martin, C. Navarro, P. Gordo, J. Arenas, Single-large mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis, *Neurology* 47 (1996) 1012–1014.
- [18] C.A. Beelman, R. Parker, Differential effects of translational inhibition *in cis* and *in trans* on the decay of the unstable yeast MFA mRNA, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9687–9692.
- [19] C.L. Karadimas, T.H. Vu, S.A. Holve, P. Chronopoulou, C. Quinzii, S.D. Johnsen, J. Kurth, E. Eggers, L. Palenzuela, K. Tanji, E. Bonilla, D.C. De Vivo, S. DiMauro, M. Hirano, Navajo neurohepatopathy is caused by a mutation in the MPV17 Gene, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 544–548.
- [20] L.J. Wong, N. Brunetti-Pierri, Q. Zhang, N. Yazigi, K.E. Bove, B.B. Dahms, M.A. Puchowicz, I. Gonzalez-Gomez, E.S. Schmitt, C.K. Truong, C.L. Hoppel, P.C. Chou, J. Wang, E.E. Baldwin, D. Adams, N. Leslie, R.G. Boles, D.S. Kerr, W.J. Graigen, Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy, *Hepatology* 46 (2007) 1218–1227.
- [21] E. Sarzi, A. Bourdon, D. Chrétien, M. Zarhrate, J. Corcos, A. Slama, V. Cormier-Daire, P. De Lonlay, A. Munnich, A. Rötig, Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood, *J. Pediatr.* 150 (2007) 531–534.
- [22] L.E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay, *Curr. Biol.* 12 (2002) 196–197.
- [23] H.A. Kuzmiak, L.E. Maquat, Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 306–316.

Article 4

Functional splicing assay supporting that c.70+5G>A mutation in the MPV17 gene is disease causing.

Navarro-Sastre A, García-Silva MT, Martín-Hernández E, Lluch M, Briones P, Ribes A.

Revista: Journal of Inherited Metabolic Diseases. 2010 Jul 8. Factor d'impacte: 3,577

MPV17 és un dels gens causant de depleció de mtDNA, causant una fallida hepàtica combinada amb encefalopatia, una condició devastadora sense tractament conegut. El gen codifica per una proteïna de membrana mitocondrial interna, però la seva funció continua essent desconeguda, i la única forma d'oferir un diagnòstic prenatal recau en els estudis moleculars. Es per això que les mutacions han d'estar ben caracteritzades. En aquest article describim un assaig funcional d'splicing basat en la utilització de minigens. Aquest assaig ens ha permès caracteritzar la mutació d'splicing c.70+5G>A com a causant de malaltia. Amb la reafirmació de la patogenicitat de c.70+5G>A, hem dut a terme l'anàlisi prenatal de tres fetus, dos afectes i un homozigot pels al·lels sans.

El doctorand, primer autor de l'article, ha realitzat les tasques experimentals de tot l'estudi. A més a més, ha participat amb gran protagonisme en l'anàlisi dels resultats.

RESEARCH REPORT

Functional splicing assay supporting that c.70+5G>A mutation in the *MPV17* gene is disease causingAleix Navarro-Sastre · María Teresa García-Silva ·
Elena Martín-Hernández · Montserrat Lluch ·
Paz Briones · Antonia RibesReceived: 5 March 2010 / Revised: 27 May 2010 / Accepted: 7 June 2010
© SSIEM and Springer 2010

Abstract Mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is a group of disorders characterized by a quantitative reduction of the mitochondrial DNA copy number and inherited as autosomal recessive traits. Patients affected by this group of diseases present with a wide variety of symptoms depending on the altered gene. *MPV17* is one of the genes causing combined encephalopathy and liver failure and at present there is no treatment for this devastating disease. The gene codes for an inner mitochondrial membrane protein, but its function is still unknown, and therefore, the only way to offer prenatal diagnosis relies on DNA studies. Consequently, mutations have to be well characterized. We previously described a patient homozygous for a novel intronic mutation in the *MPV17* gene (c.70+5G>A). Here we report the use of a functional splicing assay based on the use of minigenes to support that c.70+5G>A mutation is disease causing. We carried out three prenatal diagnoses on three consecutive

pregnancies of the previously described family. After two affected fetuses, a healthy baby was born homozygous for the wild-type allele.

Introduction

Mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (MDS) is a group of disorders characterized by a quantitative reduction of the mtDNA copy number and are inherited as autosomal recessive traits (Hirano and Vu 2000). Patients affected by this group of diseases present with a wide variety of symptoms depending on the altered gene. Early-onset myopathy is associated with mutations in *TK2* (OMIM *188250) (Saada et al. 2001), whereas myopathic patients with renal proximal tubulopathy present mutations in *RRM2B* (OMIM *604712) (Bourdon et al. 2007). Encephalomyopathy has been associated with mutations in *SUCLG1* (OMIM *611224) (Ostergaard et al. 2007) and *SUCLA2* (OMIM *603921) (Elpeleg et al. 2005), whereas mutations in *10orf2a* (OMIM *606075) (Sarzi et al. 2007), *POLG* (OMIM *174763) (Naviaux and Nguyen 2004), *DGUOK* (OMIM *601456) (Mandel et al. 2001), and *MPV17* (OMIM *137960) (Spinazzola et al. 2006) genes cause combined encephalopathy and liver failure. To date, no treatment is available for these devastating diseases. Therefore, prenatal diagnosis is one of the reproductive options for these families.

Mutations in the *MPV17* gene are one cause of MDS. This gene is located in the 2p23.3 region and encodes an inner mitochondrial membrane protein, but its function has not yet been elucidated. In a previous work published by our group (Navarro-Sastre et al. 2008), we described a patient presenting with MDS homozygous for a novel intronic mutation in *MPV17* (c.70+5G>A). Without the

Communicated by: Garry Brown

Competing interest: None declared.

A. Navarro-Sastre · M. Lluch · P. Briones · A. Ribes (✉)
Sección de Errores Congénitos del Metabolismo (IBC),
Servicio de Bioquímica y Genética Molecular and CIBER de
Enfermedades Raras (CIBERER), Hospital Clinic,
Edificio Helios III, planta baja C/ Mejía Lequerica s/n,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: aribes@clinic.ub.es

M. T. García-Silva · E. Martín-Hernández
Unidad Pediátrica de Enfermedades Raras and Center for
Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER),
Departamento de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre,
Madrid, Spain

P. Briones
CSIC,
Barcelona, Spain

Published online: 08 July 2010

Springer

possibility of performing enzymatic activity assays, the only way to offer prenatal diagnosis relies on DNA studies. Consequently, mutations have to be well characterized.

In this work, we report the use of a functional splicing assay based on the use of minigenes to support that the c.70+5G>A mutation in *MPV17* is disease causing. We carried out three prenatal diagnoses on three consecutive pregnancies of this family. After two affected fetuses, a healthy baby was born who is homozygous for the wild-type allele.

Materials and methods

Patient

This patient was previously reported (Navarro-Sastre et al. 2008). Briefly, he was the first child of healthy consanguineous parents. At 2 months of age, he presented with vomiting, jaundice, hypertransaminasemia, and failure to thrive. At 13 months, he manifested hypoglycemia, hepatic insufficiency, and encephalopathy. Physical examination showed decreased motility of the lower limbs with absent deep tendon reflexes and polyneuropathy. Organic and amino acids showed no specific alteration. Liver biopsy showed micronodular cholestatic cirrhosis. A few days later, he underwent liver transplantation. Three months later, during the course of a gastroenteritis, he was readmitted with lactic acidosis, hyponatremia, hypocalcemia, seizures, and encephalopathy. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed leukodystrophy. Following that, the patient presented multisystemic disease including neurological, renal, digestive, endocrinologic, and ophthalmologic affection. He died at the age of 22 months. MtDNA levels in the patient's liver were 20% of mean control values. Molecular studies identified a homozygous c.70+5G>A mutation in *MPV17* gene.

Biological material

Cultured skin fibroblast from the index case was used as a source of messenger RNA (mRNA). Chorionic villi of the three fetuses were taken at the 10–13 weeks of gestation. Genomic DNA was extracted from chorionic villi, peripheral blood, or fibroblasts using standard protocols.

Molecular analysis

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing was done by standard techniques.

Minigene construction and in vitro splicing analysis

To analyze the effect of the *MPV17* c.70+5G>A mutation on the splicing mechanism, we used the Exontrap System

(Mobic, Göttingen, Germany). Exon 2 and flanking regions were amplified from control and patient genomic DNA using specific primers (NG_008075.1, direct minigene primer; 5'-CTCGAGGGAGTCCATAGCTTCCCACA, reverse minigene primer; 5'-GGATCCCACCCTCCAAAACAGACTGG). These fragments were cloned into TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The insert was excised by XhoI and BamHI digestion (restriction sites introduced with the primers), purified using the Qiagen II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and subsequently cloned into the Exontrap vector using T4 polynucleotide kinase (Invitrogen). Clones containing the desired normal or mutant inserts were identified by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. Then, 0.2 µg of the wild-type or mutant minigene construct was transfected into COS-7 cells using Lipofectamine reagent (Invitrogen) in a 24-well plate following the manufacturer's recommendations. At 24–48 h posttransfection, the cells were subcultured into 16-cm Petri dishes, grown for 48 h, and harvested followed by RNA extraction. First- and second-strand complementary DNA (cDNA) were synthesized following the manufacturer's recommendations using Exontrap system primers. Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis and the excised bands were further analyzed by direct sequencing after extraction with Qiagen II gel extraction kit (Qiagen).

Results and discussion

MDS is an emerging group of severe genetic diseases for which treatment is not yet available. Mutation in the *MPV17* gene is one of several causes of MDS, but in this case, diagnosis relies exclusively on mutational studies, as the protein function is still not well known (Viscomi et al. 2009). Therefore, mutations in *MPV17* patients have to be well characterized.

In a previous work, we demonstrated that a patient with a homozygous mutation c.70+5G>A in the *MPV17* gene lacked the full-length mRNA but interestingly showed the presence of the alternative spliced transcript lacking exon 3 (according to changes in cDNA RefSeq NM_002437.4, although it has been described as lacking exon 2 by Navarro-Sastre et al. 2008), which theoretically would also be affected by c.70+5G>A change. This was intriguing, but the mechanism to explain the presence of the alternative spliced form in the patient remains to be elucidated. One possibility is that the loss of full-length mRNA was caused by a different change located deeper inside the intron that might not be easily detected by direct sequencing. To further demonstrate that loss of the full-length mRNA was caused by the c.70+5G>A change, the full exon 2 plus a portion of flanking intronic regions was amplified and introduced inside

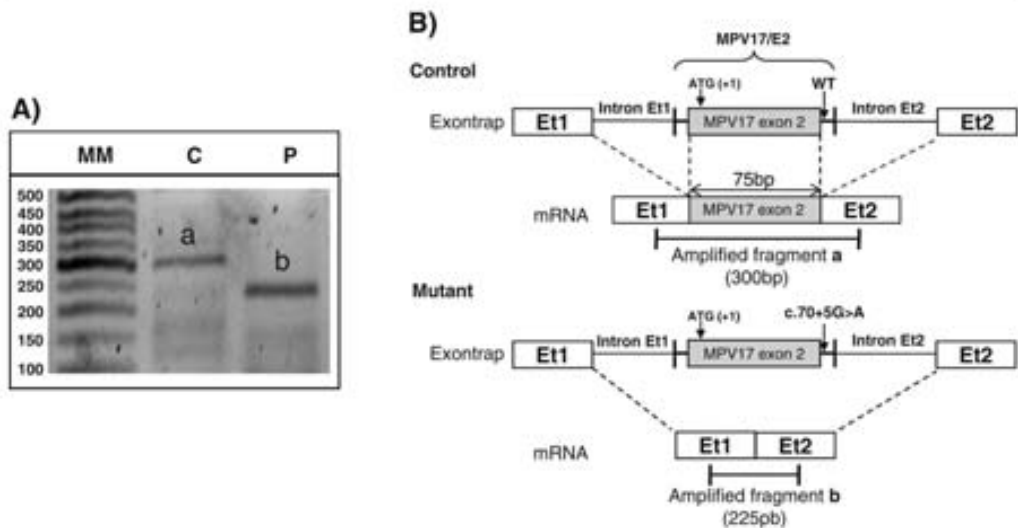


Fig. 1 Splicing assay for the wild-type and mutant minigene constructs. **a** The amplified fragments produced by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using vector-specific primers are shown both for control and c.70+5G>A mutant alleles.

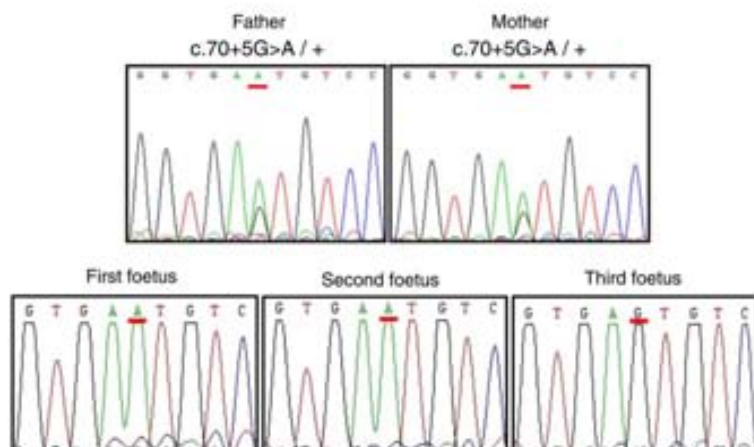
Control and mutant minigenes. *Et1* Exontrap exon 1, *Et2* Exontrap exon 2, *MPV17/E2* fragment of *MPV17* gene containing exon 2 and the flanking intronic regions, *C* control, *P* patient, *MM* molecular marker

a minigene construct (Fig. 1b). Minigene constructs with the wild-type and mutant sequences were subsequently generated in the Exontrap vector and then transfected into COS-7 cells and total RNA extracted. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was then performed, and the bands corresponding to control and mutant minigenes (Fig. 1a) were sequenced. Three independent transfection experiments showed that the mutant minigene produced a transcript of

the Exontrap vector with skipping of exon 2 (Fig. 1a). In contrast, the wild-type minigene efficiently included this exon (Fig. 1b), supporting data of the previous work and giving further evidence of the pathogenicity of c.70+5G>A change in the *MPV17* gene.

This change was previously investigated in silico using multiple splice-site predictors (Navarro-Sastre et al. 2008). All of them predicted that the *MPV17* gene would completely

Fig. 2 Prenatal diagnosis showing the heterozygous father and mother, one wild-type and two c.70+5G>A homozygous fetuses



lose the constitutive exon 2 donor splice site in the presence of the c.70+5G>A change, consistent with the minigene results published in this work. This family requested prenatal diagnosis in three different pregnancies. The first study detected a homozygous c.70+5G>A change, predictive of an *MPV17*-deficient affected fetus. The same occurred in the second prenatal test, but the third pregnancy gave rise to a healthy boy with a homozygous wild-type allele (Fig. 2).

The etiology of hepatocerebral MDS has been well described, and about 29 patients presented with pathogenic changes in *MPV17* (Poulton et al. 2009; El-Hattab et al. 2010). There is no treatment for MDS, and patients usually die at an early age due to hepatic failure. In a few cases, hepatic transplantation has been attempted to prevent severe evolution of the disease (Parini et al. 2009), but in some cases, as in our index patient, evolution was fatal (Navarro-Sastre et al. 2008). Molecular prenatal diagnosis is one of the available preventive tools for these families. Therefore, mutations have to be well characterized to unequivocally demonstrate that the changes found are the cause of the disease.

Acknowledgments This work was performed in the context of the PhD program of the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Autonomous University of Barcelona. The CIBER of Rare Diseases (CIBERER) is an initiative of the ISCIII. This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, grant number ETES-P108/90348).

References

Bourdon A, Mimai L, Serre V et al (2007) Mutation of RRM2B encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), cause severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 39:776–780

- El-Hattab AW, Li FY, Schmitt E et al (2010) *MPV17*-associated hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: new patients and novel mutations. *Mol Genet Metab* 99:300–308
- Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E et al (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 76:1081–1086
- Hirano M, Vu TH (2000) Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol* 10:451–461
- Mandel H, Szargel H, Labay V et al (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 29:337–341
- Navarro-Sastre A, Martín-Hernández E, Campos Y et al (2008) Lethal hepatopathy and leukodystrophy caused by a novel mutation in *MPV17* gene: Description of an alternative *MPV17* spliced form. *Mol Genet Metab* 94:234–239
- Naviaux RK, Nguyen KV (2004) *POLG* mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 55:706–712
- Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E et al (2007) Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 81:383–387
- Parini R, Furlan F, Notarangelo L et al (2009) Glucose metabolism and diet-based prevention of liver dysfunction in *MPV17* mutant patients. *J Hepatol* 50:215–221
- Poulton J, Hirano M, Spinazzola A et al (2009) Collated mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (excluding the mitochondrial gamma polymerase, *POLG1*). *Biochim Biophys Acta* 1792:1109–1112
- Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 29:342–344
- Sarzi E, Goffart S, Serre V et al (2007) Twinkle helicase (*PEO1*) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 62:579–587
- Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarna E et al (2006) *MPV17* encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 38:570–575
- Viscomi C, Spinazzola A, Maggioni M et al (2009) Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in *Mpv17* knockout mice. *Hum Mol Genet* 18:12–26

Article 5

A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins.

Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, Landa J, Font A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Ugarte M, Gutierrez-Solana LG, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Vaquerizo J, Riudor E, Briones P, Elpeleg O, Ribes A, Lill R.

Revista: American Journal of Human Genetics. 2012 Nov 11; 89(5):656-67. Factor d'impacte: 10,603

En aquest treball descrivim la identificació d'un gen (*NFU1*), associat a una sèrie de pacients que presenten acidosi làctica, hiperglicèmia, deficiència de l'activitat piruvat deshidrogenasa i del sistema de clivatge de la glicina.

La homogeneïtat clínica, i sobre tot bioquímica, ens va impulsar a realitzar el mapatge per homozigotat en dos dels pacients. Varem identificar una zona comuna d'homozigotat de 1.24 Mb en el cromosoma 2 i l'anàlisi dels gens codificants ens va permetre la identificació d'una mutació de canvi de sentit en homozigotat en el gen *NFU1* (c.622G>T). El gen *NFU1* codifica per una proteïna altament conservada en totes les espècies i implicada en la biogènesis dels clusters de sulfur de ferro (Fe-S).

El fenotip bioquímic dels pacients suggeria una activitat deficient de l'enzima lipoic àcid sintasa (LAS), una proteïna que necessita clusters de Fe-S com a cofactor. Si la funció de l'enzim LAS està alterada, no hi hauria capacitat de sintetitzar àcid lipoic per tal que es pugui unir a les proteïnes que el necessiten; PDH, alfa-cetoglutarat deshidrogenasa (KGDH), deshidrogenasa d'alfa-ceto àcids de cadenes laterals ramificades i el sistema de clivatge de la glicina. Efectivament, es va poder constatar una disminució del grau de lipoilació de les proteïnes dependents d'àcid lipoic, el que suggeria una manca d'activitat LAS. Per confirmar que la disminució de LAS era

deguda a la alteració de NFU1 vam silenciar el gen en cèl·lules HeLa. Els resultats van confirmar que la lipoilació de PDH i KGDH eren deficientes en absència de la proteïna NFU1. Els mateixos defectes bioquímics es van observar en un model de llevat on les soques amb la mutació c.622G>T presentaven les mateixes deficiències que les cèl·lules humanes silenciades.

Aquest estudi funcional ens ha permès conèixer la funció específica de la proteïna NFU1 en la biosíntesi de clusters de Fe-S i en la maduració de proteïnes Fe-S. La implicació en la biosíntesi d'àcid lipoic va ser suggerida i posteriorment demostrada mitjançant el fenotip bioquímic dels pacients. Utilitzant models cel·lulars demostrem que la proteïna NFU1 és necessària com a donadora de sulfur per la biosíntesi d'àcid lipoic.

NFU1 es el primer gen en el que se ha demostrat una implicació en la biosíntesi d'àcid lipoic en humans. La descripció clínica, bioquímica y genètica d'aquesta malaltia obre les portes a la cerca d'altres gens implicats en l'esmentada biosíntesi, així com el disseny futur de noves estratègies terapèutiques.

En aquest article, el doctorand ha realitzat les tasques d'obtenció de proteïna Nfu1 recombinant, així com l'anticòs anti-Nfu1 utilitzat en el mateix treball, ha estat el responsable dels experiments de silenciament dels gens NFU1 i ISCU en cèl·lules HeLa, així com el posterior anàlisi de paràmetres bioquímics, així com tasques intel·lectuals en l'elaboració de l'article.

REPORT

A Fatal Mitochondrial Disease Is Associated with Defective NFU1 Function in the Maturation of a Subset of Mitochondrial Fe-S Proteins

Aleix Navarro-Sastre,^{1,2,14} Frederic Tort,^{1,2,14} Oliver Stehling,^{3,14} Marta A. Uzarska,^{3,14} José Antonio Arranz,⁴ Mireia del Toro,⁵ M. Teresa Labayru,⁶ Joseba Landa,⁷ Aida Font,^{1,2} Judit Garcia-Villoria,^{1,2} Begoña Merinero,^{2,8} Magdalena Ugarte,^{2,8} Luis Gonzalez Gutierrez-Solana,⁹ Jaume Campistol,^{2,10} Angels Garcia-Cazorla,^{2,10} Julian Vaquerizo,¹¹ Encarnació Riudor,⁴ Paz Briones,^{1,2,12} Orly Elpeleg,¹³ Antonia Ribes,^{1,2,15,16,*} and Roland Lill^{3,15,*}

We report on ten individuals with a fatal infantile encephalopathy and/or pulmonary hypertension, leading to death before the age of 15 months. Hyperglycinemia and lactic acidosis were common findings. Glycine cleavage system and pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) activities were low. Homozygosity mapping revealed a perfectly overlapping homozygous region of 1.24 Mb corresponding to chromosome 2 and led to the identification of a homozygous missense mutation (c.622G>T) in *NFU1*, which encodes a conserved protein suggested to participate in Fe-S cluster biogenesis. Nine individuals were homozygous for this mutation, whereas one was compound heterozygous for this and a splice-site (c.545+5G>A) mutation. The biochemical phenotype suggested an impaired activity of the Fe-S enzyme lipoic acid synthase (LAS). Direct measurement of protein-bound lipoic acid in individual tissues indeed showed marked decreases. Upon depletion of *NFU1* by RNA interference in human cell culture, LAS and, in turn, PDHC activities were largely diminished. In addition, the amount of succinate dehydrogenase, but no other Fe-S proteins, was decreased. In contrast, depletion of the general Fe-S scaffold protein ISCU severely affected assembly of all tested Fe-S proteins, suggesting that *NFU1* performs a specific function in mitochondrial Fe-S cluster maturation. Similar biochemical effects were observed in *Saccharomyces cerevisiae* upon deletion of *NFU1*, resulting in lower lipoylation and SDH activity. Importantly, yeast *Nfu1* protein carrying the individuals' missense mutation was functionally impaired. We conclude that *NFU1* functions as a late-acting maturation factor for a subset of mitochondrial Fe-S proteins.

Iron-sulfur cluster (ISC) biogenesis is a complex process involving at least 25 components in mitochondria and cytosol.^{1–3} The precise function of the mitochondrial ISC assembly protein *NFU1* is unknown, the more so because its depletion in yeast is associated with comparatively weak defects of mitochondrial Fe-S proteins.^{4,5} Here, we identified ten individuals with mutations in *NFU1* (MIM 608100) and a fatal mitochondrial disease displaying the biochemical features associated with a defect in lipoic acid synthesis.⁶ This co-factor is synthesized by the Fe-S enzyme lipoic acid synthase (LAS). A LAS defect caused by impaired Fe-S cluster biogenesis might explain the biochemical phenotype of low lipoic acid content.

Ten individuals from nine unrelated Spanish families were born at term and developed normally throughout the early neonatal period. First symptoms started at age 1–9 months, and all the individuals died on or before the age of 15 months. The most prominent clinical features

were failure to thrive, pulmonary hypertension, and neurological regression (Table 1). However, a detailed clinical presentation and evolution allowed us to classify them into three groups. The first group included P1 to P3, presenting with failure to thrive and neurological involvement (hypotonia and irritability) without pulmonary hypertension. Brain imaging of P1 showed bilateral white-matter lesions. Spongiform degeneration, astrogliosis, and white-matter necrosis with preservation of U fibers were confirmed at autopsy in all three individuals. P1 and P2 were siblings and had an unaffected sister, whereas P3 had a brother who died at the age of 2 months of untreatable metabolic acidosis. However, biological material was not available for study. The second group consisted on individuals P4 and P5, who were diagnosed of pulmonary hypertension, and after a febrile illness both exhibited neurological regression. P4 was born to first-degree consanguineous parents and had an older sibling with a similar

¹Division of Inborn Errors of Metabolism, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Instituto de Investigación Biomédica PI Sunyer, 08028 Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Raras, 08028 Barcelona, Spain; ³Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch-Str. 6, 35033 Marburg, Germany; ⁴Metabolic Laboratory, Hospital Vall d'Hebrón, 08035 Barcelona, Spain; ⁵Department of Pediatric Neurology, Hospital Vall d'Hebrón, 08035 Barcelona, Spain; ⁶Department of Pediatrics, Hospital de Cruces, 48903 Bilbao, Spain; ⁷Department of Pediatrics, Hospital Ntra. Sra. de Ainzano, 20017 San Sebastián, Spain; ⁸Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain; ⁹Department of Pediatrics, Hospital Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain; ¹⁰Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, 08950 Barcelona, Spain; ¹¹Department of Pediatrics, Hospital Materno-Infantil Infanta Cristina, 06007 Badajoz, Spain; ¹²Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 08028 Barcelona, Spain; ¹³Monique and Jacques Roboth Department of Genetic Research, Hadassah, Hebrew University Medical Center, Jerusalem 91120, Israel

¹⁴These authors contributed equally to this work.

¹⁵These authors contributed equally to this work.

¹⁶Present address: Division of Inborn Errors of Metabolism, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, IDIBAPS Meja Lequerica s/n Helió III, 08028 Barcelona, Spain

*Correspondence: aribes@clinic.ub.es (A.R.), lill@staff.uni-marburg.de (R.L.)

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.10.005. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

Table 1. Relevant clinical and biochemical data of individuals carrying mutations in *NRU1*

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Clinical Data										
Gender	female	female	female	male	female	male	female	female	female	male
Family antecedents	Sibling of patient 2	Sibling of patient 1	Affected sibling	Consanguineous parents, Affected sibling	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Age at presentation/ age at death	9 m/13m	4 m/10m	5 m/12m	5 m/15m	7 m/8m	2 m/6m	4 m/15m	6m/7m	4m/5m	1m 25d/2 m
Clinical presentation	failure to thrive, psychomotor retardation, neurological regression	failure to thrive, psychomotor retardation, neurological regression	failure to thrive, neurological regression	neurological regression, pulmonary hypertension	neurological regression, pulmonary hypertension	failure to thrive, pulmonary hypertension	failure to thrive, Mild psychomotor retardation, pulmonary hypertension	pulmonary hypertension	pulmonary hypertension	failure to thrive, pulmonary hypertension, Dysmorphism
Brain imaging	Leukoatrophy and ventricular recesses	ND	ND	ND	seminal center and cerebellum lesions	ND	cerebral atrophy	ND	ND	normal cranial US
Biochemical Data: Lactate										
Plasma (0.5-2mM)	5	4.5	10	4.5	5.5	12	1.8	3.3	2.1	2.0
CSF (0.8-2.8 uM)	3.4	3.7	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.7
Biochemical Data: Glycine										
Plasma (CV:81-436 uM)	641	391	706	276	874	656	1500	1920	1137	758
Urine (CV:110-356 mmol/mol creatinine)	2534	556	857	696	3542	2206	ND	ND	ND	2282
CSF (CV:3.7-8 uM)	21	49	55	ND	ND	20	34	ND	22.7	30
CSF/plasma (<0.04)	0.03	0.12	0.08	ND	ND	0.03	0.02	ND	0.02	0.06
Biochemical Data: Alpha-amino adipate										
Urine (CV:<25 mmol/mol creatinine)	78	54	354	105	414	129	High	High	High	100
Biochemical Data: PDHC										
Activity in fibroblasts*	0.095	0.6 ^b	0.13	0.08	ND	ND	0.03	0.03	0.002	ND
Biochemical Data: GCS										
Activity in liver biopsy ^c	ND	ND	ND	ND	11%	8%	ND	Undetectable	7%	5%

ND, not determined.

* PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) activity is expressed as nmol/min/mg prot. control mean value ± standard deviation: 0.70 ± 0.26.

^b PDHC activity measured in muscle biopsy (control mean value ± standard deviation: 1.61 ± 0.74).

^c GCS (glycine cleavage system) activity is expressed as the percentage of the lowest control value.

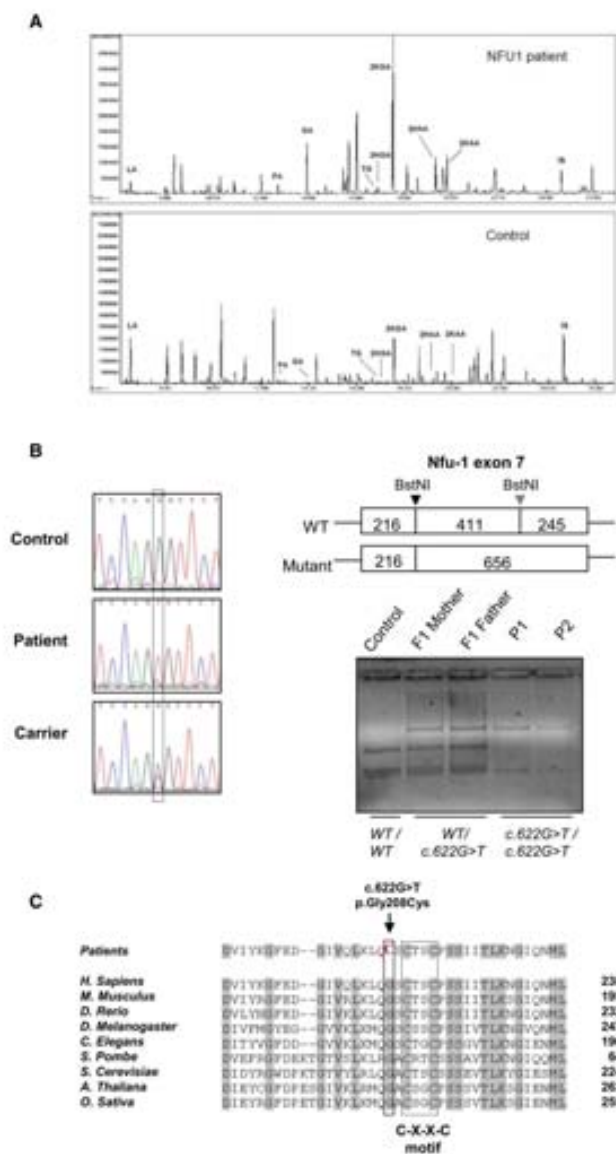


Figure 1. Biochemical and Genetic Characterization of Individuals

(A) Characteristic urine organic acid profile of an affected individual compared with an age-matched control. Samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and peaks were identified as lactic acid (LA), fumaric acid (FA), glutaric acid (GA), tyglyglycine (TG), 2-hydroxyglutaric acid (2HGA), 2-ketoglutaric acid (2KGA), 2-hydroxyadipic acid (2HAA), and 2-ketoadipic acid (2KAA). IS is the internal standard (undecanoic acid). LA, FA, 2HGA, and TG were not always increased. Quantitative data from five individuals are presented in Table S1.

(B) Sequence analysis of *NFU1* in genomic DNA shows the homozygous and heterozygous c.622G>T nucleotide substitution. RFLP analysis of family 1 shows the c.622G>T substitution in two affected siblings (P1 and P2) and in their heterozygous parents (F1) (right panel). Arrows indicate restriction sites for BstNI in both wild-type (WT) and mutant *NFU1*. The length of the restriction fragments is indicated in the boxes in the top panel.

(C) Multi-sequence alignment of the conserved part of *NFU1* protein from man and other indicated eukaryotes. The c.622G>T substitution identified in ten *NFU1* individuals replaces a conserved glycine with a cysteine at position 208 of the protein (p.Gly208Cys). The conserved Fe-S cluster binding motif CXXC is indicated.

tion, and astrogliosis in the central nervous system were found in all the cases in which autopsy was performed. Pulmonary samples of individuals P7, P8, and P9 showed obstructive vasculopathy with involvement of proximal and acinar arteries.

The biochemical phenotype included metabolic acidosis with variable lactic acidemia and hyperglycemia (Table 1). All individuals had high urinary excretion of 2-ketoglutaric, 2-ketoadipic, 2-hydroxyadipic, and glutaric acids, among others (Figure 1A and Table S1, available online); the excretion of glutaric acid was probably due to spontaneous decarboxylation of 2-ketoadipic acid.⁷ In cases where tissues were available, activity of the glycine cleavage system (GCS [MIM 238300]) in liver was low or undetectable. Pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) activity in fibroblasts was also low (Table 1), whereas the

clinical phenotype. Autopsy was not performed in these individuals. The third group comprised P6–P10; pulmonary hypertension was the main clinical feature in this group and was accompanied by failure to thrive in three individuals. Among these five individuals, only P7 had mild psychomotor retardation and recurrent hypoglycemia. Despite the absence of specific neurological symptoms in this group, areas of white-matter demyelination, vacuoliza-

partial PDHC reactions catalyzed by pyruvate decarboxylase (PDH-E1 [MIM 312170]) and dihydrolipoamide dehydrogenase (PDH-E3 [MIM 238331]) subunits were normal (not shown). Dihydrolipoamide acetyl transferase (PDH-E2 [MIM 608770]) activity was not measured, but analysis of its cDNA sequence did not reveal any mutation (not shown). Finally, the rates of ¹⁴C-substrate oxidation (pyruvate, leucine, and glutamate) by fibroblasts were low (Table 2).

Table 2. Substrate Oxidation and Respiratory-Chain Activities in Individuals Carrying Mutations in *NFU1*

	P1	P2	P3	P4	P7	P8	P9
Substrate Oxidation in Fibroblasts (Expressed as a Percentage of the Parallel Control)							
1- ¹⁴ C-Pyruvate	-	6%	5%	2%	6%	5%	8%
2- ¹⁴ C-Pyruvate	-	undetectable	3%	6%	-	undetectable	0.4%
1- ¹⁴ C-Glutamate	-	21%	2%	65%	-	25%	17%
1- ¹⁴ C-Leucine	-	43%	73%	40%	10%	-	-
Respiratory-Chain Activities in Frozen Muscle							
Complex I + complex III (CV:60-210 mU/U citrate synthase)	88	129	230	-	-	-	-
Complex II + complex III (CV:23-149 mU/U citrate synthase)	22	34	37	-	-	-	-
Complex IV (CV:600-1300 mU/U citrate synthase)	770	908	920	-	-	-	-
Citrate synthase (CV:56-176 mU/U citrate synthase)	136	112	130	-	-	-	-
(-) not determined.							

The antecedents in these families suggested an autosomal-recessive inheritance, and four families were of Basque origin; historical, linguistic, and numerous genetic studies support the homogeneity of the Basque people, who are clearly differentiated from other European populations.⁸ Therefore, we considered it appropriate to search for the genetic cause of the disease by linkage analysis in two of the individuals of Basque origin. Homozygosity mapping with DNA of P2 and P3 revealed a perfectly overlapping homozygous region of 1.24 Mb in both individuals (Figure S1); this region included 97 homozygous SNP markers, from rs4384823–rs2278791. This region harbors 22 open reading frames. On the basis of the individuals' biochemical phenotype, we focused on two genes encoding mitochondrial proteins: *FAM136A* (RefSeq NM_032822) and *NFU1* (RefSeq NM_001002755.1). No alterations for full-length cDNA of *FAM136A* were found. In contrast, sequence analysis of *NFU1* identified a homozygous mutation in exon 7 (c.622G>T) for individuals 1–9. This mutation changed a highly conserved glycine to a cysteine at position 208 of the protein (p.Gly208Cys) (Figure 1B). Glycine 208 is close to the Fe-S cluster binding motif,⁵ and it is conserved among all species (Figure 1C). All available parents—including the parents of P6, whose DNA was not available—and a sister of P1 and P2 were heterozygous for the mutation. No carriers were identified in a control group of 220 Spanish alleles (100 of them of Basque origin). Carrier rate was studied by restriction-fragment-length polymorphism (RFLP) analysis, which made use of the fact that the c.622G>T mutation removes a *Bst*NI restriction site in exon 7 (Figure 1B). Individual 10 (Tables 1 and 2) was compound heterozygous for the common mutation and a new substitution in the donor splice site of exon 6 (c.545+5G>A). Analysis of parents' DNA confirmed that the mutations were in separate alleles

(Figure 2A). RT-PCR showed normal expression of mRNA (Figure 2B, left panel). Although P10 is compound heterozygous, RFLP analysis showed only expression for the allele carrying the c.622G>T mutation. The same pattern was found in P2, which was used as a positive control (Figure 2B, left panel). Despite the lack of mRNA expression derived from the c.545+5G>A mutation, the *NFU1* protein levels of this individual were similar to those of P2 and the control (Figure 2B, right panel). To determine the effect of the c.545+5G>A mutation, we cloned exon 6 and the corresponding intronic flanking regions of both wild-type and mutant *NFU1* into an Exontrap System vector (Möbitec, Göttingen, Germany). COS7 cells transfected with these plasmids were analyzed by RT-PCR and sequenced with vector-specific primers. Our results showed that the c.545+5G>A nucleotide change caused a defective splicing and skipping of exon 6 (Figures 2C and S2). These data fit well with the absence of c.545+5G>A transcript in muscle of P1 because exon 6 skipping leads to a frameshift. The predicted transcript, with a premature stop codon at position 172, was probably degraded by the nonsense-mediated decay mechanism. Unfortunately, this effect could not be fully demonstrated because individual cell lines were not available.

The identification of one common mutation in all the individuals, nine of whom were homozygous and one of whom was compound heterozygous, and the fact that four of the families were of Basque origin suggests a founder effect in this population, but further studies are necessary to demonstrate it.

NFU1 contains a short segment of 60 amino acid residues with homology to bacterial NifU, a multi-domain protein involved in the assembly of Fe-S clusters in the complex metalloprotein nitrogenase.⁹ Fe-S clusters are essential cofactors involved in enzymatic reactions (e.g., in

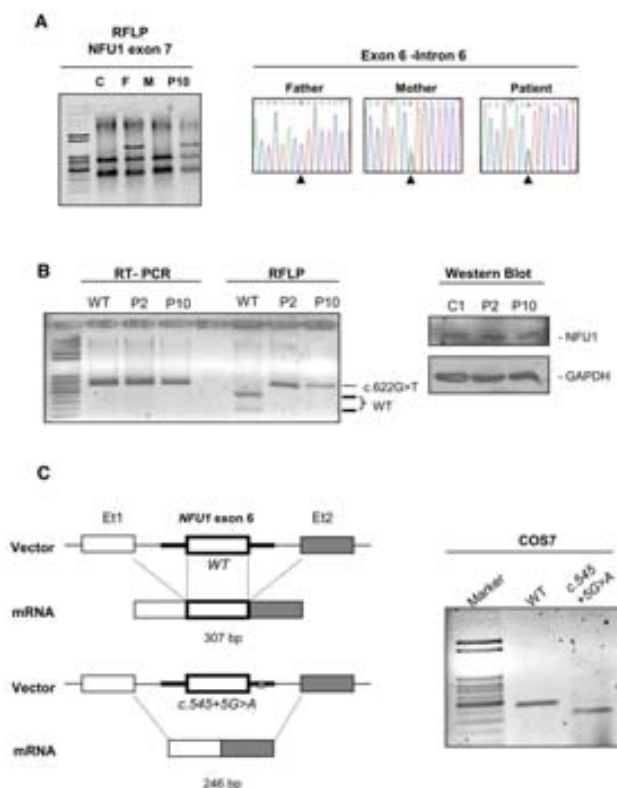


Figure 2. The c.545+5G>A Mutation Generates a Defective Splicing of *NFU1*

(A) Left panel: RFLP analysis in genomic DNA shows the heterozygous c.622G>T substitution in the affected individual (P10) and his father (F); C indicates a control, and M indicates the mother. Right panel: sequence analysis identified a heterozygous c.545+5G>A nucleotide change in P10 and his mother.

(B) Left panel: mRNA expression analysis by RT-PCR and RFLP in muscle tissue. P10 showed normal mRNA expression. RFLP analysis was negative for the allele carrying the c.545+5G>A mutation, but not for the allele with the c.622G>T mutation. P2 was used as a control. Right panel: immunoblot of muscle tissue extracts showed similar levels of NFU1 protein for P10, P2, and a control (C). GAPDH was used as a loading control.

(C) Splicing assay incorporating wild-type and c.545+5G>A minigene Exontrap vector system (Mobictec, Göttingen, Germany). Abbreviations are as follows: Et1, Exontrap exon 1; Et2, Exontrap exon 2; NFU1 exon6, exon 6 and the flanking intronic regions (left panel). RT-PCR using vector-specific primers in COS7 cells transfected with these vectors showed a defective splicing as a consequence of c.545+5G>A mutation (right panel).

aconitase), electron transfer (e.g., ferredoxins and respiratory complexes I, II, and III), and sensing (e.g., of iron by IRP1).¹⁰ Prokaryotic and eukaryotic relatives of NFU1 bind a labile Fe-S cluster in vitro, and hence it has been suggested that these proteins perform a scaffold function for the assembly of an Fe-S cluster.^{4,5,11–16} However, the precise physiological function of the mitochondrial member of the NFU1 protein family has hitherto remained unknown, mainly because the deletion of yeast *NFU1* is associated with only a weak defect of some mitochondrial Fe-S proteins.⁴ Double deletion of *NFU1* and *ISU1*, encoding one of the two general scaffold proteins for Fe-S cluster assembly in yeast mitochondria, is associated with more severe defects of aconitase and mitochondrial respiratory complexes, but the exact role of NFU1 and its functional relation to ISU1 remained unclear. Of particular interest here is the role of Fe-S clusters as sulfur donors in the synthesis of lipoic acid catalyzed by the radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme LAS in mitochondria.¹⁷ Lipoic acid becomes covalently attached to specific lysine residues of four mitochondrial enzymes; the E2 subunits of PDH, α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKD), and the H protein of

protein ligases, which transfer lipoic acid to target proteins.⁶

The biochemical phenotype of the individuals was consistent with aberrations in lipoic acid-dependent pathways (see above). We therefore analyzed muscle homogenates of three individuals for protein-bound lipoic acid by immunostaining with a lipoic acid-specific antibody. This assay directly measures the product of the LAS enzyme. In agreement with previous results we detected two predominant proteins of 65 and 50 kDa, corresponding to lipoic acid-bound PDH-E2 and α -KGDH-E2, respectively.¹⁸ The lipoylated protein levels of PDH-E2 were at least 60% decreased in the *NFU1* individuals as compared to controls (Figure 3). In contrast, the amounts of PDH-E2 protein were unaltered, strongly suggesting that the decreased levels of E2 protein-bound lipoic acid were due to defective lipoylation. As expected, none of these individuals showed any decrease of NFU1 protein levels (Figure 3). Together, all our biochemical observations were consistent with an impairment of lipoic acid biosynthesis in *NFU1* individuals, suggesting that NFU1 is required for LAS activity. Moreover, both LAS¹⁷ and NFU1 (Figure S3) are predominantly if not exclusively located in mitochondria.

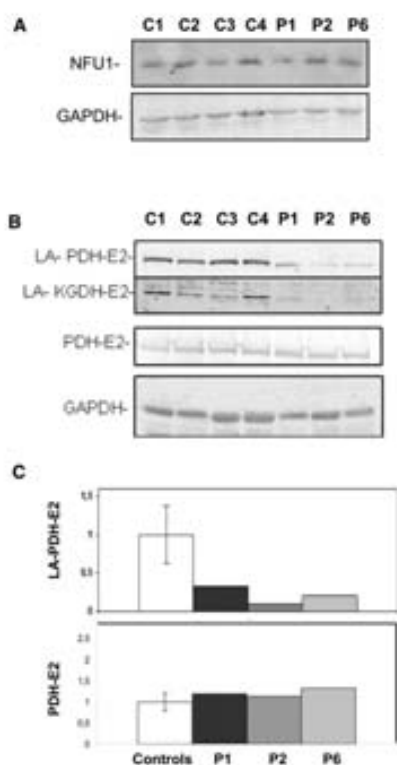


Figure 3. A Point Mutation in Human *NFU1* Decreases the Amounts of Protein-Bound Lipic Acid

(A) Immunostaining of *NFU1* in muscle tissue extracts from a control and individuals carrying a *NFU1* mutation. GAPDH was used as a loading control.

(B) Immunostaining of PDH- and KGDH-bound lipic acid and PDH-E2 protein; muscle tissue extracts were used as in (A). GAPDH was used as a loading control.

(C) Densitometric quantitation shows a marked decrease of lipic acid bound to the E2 subunit of PDH in three *NFU1* individuals (P1, P2, and P6), compared to four control (C1-C4) individuals. Control results are represented as the mean value \pm 1 standard deviation ($n = 4$). The protein levels of the PDH-E2 subunit did not change. Anti-*NFU1* antisera were raised in rabbits immunized with recombinant His₆-tagged *NFU1*. Additional antibodies were directed against GAPDH, protein conjugated-lipic acid (Calbiochem), and PDHc (kindly donated by W. Ruitenbeek, Netherlands). The densitometry program IMAGEJ was applied so that levels of total PDH-E2- and PDH-E2-bound lipic acid could be quantified. All values were normalized to GAPDH.

To study the potential role of *NFU1* in Fe-S cluster maturation of LAS, we employed an established cell culture system to deplete *NFU1* by RNA interference (RNAi).^{19,20} HeLa cells were transfected with a pool of *NFU1*-specific or scrambled siRNAs (Dharmacon), and thereafter cells were grown for 3 days before biochemical analyses. We repeated this procedure twice to achieve efficient depletion of *NFU1* mRNA and protein (Figures 4A and 4B). Growth of *NFU1*-depleted cells

was slightly decreased as compared to mock-treated or scrambled siRNA controls (Figure S4). Immunoblotting of cell extracts revealed markedly decreased levels of lipic acid bound to the E2 subunits of PDH and α -KGDH as well as to the H protein of GCS (Figure 4C). Consistent with these findings, PDHC activity was not detectable after *NFU1* depletion for 9 days (Figure 4D). In contrast, the levels and activities of cellular Fe-S proteins, including cytosolic and mitochondrial aconitases and cytosolic GPAT, were virtually unchanged. Because defects in Fe-S cluster assembly result in rapid degradation of the apoproteins,¹⁹ these results indicated a normal maturation process (Figures 4C and 4D). Likewise, the activity of cytochrome oxidase (COX; complex IV) was unaffected upon *NFU1* depletion. Even though this enzyme lacks an Fe-S cluster, synthesis of its heme A requires the function of the mitochondrial [2Fe-2S] ferredoxin Fdx2.²¹ In contrast, both the amount and activity of succinate dehydrogenase (SDH; complex II) were more than 5-fold decreased upon *NFU1* depletion (Figures 4C and 4D). Respiratory-chain activities examined in the available frozen muscle extracts of three *NFU1* individuals showed no deficiencies in complexes I+III and complex IV. However, the activities of complexes II+III were low, consistent with a SDH deficiency in these individuals (Table 2). Together, these results strongly suggest that *NFU1* is specifically required for the maturation of both LAS and SDH, but it appears to be dispensable for other tested Fe-S proteins. The functional defect of LAS explains the defect in lipic acid biosynthesis.

The *in vitro* binding of a labile Fe-S cluster to *NFU1* proteins from several species led to the suggestion that *NFU1* might act as an Fe-S scaffold protein.^{5,11,16} However, it remained unclear whether mitochondrial *NFU1* indeed performs such a role *in vivo* and what the relation might be to the major Fe-S scaffold protein ISCU,²² alterations in which lead to myopathy with exercise intolerance.^{23,24} To address this issue, we depleted ISCU by RNAi and examined the effects on the levels and function of various Fe-S proteins (Figures 5A and 5B). In contrast to the results for *NFU1*-depleted cells, the deficiency of ISCU severely affected cell growth and resulted in hardly any cell material after the second transfection (Figure 5S). Immunostaining of cell extracts showed a substantial decrease in the levels of virtually all analyzed Fe-S proteins, including mitochondrial and cytosolic aconitases, SDH, and cytosolic GPAT upon depletion of ISCU, probably as a result of the instability of the respective Fe-S apoproteins (Figure 5C). Moreover, the levels of the lipic acid-containing subunits of α -KGDH, PDH, and GCS were substantially decreased, suggesting a potential defect in LAS maturation upon ISCU depletion. Treatment with scrambled siRNAs was without severe effects. Accordingly, enzyme activities measured after 3 days of ISCU depletion showed a strong decrease for PDHC, mitochondrial and cytosolic aconitases, and SDH (Figure 5D). COX activity, as a non-Fe-S control, was only slightly affected. These findings indicate that virtually all tested Fe-S proteins were severely

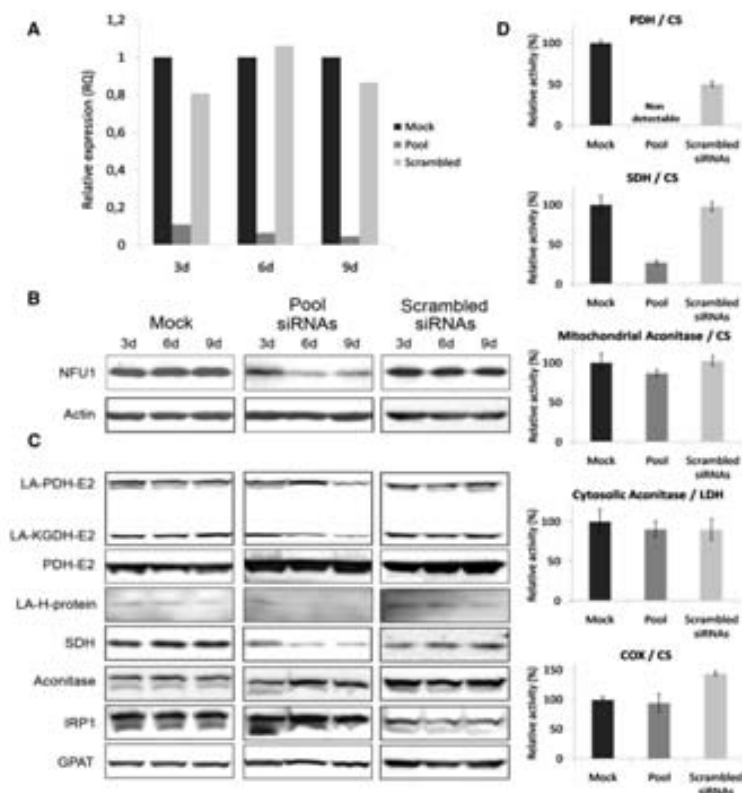


Figure 4. Depletion of NFU1 in Human Cell Culture Diminishes the Function of Protein-Bound Lipoic Acid and Succinate Dehydrogenase, but Not That of Other Fe-S Proteins

HeLa cells were transfected three times with a pool of four different *NFU1*-specific (3 μ g each) or scrambled siRNA (12 μ g) or were mock treated. Each transfection was followed by growth of cells for 3 days (d).

(A and B) The efficiency of *NFU1* silencing was analyzed by qRT-PCR (A) or SDS-PAGE and immunostaining of NFU1 (B). Actin served as a loading control.

(C) The effect of *NFU1* depletion on other cellular proteins was examined by immunostaining. Abbreviations are as follows: LA-PDH-E2, lipoic acid bound to pyruvate dehydrogenase E2 subunit; LA-KGDH-E2, lipoic acid bound to α -ketoglutarate dehydrogenase E2 subunit; lipoic acid bound to H protein (LA-H) of the glycine cleavage system; aconitase, mitochondrial aconitase; IRP1, iron regulatory protein 1; and GPAT, glutamate phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase.

(D) Activities of the indicated enzymes were measured with cell extracts derived after three transfections (growth of 9 days). The values were normalized to the activities of citrate synthase (CS) or lactate dehydrogenase (LDH), and displayed as a fraction of the values obtained for mock-treated cells. Error bars indicate the relative error, *rE* ($n = 3$). COX indicates cytochrome *c* oxidase. Antibodies were directed against mitochondrial aconitase (kindly provided by L. Szwedra), GPAT (kindly provided by H. Puccio), beta-actin (Santa Cruz Biotechnology), SDH (30 kDa Fe-S protein subunit, MitoSciences), and IRP1 (clone 295B, kindly provided by R. Eisenstein).

impaired by the loss of ISCU function. Hence, the results support the major role of ISCU as a Fe-S scaffold protein²² and in turn make a general scaffold function for NFU1 unlikely. Rather, NFU1 appears to play a more specific, auxiliary role in the biogenesis of SDH and LAS, e.g., in the dedicated transfer of a NFU1-bound Fe-S cluster to these target Fe-S apoproteins.

To better understand the mechanistic role of NFU1 and to get an initial idea of the functional consequences of the p.Gly208Cys change in individuals, we took advantage

of the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. Previously, no specific defects that would allow mechanistic conclusions had been observed upon deletion of yeast *NFU1*⁴ (see above). Using the information gained from studies on humans, we analyzed several enzyme activities in *nfu1 Δ* yeast cells in which *NFU1* was deleted. Although there was only a small (1.3-fold) decrease in aconitase and COX activities, we observed substantial (>4-fold) decreases in SDH and PDH activities, in striking similarity to the individuals' phenotype (Figure 6A). To address the

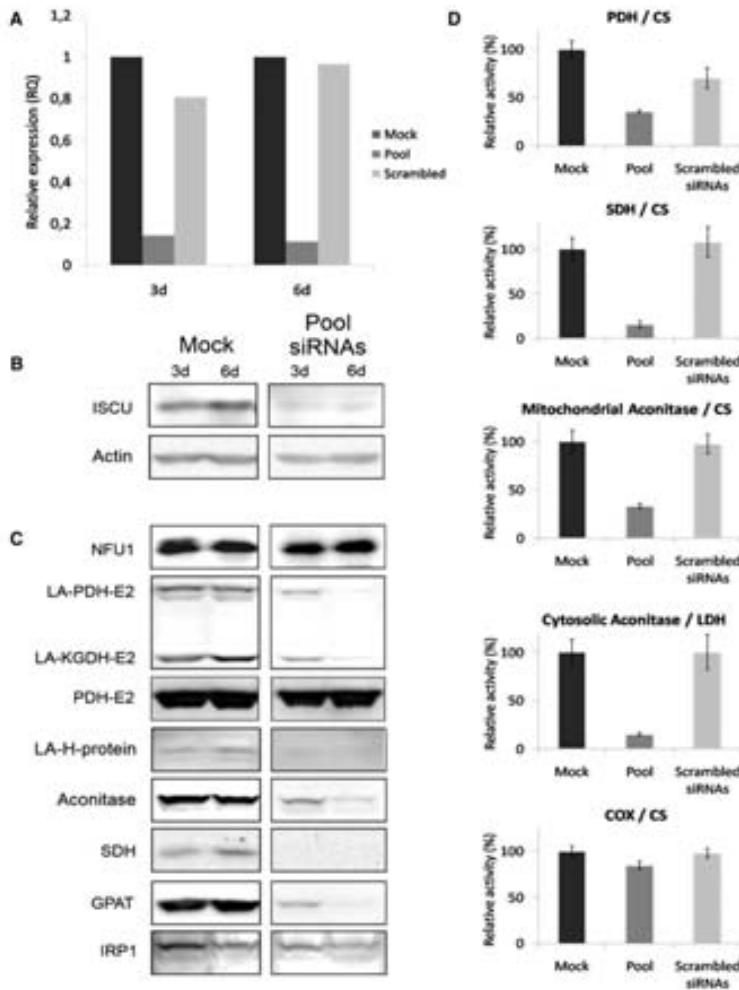


Figure 5. Depletion of ISCU Results in a General Defect of Fe-S Proteins and a Deficiency in Protein-Bound Liponic Acid
 HeLa cells were transfected twice with a pool of four different *ISCU*-specific (3 μ g each) or scrambled siRNA (12 μ g) or were mock treated. Each transfection was followed by growth of cells for 3 days (d). Error bars indicate the relative error, rE (n = 3). (A and B) The efficiency of *ISCU* silencing was analyzed by qRT-PCR (A) or SDS-PAGE and immunostaining of *ISCU* (B). Actin served as a loading control. (C) The effect of *ISCU* depletion on protein-bound liponic acid or various cellular proteins was examined by immunostaining. For abbreviations see Figure 3C. (D) The activities of the indicated enzymes were measured and evaluated as in Figure 4D after depletion of *ISCU* for 3 days. Anti-*ISCU* antisera were raised in rabbits immunized with recombinant *ISCU*.

functionality of the mutated *NFU1* protein, we introduced a corresponding p.Gly194Cys mutation into yeast *NFU1*. Plasmids encoding wild-type and mutated yeast *Nfu1* were transformed into *nfu1 Δ* cells, and enzyme activities were recorded. Wild-type *Nfu1* was able to restore the severe enzyme defects of *SDH* and *PDH* to normal levels (Figure 6B). In contrast, *Nfu1*^{Gly194Cys} conferred only

a minor improvement of these activities, demonstrating that this protein is functionally impaired.

What might be the mechanistic basis of the functional impairment of *Nfu1*^{Gly194Cys}? Purified *Nfu1* can bind an Fe-S cluster,⁵ yet *in vivo* no such binding was detectable by ⁵⁵Fe radiolabeling or immunoprecipitation of *Nfu1*, even after overproduction²⁵ (Figure 6C). It has been

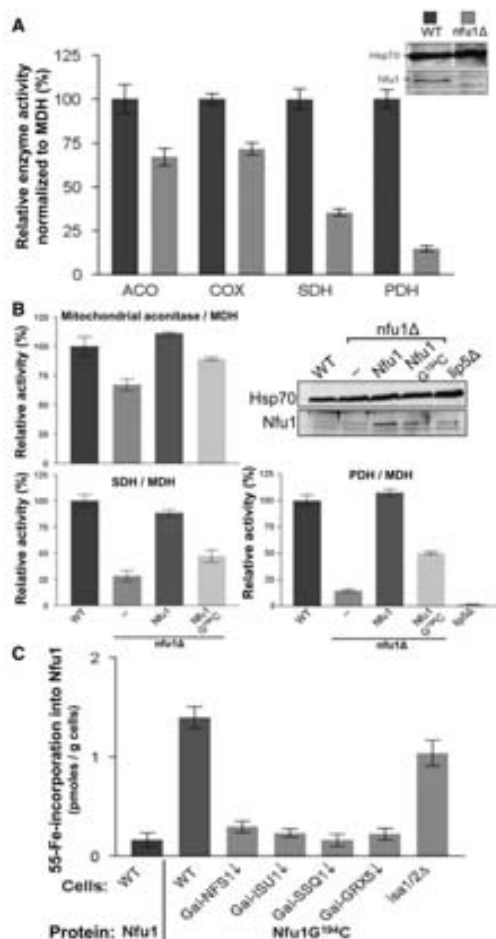


Figure 6. The Gly208Cys Mutation of Yeast NFU1 Leads to Its Functional Impairment and Identifies NFU1 as a Late-Acting Fe-S Transfer Protein

(A) Enzyme activities of mitochondrial aconitase (ACO), respiratory complexes II (SDH) and IV (COX), and pyruvate dehydrogenase (PDH) were determined relative to malate dehydrogenase (MDH) in mitochondria isolated from wild-type (WT) and *nfu1Δ* yeast cells cultivated in rich glucose medium. Deletion of *NFU1* was confirmed by PCR (not shown) and immunostaining (inset). Nfu1 was detected between two unspecifically labeled bands.

(B) Yeast *nfu1Δ* cells were transformed with overexpression vectors containing no gene (-), the wild-type gene, or the human-mutation-corresponding Gly194Cys variant of yeast *NFU1* (Nfu1G^{194C}). After growth in synthetic glucose-containing medium (SD) lacking uracil, mitochondria were isolated from these and wild-type (WT) cells. The indicated enzyme activities and the immunostaining were performed as in (A). Cells with a deletion of *LIP5* (*lip5Δ*) encoding yeast LAS were used as a control.

(C) Wild-type, Gal-NFS1, Gal-ISU1/*isu2Δ* (Gal-ISU1), Gal-SSQ1, Gal-GRX5 and *isa1/2Δ* cells overproducing wild-type Nfu1 or Nfu1G^{194C} were grown in iron-poor SD media. Cells were radiolabeled with 10 μ Ci ⁵⁵Fe for 2 hr, and the overproduced proteins

reported for ferredoxins or the bacterial Fe-S scaffold protein IscU that mutations might stabilize the association of bound Fe-S clusters^{26,27}. We therefore tested Fe-S cluster binding to mutated Nfu1^{Gly194Cys} and found that it bound significant amounts of radioactive ⁵⁵Fe in vivo (Figure 6C). Binding of ⁵⁵Fe was dependent on several core members of the ISC assembly machinery (Nfs1, Isu1, Ssq1, and Grx5), but not on the late-acting *Isa1-2*.^{1,28} This striking result suggests that the Nfu1^{Gly194Cys}-bound iron is part of an Fe-S cluster whose synthesis is dependent on both the major scaffold protein Isu1 and factors releasing the Fe-S cluster from Isu1 (Ssq1, Grx5).²⁹ Hence, Nfu1 appears to receive its cluster from Isu1 and act late in Fe-S protein maturation as a specific Fe-S cluster transfer protein (Figure 7), a conclusion which nicely fits our observations in HeLa cells (see above). Together, these results make it rather unlikely that NFU1 plays a role as an alternative Fe-S scaffold protein. NFU1 might cooperate with the *Isa* proteins and *Iba57*, for which a function late in the maturation of specific Fe-S proteins containing a [4Fe-4S] cluster has been shown previously.^{28,30,31} This newly defined role of mitochondrial NFU1 late in the Fe-S protein biogenesis pathway is similar to the assumed function of the mitochondrial P loop NTPase IND1, which also transiently binds an Fe-S cluster and is specifically required for assembly of respiratory complex I, but not for assembly of other mitochondrial Fe-S proteins.^{32,33}

Our study has identified disease-causing *NFU1* mutations associated with a fatal mitochondrial disease characterized by biochemical defects in the activity of lipoic acid-containing proteins. A similar fatal infantile disease with decreased activities of PDHC and α -KGDH, lactic acidosis, and hyperglycinemia has previously been described.³⁴ The defect was located on chromosomal region 2p14-2p13, an observation that fits well with the *NFU1* localization. However, the three siblings of one of the two families of this study³⁴ presented with neonatal symptoms, in contrast to the individuals described here, who developed phenotypes several months after birth. Furthermore, PDH-E1 and complexes I, II, and III of the respiratory chain were severely deficient in individuals of the other study, whereas our individuals showed only complex II deficiency. The observed differences might be due to a more severe mutation within the same gene or caused by a defect in another gene. Interestingly, the lipoic acid defects seen in cultured HeLa cells upon *NFU1* depletion could not be reverted by the addition of lipoic acid to the medium (data not shown), a result consistent with the inability of exogenously provided lipoic acid to rescue a LAS knockout mouse.³⁵

Our work adds to the list of disorders associated with ISC-assembly-machinery components such as frataxin,

which were immunoprecipitated from cell extracts with polyclonal antibodies raised against Nfu1. The amounts of coprecipitated ⁵⁵Fe were quantified by scintillation counting. The background obtained for samples with nonspecific antibodies was subtracted. Error bars indicate the SEM ($n \geq 4$).

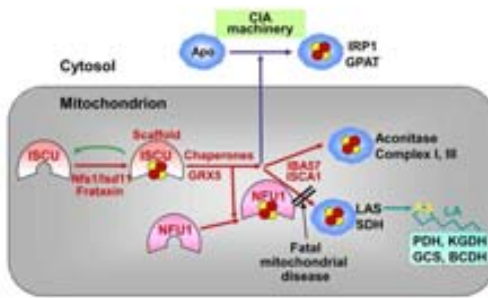


Figure 7. A Working Model for the Late-Acting Function of NFU1 in Mitochondrial Fe-S Protein Biogenesis

The findings of this work suggest a late-acting function of NFU1 in the pathway of Fe-S (red and yellow circles) protein maturation. NFU1 is preferentially needed for Fe-S cluster assembly of succinate dehydrogenase (SDH) and lipolic acid synthase (LAS), but not of other proteins such as aconitase. An NFU1 functional defect due to a point mutation in the fatal mitochondrial disease described in this work results in defective SDH and LAS and hence in decreased synthesis of lipolic acid (LA) and a lack of lipoylation of the E2 subunits of PDH, α -KGDH, and BCDH and the H protein of GCS. In contrast to depletion of NFU1, depletion of the major Fe-S scaffold ISCU affects maturation of virtually all cellular Fe-S proteins, including cytosolic ones, which additionally need the CIA machinery for maturation. ISCU, together with the cysteine desulfurase Nfs1-Iso11 and frataxin, which is depleted in Friedreich ataxia, is also required for de novo synthesis of a transiently bound Fe-S cluster on NFU1. Chaperones and GRX5 may be involved in Fe-S cluster release from ISCU and transfer to both NFU1 and target apoproteins. Finally, NFU1 is needed for maturation of specific targets such as LAS and SDH. In this late step, NFU1 may cooperate with IBA57-ISCA1, yet these latter proteins appear to address most or all mitochondrial target proteins with a [4Fe-4S] cluster.

GRX5, and ISCU^{23,24,36,37} (Figure 7). Remarkably, NFU1-deleted yeast cells show wild-type growth rates,⁴ and likewise our NFU1 individuals do not show any conspicuous phenotype until at least 1 month of age. Apparently, yeast and human embryonic and neonatal cells can bypass the requirement for full NFU1 function in the maturation of SDH and LAS. Both of these latter proteins contain [4Fe-4S] clusters, which also require the ISC proteins IBA57 and ISCA1 for assembly^{28,30,38} (Figure 7). Determining whether these or other (unknown) proteins are responsible for (partially) taking over the function of NFU1 in yeast and in the first months of human life will require further work. It is also possible that individuals after birth face conditions, e.g., increased oxygen exposure, which require the specific function of NFU1. Insights into these interesting questions will require a better understanding of the interaction network of NFU1 and other late-acting ISC proteins such as ISA and IBA57. Our biochemical explanation of the NFU1-associated disease phenotype and the identification of the particular step of NFU1 function in Fe-S protein biogenesis will be of importance for both diagnosis and potential treatment of individuals afflicted with lipolic acid and Fe-S cluster biogenesis defects.

All the procedures with human material were approved by the ethics committee of the Hospital Clinic, Barcelona.

Supplemental Data

Supplemental data include five figures and three tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

Acknowledgments

We are grateful to the families involved in this study and for helpful discussion with U. Mühlhoff. This research was supported in part by Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain), and by the grants FIS P108/90348 and FIS P108/0307. We acknowledge the technical support of Angela Arias, Carlota Ogg, Sonia Moliner, and Patricia Alcalá. O.E. acknowledges the support of the Association Française contre Myopathie and the Israeli Ministry of Health. R.L. acknowledges generous support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 593 and GRK 1216), von Behring-Röntgen Stiftung, the LOEWE program of state Hessen, and Max-Planck Gesellschaft. Thanks are due to M.O. Rolland and C. Acquaviva (Hospices des Civils de Lyon) for glycine cleavage system analysis. Part of this work has been performed in the context of the PhD program of the Autonomous University of Barcelona.

Received: August 12, 2011

Revised: October 7, 2011

Accepted: October 13, 2011

Published online: November 10, 2011

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htm>

Ensembl, <http://www.ensembl.org/index.html>

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

HomoloGene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>

PolyPhen: prediction of functional effect of human rsSNPs, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), www.omim.org

References

- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* 49, 4945–4956.
- Sheftel, A., Stehling, O., and Lill, R. (2010). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 302–314.
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., and Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10206–10211.
- Tong, W.H., Jameson, G.N., Huynh, B.H., and Rouault, T.A. (2003). Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9762–9767.

6. Hiltunen, J.K., Autio, K.J., Schonauer, M.S., Kursu, V.A., Diekmann, C.L., and Kastaniotis, A.J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1195–1202.
7. Duran, M., Beemer, F.A., Wadman, S.K., Wendel, U., and Jansen, B. (1984). A patient with alpha-ketoadipic and alpha-aminoadipic aciduria. *J. Inher. Metab. Dis.* 7, 61.
8. Rodríguez-Espeleta, N., Alvarez-Busto, J., Imaz, L., Regueiro, M., Aczárte, M.N., Bilbao, R., Iriando, M., Gil, A., Estonba, A., and Aransay, A.M. (2010). High-density SNP genotyping detects homogeneity of Spanish and French Basques, and confirms their genomic distinctiveness from other European populations. *Hum. Genet.* 128, 113–117.
9. Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., and Johnson, M.K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247–281.
10. Beinert, H. (2000). A tribute to sulfur. *Eur. J. Biochem.* 267, 5657–5664.
11. Yuwaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 599–604.
12. Touraine, B., Boutin, J.P., Marion-Poll, A., Briat, J.F., Peltier, G., and Lobréaux, S. (2004). Nfu2: A scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant J.* 40, 101–111.
13. Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I., and Nakai, M. (2004). The *Arabidopsis* chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell* 16, 993–1007.
14. Balasubramanian, R., Shen, G., Bryant, D.A., and Golbeck, J.H. (2006). Regulatory roles for IscA and SufA in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 188, 3182–3191.
15. Angelini, S., Gerez, C., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M., Barras, F., and Py, B. (2008). NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *J. Biol. Chem.* 283, 14084–14091.
16. Bandyopadhyay, S., Naik, S.G., O'Carroll, I.P., Huynh, B.H., Dean, D.R., Johnson, M.K., and Dos Santos, P.C. (2008). A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *J. Biol. Chem.* 283, 14092–14099.
17. Booker, S.J., Cicchillo, R.M., and Grove, T.L. (2007). Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 543–552.
18. Padmalayam, I., Hasham, S., Saxena, U., and Pillarisetti, S. (2009). Lipoic acid synthase (LASY): A novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. *Diabetes* 58, 600–608.
19. Stehling, O., Netz, D.J., Niggemeyer, B., Rösser, R., Eisenstein, R.S., Puccio, H., Pierik, A.J., and Lill, R. (2008). Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5517–5528.
20. Stehling, O., Sheftel, A.D., and Lill, R. (2009). Chapter 12 Controlled expression of iron-sulfur cluster assembly components for respiratory chain complexes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 456, 209–231.
21. Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hanneemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11775–11780.
22. Tong, W.H., and Rouault, T.A. (2006). Functions of mitochondrial ISC and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab.* 3, 199–210.
23. Olsson, A., Lind, L., Thornell, L.E., and Holmberg, M. (2008). Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1666–1672.
24. Mochel, F., Knight, M.A., Tong, W.H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P.M., Singleton, A., Rouault, T.A., Fischbeck, K.H., and Haller, R.G. (2008). Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 652–660.
25. Pierik, A.J., Netz, D.J., and Lill, R. (2009). Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes. *Nat. Protoc.* 4, 753–766.
26. Yeh, A.P., Chatelet, C., Soltis, S.M., Kuhn, P., Meyer, J., and Rees, D.C. (2000). Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J. Mol. Biol.* 300, 587–595.
27. Unciuleac, M.C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Dean, D.R. (2007). In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* 46, 6812–6821.
28. Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J. Biol. Chem.*, In Press. Published online October 10, 2011. 10.1074/jbc.M111.296152.
29. Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22, 4815–4825.
30. Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1851–1861.
31. Mühlenhoff, U., Gerl, M.J., Flaugar, B., Pirner, H.M., Balsler, S., Richhardt, N., Lill, R., and Stolz, J. (2007). The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 495–504.
32. Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynh, M.A., Lill, R., Brandt, U., and Balk, J. (2008). The iron-sulfur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.* 27, 1736–1746.
33. Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J., Kerscher, S., Elsässer, H.P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., and Lill, R. (2009). Human Ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6059–6073.
34. Seyda, A., Newbold, R.F., Hudson, T.J., Verner, A., MacKay, N., Winter, S., Feigenbaum, A., Malaney, S., Gonzalez-Halphen, D., Cuthbert, A.P., and Robinson, B.H. (2001). A novel syndrome affecting multiple mitochondrial functions, located by microcell-mediated transfer to chromosome 2p14-2p13. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 386–396.
35. Yi, X., and Maeda, N. (2005). Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8387–8392.

36. Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* 17, 215–217.
37. Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110, 1353–1358.
38. Song, D., Tu, Z., and Lee, F.S. (2009). Human ISCA1 interacts with IOP1/NARFL and functions in both cytosolic and mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 35297–35307.

The American Journal of Human Genetics, Volume 89

Supplemental Data

A Fatal Mitochondrial Disease Is Associated with Defective NFU1 Function in the Maturation of a Subset of Mitochondrial Fe-S Proteins

Alex Navarro-Sastre, Frederic Tort, Oliver Stehling, Marta A. Uzarska, José Antonio Arranz, Mireia del Toro, M^o Teresa Labayru, Joseba Landa, Aida Font, Judit Garcia-Villoria, Begoña Merinero, Magdalena Ugarte, Luis Gonzalez Gutierrez-Solana, Jaume Campistol, Angels Garcia-Cazorla, Julian Vaquerizo, Encarnació Riudor, Paz Briones, Orly Elpeleg, Antonia Ribes, and Roland Lill

SUPPLEMENTAL FIGURES

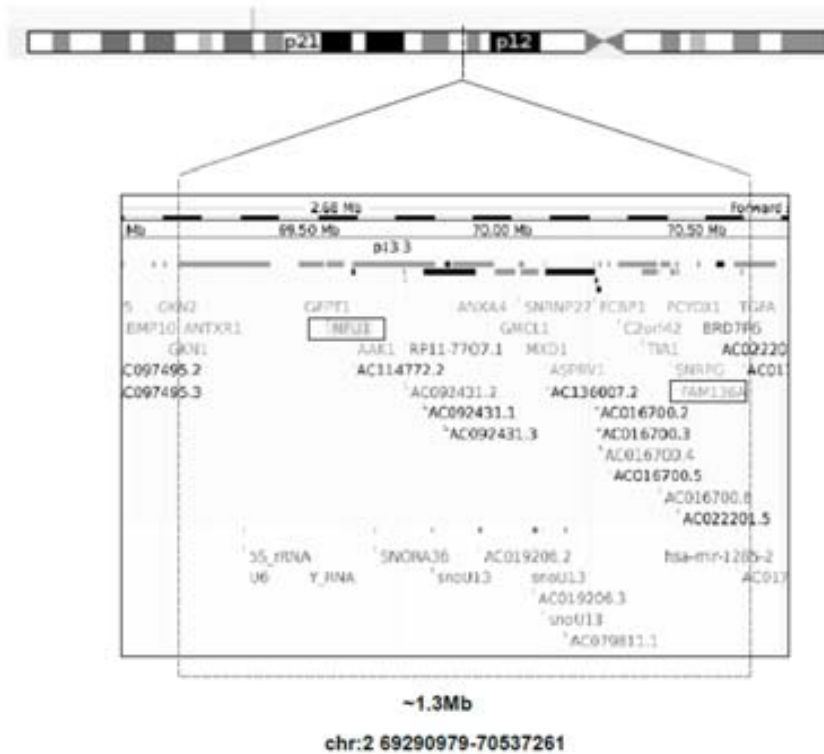


Figure S1. Homozygosity mapping using DNA of individuals P2 and P3 by Genechip Human Mapping 250K SNP array of Affymetrix. Digestion with NspI, ligation of the adaptor, and amplification with a generic primer that recognizes the adaptor sequence were followed by fragmentation, end labelling, and hybridization to the chip in accordance with the manufacturer's instructions. Homozygous regions >1.0 Mb were manually detected. The analysis identified a 1.24 Mb overlapping homozygous region (dotted lines) in chromosome 2, including 97 homozygous SNP markers (rs4384823 to rs2278791). This region harbors 22 open reading frames. *FAM136A* and *NFUI* genes encoding two mitochondrial proteins are highlighted. Part of the figure has been obtained from website www.ensembl.org. The numbering is according to HG18 version of the human genome.

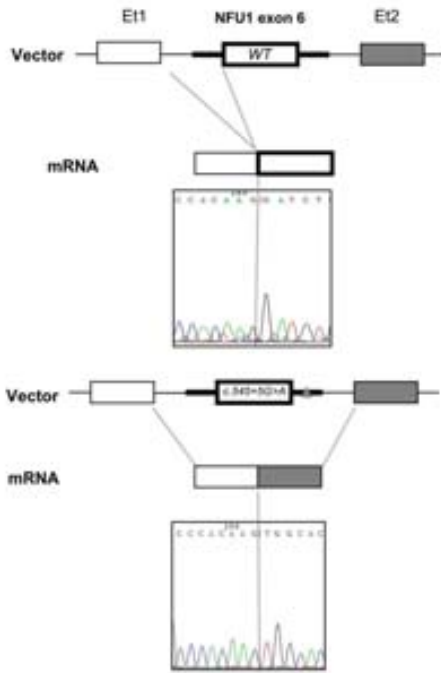


Figure S2. COS7 cells transfected with minigene plasmids containing both the wild-type exon 6 and the c.545+5G>A mutation were analyzed by RT-PCR. Sequencing analysis using vector-specific primers showed skipping of exon 6.

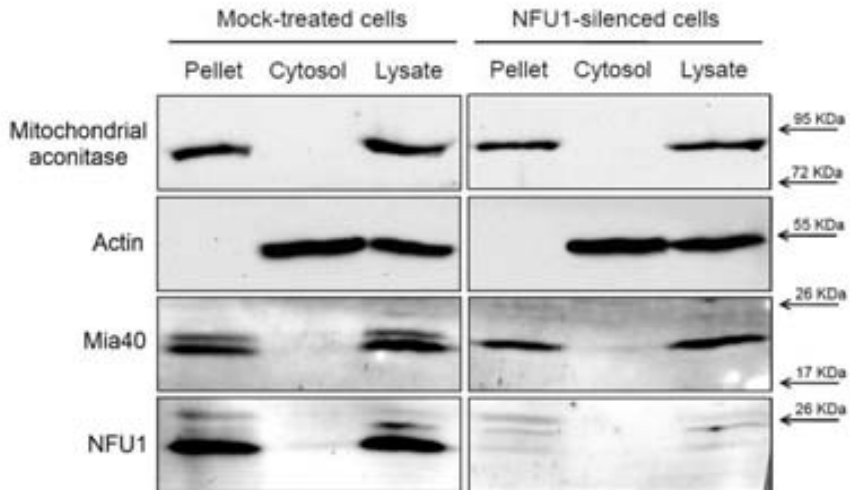


Figure S3. Subcellular fractionation indicates the predominant mitochondrial localization of NFU1. HeLa cells without (mock-treated) and with RNAi-mediated depletion of NFU1 (cf. Fig. 2) were permeabilized with digitonin, and the cell lysate was centrifuged for 10 min at 15,000 xg. Pellet (containing mitochondria) and supernatant (cytosol) fractions as well as the cell lysate were analyzed by immunostaining of the indicated proteins. NFU1 co-fractionated with mitochondrial aconitase and Mia40 (mitochondrial intermembrane space), but not with actin (cytosol). The molecular mass of marker proteins is indicated on the right.

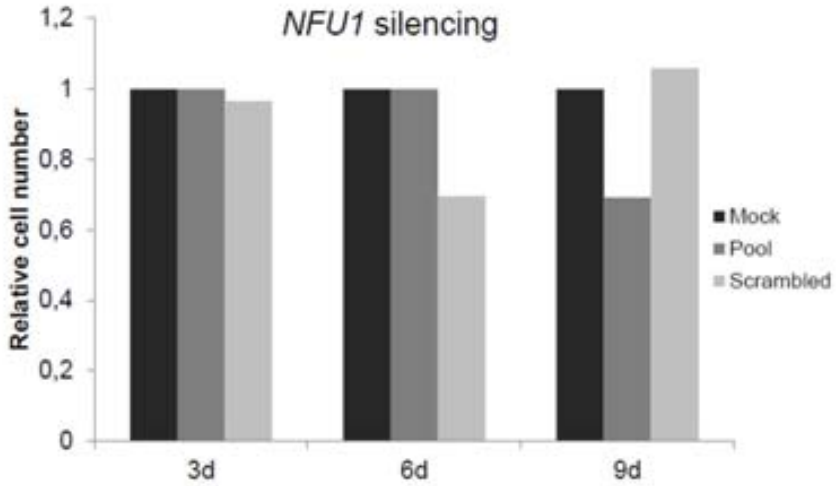


Figure S4. Growth of HeLa cells upon *NFU1* depletion by treatment with siRNAs. Cells were transfected three times with a pool of *NFU1*-specific or scrambled siRNAs and grown for 3, 6 and 9 days (d) as described in Fig. 2. After each harvest cell numbers were determined, and normalized to those of mock-transfected cells.

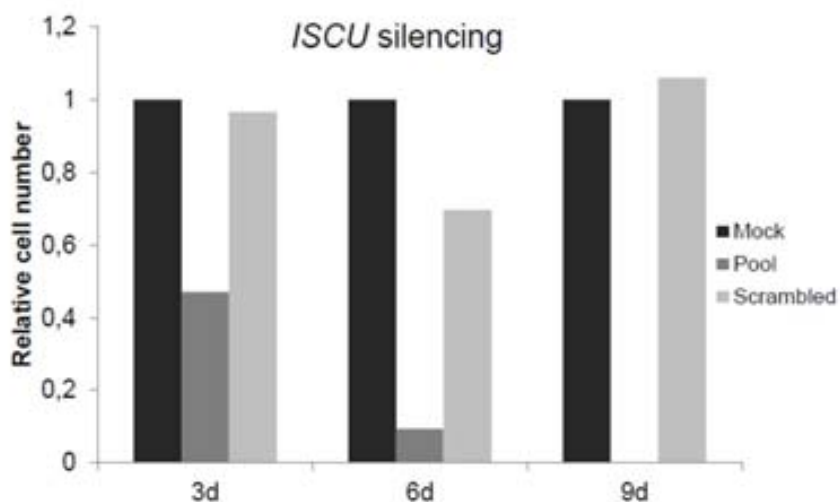


Figure S5. Growth of HeLa cells upon *ISCU* depletion by treatment with siRNAs. Cells were transfected three times with a pool of *ISCU*-specific or scrambled siRNAs and grown for 3, 6 and 9 days (d) as described in Fig. 3. After each harvest cell numbers were determined, and normalized to those of mock-transfected cells. No cell material was recovered after 9 days of growth after treatment with *ISCU*-specific siRNAs.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1. Quantitative analysis of organic acids in urine of *NFUI* individuals at admission.

ND, not determined.

Organic acids in urine (mmol/mol creatinine)	Individuals				
	P3	P5	P7	P8	P9
2-Ketoglutarate (10-271)	ND	315	1498	3913	204
2-Hydroxyglutarate (4-32)	ND	30	151	465	52
2-Ketoadipate (<5)	40	42	1191	639	240
2-Hydroxyadipate (<5)	142	ND	2040	229	93
Glutarate (2-10)	25	63	240	395	33
Tyglycine (<5)	19	45	117	7	17

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotides (NFU1)	Forward	Reverse
Exon 1	GGTCCTAGAGGAGGGAATGG	AGACAGCCCTCAGGGCTCAC
Exon 2	TGCTTGCCTAAGTAAGTGGAAA	TTGGACAATATCCTTTGCCAAAT
Exon 3	CTTGGGTTTTTCCCCAGTTT	GCAGTGCACATAGAAATGCAA
Exon 4	AACAAAATTGGCCCATGAGTTG	CAGAAAGAAATGGAAAATGTTGGA
Exon 5	GCTTCGACCTCTCAAAATGC	CCCAAAAGCCCATTTCTGTAA
Exon 6	TCCAAAATATATCTCCATACCA	TCAATTGTCACGGCTACCTG
Exon 7	GCGGTAAGCGGAGGAAATA	CTCCAAAAGTGTGGGATTA
Exon 8	GGCTTGTGTCATGCCCTCATTAT	GGGGTTTCACCATGTTGTTC

Table S3. siRNAs used in this study.

siRNAs against	NFUT	ISCU
siRNA#1	GAUACUAGAAUACGGCCAA	GAGCUAUGAGAUACGCACA
siRNA#2	GGAGGUAGAAGCGGUAGAA	CAGCAUGUGGUGACGUAU
siRNA#3	GUGGCAAUGAUUAAAGGAU	CAUAAAACAGAUUGCGCAU
siRNA#4	UGCCCUAGUUCAAUCAUUA	GGUCUGAAUUAUUGAUAGA

4. Resum global i discussió general

4.1. Posta a punt de la determinació del número de còpies de mtDNA en teixits humans i obtenció de valors control.

Per tal de poder diagnosticar la síndrome de depleció mitocondrial es va posar a punt la tècnica per a la quantificació del número de còpies de mtDNA tant en fetge com en múscul, ja que aquests són el teixits diana dels quals es poden obtenir biòpsies. L'anàlisi del número de còpies de mtDNA es va dur a terme mitjançant l'anàlisi dels teixits per PCR quantitativa a temps real (qRTPCR) segons Andreu et al.¹³⁴ amb certes modificacions. El mètode està basat en l'amplificació d'una regió mitocondrial conservada, en aquest cas un fragment del rRNA 12S, i la quantificació del mtDNA va ser corregida per l'anàlisi simultani d'un gen nuclear de còpia única, en el nostre cas, un fragment del gen *RNAseP*. Els resultats quantitatius de les còpies de mtDNA i de les còpies nuclears van ser obtinguts utilitzant una recta patró. Aquesta recta patró es va construir clonant els fragments dels gens 12S i *RNAseP* dins de vectors comercials i quantificant el número de còpies per espectrofotometria. Dilucions seriades d'aquestes molècules van ser utilitzades per a la quantificació absoluta del número de còpies nuclears i mitocondrials en teixits humans.

Els valors control van ser expressats en unitats relatives: número de còpies de mtDNA / número de còpies de DNA nuclear (mtDNA/ndDNA). Quan va ser possible, aquesta relació va ser referida a l'activitat citrat sintasa (CS): (mtDNA/ndDNA)/CS. La CS és un indicador de massa mitocondrial i és utilitzada universalment per tal d'expressar els resultats de les activitats enzimàtiques de la CRM, però mai ningú ho havia utilitzat per l'expressió dels resultats de depleció de mtDNA. Aquesta forma d'expressió és més acurada ja que permet conèixer el grau de depleció en relació al contingut mitocondrial i, com veurem més endavant, en alguns casos ha estat molt útil per tal de reafirmar o descartar depleció. L'únic inconvenient es el treball afegit que representa haver de valorar la CS en la mateixa mostra en que es valora la depleció.

Per tal d'obtenir un rang de valors control en múscul congelat, es van determinar el número de còpies de mtDNA en un total de 48 biòpsies provinents d'individus control. Els resultats obtinguts es van poder subdividir en rangs d'edat estadísticament significatius: 0-1 any, 1-5 anys, 5-20 anys i >20 anys (Figura 10A). Els resultats obtinguts mostren que el contingut de mtDNA del múscul augmenta amb l'edat de l'individu, així com ja s'havia descrit en altres treballs^{56, 135}. Juntament amb la determinació del número de còpies de mtDNA es va determinar l'activitat citrat sintasa (CS) utilitzant la mateixa mostra. En aquest cas, l'activitat CS no varia fins als 20 anys i incrementa significativament a partir d'aquesta edat (Figura 10B). La mesura combinada de mtDNA/nDNA i CS en la mateixa mostra ens permet relacionar ambdós valors; (mtDNA/nDNA)/CS). Aquest relació incrementa progressivament en els primers 3 rangs d'edat, però es manté igual en el quart (Figura 10C).

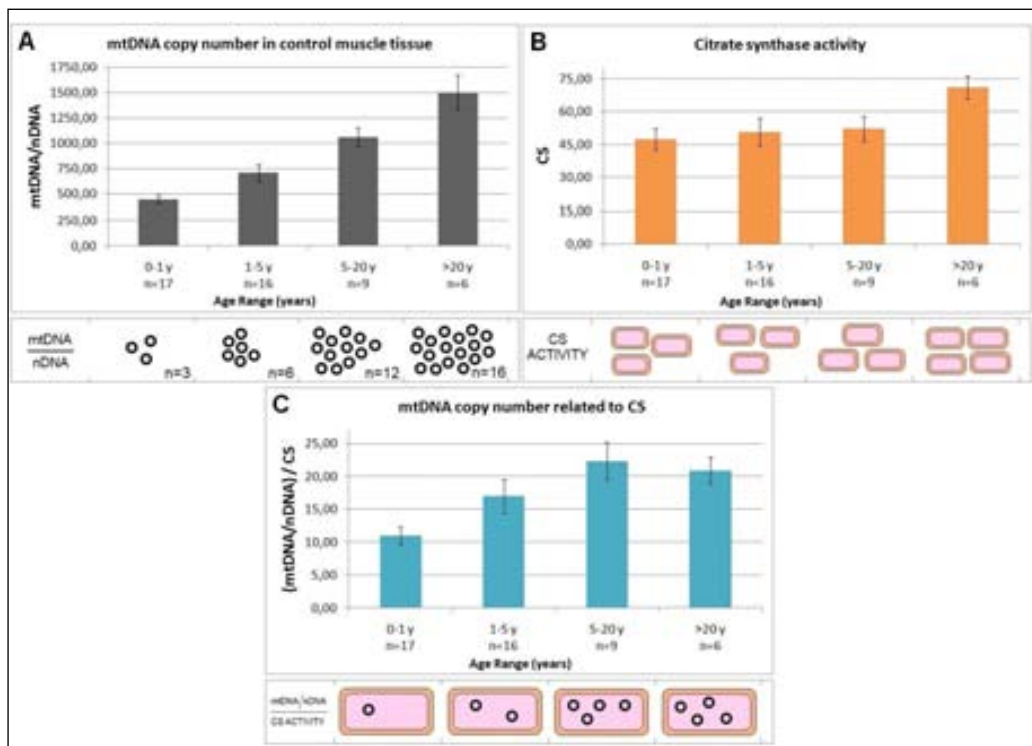


Figura 10. Còpies de mtDNA, activitat citrat sintasa i número de còpies de mtDNA relacionat amb citrat sintasa en biòpsies musculars d'individus control. **A)** número de còpies de mtDNA. Els resultats difereixen

significativament entre els diferents rangs d'edat ($p < 0.05$). **B)** Activitat citrat sintasa, les unitats estan expressades en nmol/min-mg proteïna. **C)** Número de còpies de mtDNA relacionat amb citrat sintasa, cada columna representa la mitja de la relació (mtDNA/nDNA)/CS.

La depleció de mtDNA en pacients es dona com a percentatge dels controls i els valors considerats patològics són aquells inferiors al 30% del mtDNA residual^{57, 136}, per tant es molt important estudiar el màxim nombre de controls, ja que d'aquests valors en dependrà el diagnòstic .

En el cas de biòpsies hepàtiques congelades, només es van poder estudiar 11 mostres control, sent 11 un número massa baix per estudiar variacions depenent de l'edat.

Degut a que gairebé sempre la clínica dels pacients és molt greu i condueix a l'èxitus prematur, sovint s'han de fer diagnòstics post-mortem, essent les biòpsies incloses en parafina (FFPE) una important font de material biològic arxivat i sovint únic. L'anàlisi del número de còpies de mtDNA en teixits FFPE no s'havia dut a terme fins al moment. Pel fet que ja hi havia descripcions a la literatura d'estudis moleculars en aquest tipus de mostres^{137, 138} varem tirar endavant l'estudi de depleció. En primer lloc es va haver de comparar la integritat del DNA de mostres congelades i mostres FFPE. Els amplicons utilitzats per a la quantificació del grau de depleció de mtDNA són de 100 pb i és necessari que la fragmentació no sigui menor per tal de que la determinació pugui ser vàlida. En el nostre cas es va observar que les mostres FFPE estaven molt més fragmentades que les mostres congelades (Figura 11A). Segons la literatura, la longitud mitjana d'un fragment de DNA d'una mostra FFPE és al voltant de 400 pb, depenent també del mètode de fixació i del tipus de teixit. Per tal de determinar la degradació de DNA dels músculs FFPE emprats en aquest estudi, es van amplificar dos fragments nuclears i un mitocondrial de 1200, 700 i 500 pb, respectivament (Figura 11B). Es van aconseguir amplificar els tres fragments, tot i que el de 1200 pb va presentar menys intensitat degut a la degradació de la mostra. Tot i així, alhora de determinar la depleció de mtDNA, els temps de senyal d'amplificació

per qRTPCR de mostres FFPE eren més alts que els de les mostres congelades (Figura 11C), evidenciant un efecte de la degradació del DNA sobre els resultats.

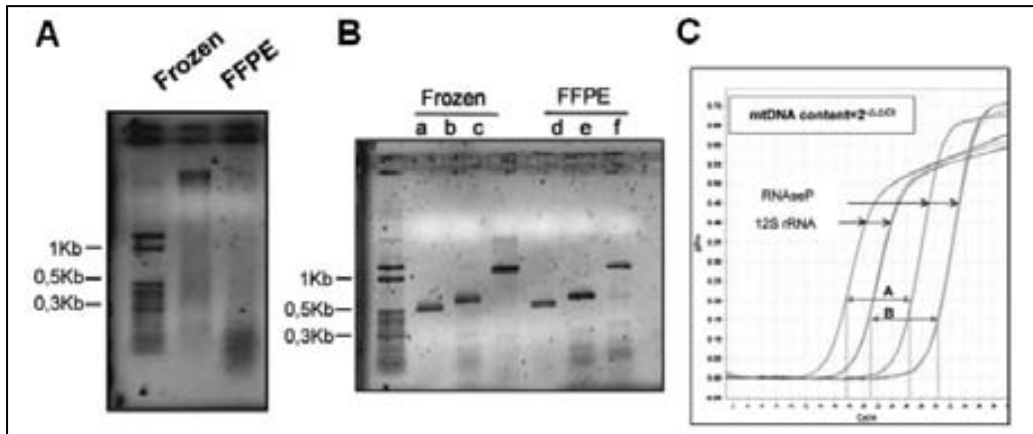


Figura 11. Integritat del DNA obtingut de múscul inclòs en parafina. **A)** DNA genòmic visualitzat en un gel d'agarosa al 1%. **B)** Productes de PCR amplificat de múscul congelat i múscul inclòs en parafina. Carrils *b*, *c*, *e* i *f* corresponen a fragments de nDNA, carrils *a* i *d* corresponen a fragments de mtDNA. **C)** Amplificació per qRT-PCR de mostres congelades (*A*) i incloses en parafina (*B*).

Es van estudiar 14 músculs FFPE i 14 porcions congelades pertanyents a la mateixa biòpsia. Avaluant el contingut de mtDNA, no es van trobar diferències estadístiques i la variabilitat era similar entre els dos grups de mostres, demostrant que el contingut de mtDNA d'una mostra congelada i una mostra FFPE són comparables (Figura 12).

Per tal de validar la tècnica és va comparar el grau de depleció de mostres incloses en parafina de 4 pacients amb depleció de mtDNA positiva. El resultat van confirmar que la depleció trobada en els músculs congelats dels pacients també es trobava en les mostres incloses en parafina (Figura 12).

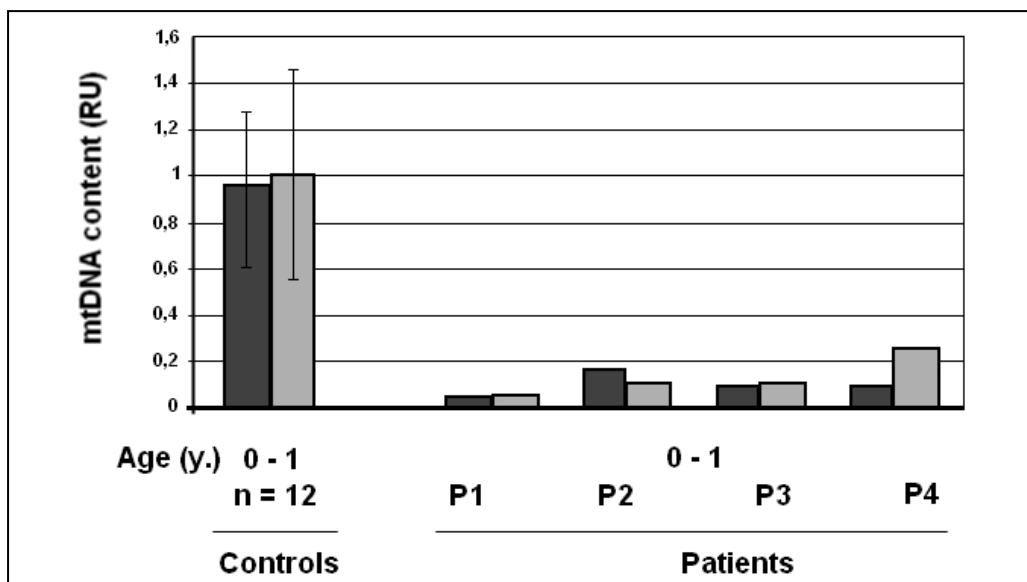


Figura 12. Contingut de mtDNA en biòpsies musculars incloses en parafina i en biòpsies musculars congelades d'individus control i de quatre pacients amb depleció de mtDNA. Els resultats es mostres en unitats relatives (RU). Les barres negres indiquen teixit congelat i les barres grises teixit inclòs en parafina. **P1-P4** corresponen a mostres de pacients amb depleció.

4.2. Diagnòstic de pacients amb la síndrome de depleció de mtDNA.

Per l'estudi del síndrome de depleció del mtDNA es van analitzar un total de 50 pacients, que es van dividir en tres grups depenent de la seva presentació clínica.

4.2.1 Pacients hepatocerebrals

Es van seleccionar un total de 30 pacients que presentaven clínica hepatocerebral. Per tal de ser inclosos en aquest grup, els pacients seleccionats havien de complir els següents criteris; presentar símptomes d'afectació hepàtica (colestasis, hepatomegàlia, enzims hepàtics alterats o insuficiència hepàtica) amb acidosi làctica i símptomes neurològics (hipotonia, retràs del desenvolupament o atrofia cerebral) (30/30). A més a més, alguns pacients van presentar disfunció renal (15/30) i hipoglucèmia (12/30). Les activitats de la CRM dels pacients inclosos en l'estudi

mostraven deficiències generalitzades, activitats normals en múscul o deficiències dels complexos codificats pel mtDNA.

Dins d'aquest grup, el número de còpies de mtDNA només es va poder estudiar en un total de 22 pacients i es va trobar depleció en 14 (en fetge, múscul o en ambdós teixits). Totes les biòpsies hepàtiques estudiades (8 en total) van presentar un grau de depleció positiu que anava de 20% al 0% de mtDNA residual i, de 20 biòpsies musculars, 10 van presentar depleció de 25% a 12% de mtDNA residual.

El fetge és l'òrgan diana de la malaltia, i la depleció pot no presentar-se en teixit muscular⁵⁴. Per tant, l'estudi mutacional dels gens implicats en formes hepatocerebrals (*DGUOK*, *MPV17* i *C10orf2*) es van analitzar en tots 22 pacients, encara que presentessin depleció negativa en múscul. Els 8 pacients, dels que no hi havia teixit disponible per a poder estudiar depleció, es van incloure dins l'estudi genètic per presentar una clínica molt suggestiva.

L'estudi mutacional va permetre identificar 3 famílies (5 pacients) portadores de mutacions en el gen *DGUOK* i un pacient amb mutacions en el gen *MPV17* (Taula 4, pàgina 132). Quatre individus de dues famílies diferents eren portadors de la mateixa mutació, c.677A>G, en el gen *DGUOK*. Aquestes famílies no eren consanguínies, tot i ser originaries de la mateixa regió geogràfica (Illes Canàries). La mutació c.677A>G canvia una histidina altament conservada per una arginina en la posició 226 de la proteïna dGK (p.His226Arg). Aquesta mutació va ser descrita prèviament en un pacient heterozigot compost i és la primera vegada que es descriuen pacients amb la mutació en homozigosi¹³⁹. La mutació c.677A>G es va trobar en heterozigosi en els pares de les dues famílies. Tots quatre pacients van presentar, ja durant el període neonatal, hipoglucèmia, acidosi làctica i disfunció hepàtica severa amb enzims hepàtics alterats. L'evolució clínica de tots els pacients es va caracteritzar per una hiporreflèxia progressiva, moviments oculars anòmals, hepatomegàlia i letargia. Tots els pacients van morir entre el primer i vuitè mes de vida degut a fallida hepàtica.

L'altre pacient amb mutacions al gen *DGUOK* era homozigot per la mutació c.763_766dupGATT, descrita amb anterioritat¹⁴⁰. Aquesta mutació trenca la pauta de lectura i forma un codó STOP prematur, resultant en una proteïna truncada. Aquest pacient va presentar, principalment, fallida hepàtica, acidèmia làctica i síndrome de Fanconi .

Les principals manifestacions clíniques del pacient portador de mutacions en el gen *MPV17* foren: hepatopatia, polineuropatia i regressió neurològica amb leucodistrofia. A més a més, el pacient va presentar altres símptomes característics de malaltia mitocondrial com hipoparatiroidisme, tubulopatia, dismotilitat intestinal i retinopatia pigmentaria, no descrits en anteriors pacients^{54, 59, 141}. EL pacient era homozigot per una mutació d'splicing no descrita anteriorment c.70+5G>A. Per tal de demostrar la patogenicitat de la mutació, es va estudiar el cDNA del pacient i va resultar en la desaparició de la banda *wild-type* que codificava per la proteïna MPV17 (Figura 13A-B). Aquest fet es va demostrar per western blot, on la senyal que corresponia a la proteïna MPV17 era molt menor a la dels individus control (Figura 13C). Es va introduir la mutació d'splicing c.70+5G>A dins d'un sistema de minigen per demostrar que la patogenicitat i els efectes sobre el mRNA i la proteïna eren deguts a la presència de la mutació. El minigen on introduïm l'exó 2 del gen *MPV17* amb la seqüència control processa correctament el transcrit i afegeix l'exó 2 als propis exons del minigen Et1 i Et2 (Figura 13D-E / Fragment a). En canvi, quan introduïm l'exó 2 del gen *MPV17* amb la mutació d'splicing c.70+5G>A, el minigen no processa correctament el transcrit i es produeix un exon skipping de l'exó 2 introduït (Figura 13D-E / Fragment b), demostrant la seva patogenicitat en el procés d'splicing.

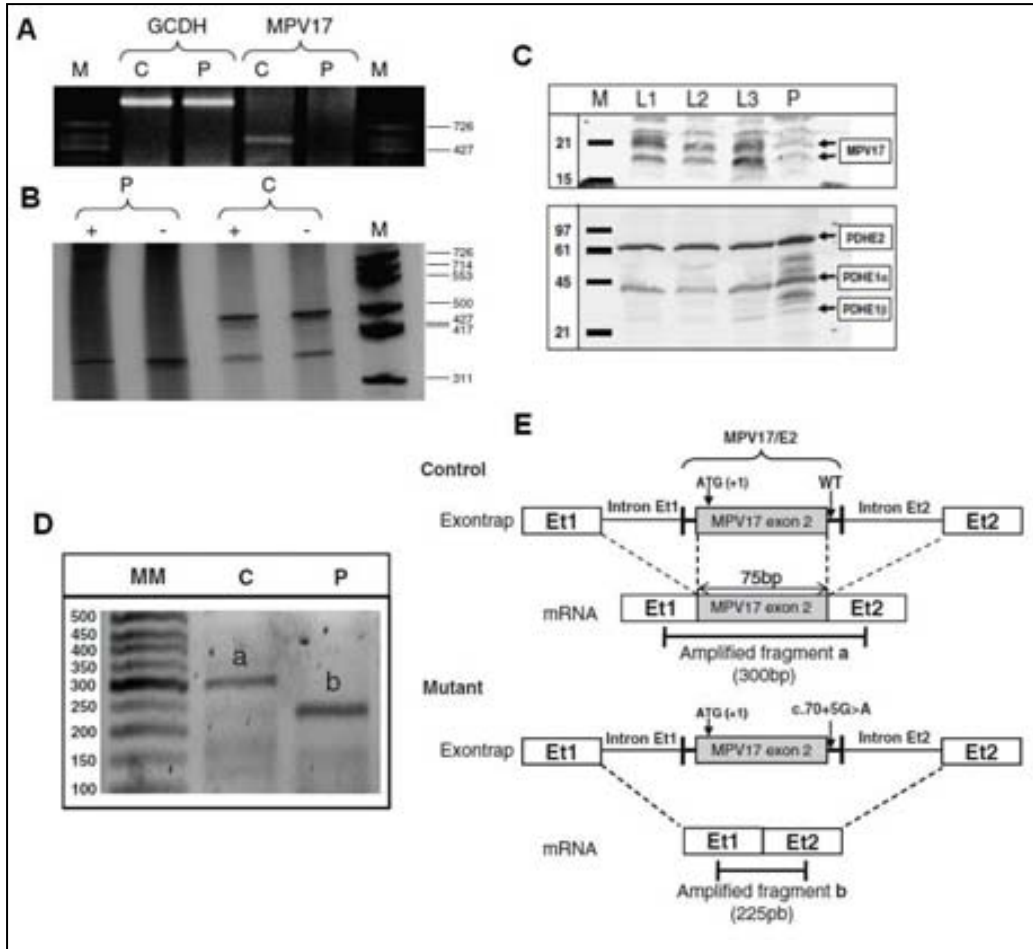


Figura 13. Estudi molecular de la patogenicitat de la mutació c.70+4G>A. **A)** Gel d'agarosa del cDNA del gen *GCDH* (glutaril-CoA deshidrogenasa) i de *MPV17*. **B)** Gel de poliacrilamida del cDNA amplificat de *MPV17* en fibroblasts tractats (+) i sense tractar (-) amb cicloheximida (CHX). **D)** Fragments amplificats per transcripció reversa dels minigens **E)** construïts amb el canvi c.70+4G>A (fragment *a*) i amb la seqüència control (fragment *b*).

M/MM – Marcador de pes molecular, **P** – pacient, **C** – control, **Et1** – exó 1 del minigen, **Et2** – exó 2 del minigen, **MPV17/E2** – fragment del gen *MPV17* que conté tot l'exó 2 i les zones flanquejants intròniques.

Els pacients portadors de mutacions en *DGUOK* i *MPV17* van presentar una severa depleció en fetge (11 - 0% mtDNA residual), mentre que en el múscul la depleció va ser menys acusada (20 – 9% mtDNA residual). Els pacients amb síndrome de depleció de mtDNA mostren deficiències múltiples de la CRM, ja que al no tenir suficients còpies de mtDNA, aquestes no es transcriuen adequadament i la expressió de les

subunitats de la CRM codificades pel mtDNA queden afectades. Els teixits dels pacients amb depleció de mtDNA mostraven deficiències múltiples de la CRM, excepte en 2 dels casos, en que el múscul presentava un 20% de mtDNA residual i la CRM era normal (Taula 4, pàgina 132). Aquesta depleció en múscul amb normalitat de la CRM en la mateixa biòpsia és difícil d'explicar, tot i que s'han descrit altres casos similars¹⁴². En un dels dos casos es va poder calcular la relació (mtDNA/nDNA)/CS, que ens donaria una idea del número de còpies de mtDNA per massa mitocondrial. Un cop avaluada la relació, la biòpsia muscular del pacient va passar de tenir un 20% de mtDNA residual (mtDNA/nDNA) a tenir un 58% de (mtDNA/nDNA)/CS residual (Taula 4, pàgina 132). La determinació del número de còpies mtDNA/nDNA no és capaç de predir la distribució de les cadenes residuals en la massa mitocondrial, en canvi, quan ho relacionem amb la CS podem deduir que el pacient tenia una massa mitocondrial amb més còpies de mtDNA respecte a quan no mesura la CS. Per tant, el que semblava una depleció severa (20% mtDNA residual) va passar a tenir valors control un cop relacionada amb la CS (58% mtDNA residual). Aquest valor de depleció pot explicar millor perquè en la biòpsia muscular hi ha una activitat normal de la CRM.

Aquesta mateixa relació es va poder calcular en el fetge del pacient *MPV17*, que mostrava una depleció important (11% mtDNA residual) que s'accentuava molt més si es té en compte la CS (2% mtDNA residual) (Taula 4, pàgina 132).

De tots els 30 pacients estudiats, 14 van presentar depleció de mtDNA en fetge, múscul o ambdós teixits, i només es van trobar mutacions causants de MDS en 6 d'ells. Per tant, quedarien 8 pacients amb depleció de mtDNA sense diagnòstic, sent candidats ideals per a ser estudiats per seqüenciació de l'exoma cel·lular.

Durant l'estudi de biòpsies de pacients hepatocerebrals es va tenir l'oportunitat de comparar resultats de depleció de mtDNA obtinguts per *southern blot* amb els resultats obtinguts per qRT-PCR. Es van comparar els valors de depleció de mtDNA en 6 biòpsies musculars i en 4 d'elles es va observar una gran divergència en els resultats. La majoria de les biòpsies van donar depleció positiva per *southern blot*,

mentre que la depleció no es va confirmar quan les mostres van ser reanalitzades per qRTPCR. Aquestes discrepàncies també han estat descrites per altres autors¹⁴³. Aquestes dades emfatitzen el fet que, abans de començar la cerca de mutacions, és important reanalitzar els nivells de depleció per qRTPCR en els casos estudiats prèviament per *southern blot*.

4.2.2. Pacients encefalomiopàtics

Es van seleccionar 15 pacients amb presentació clínica encefalomiopàtica. Per tal de ser inclosos en aquest grup, els pacients seleccionats havien de complir els següents criteris: acidúria metilmalònica moderada (32 – 433 mmol/mol creatinina, rang control 0,2 – 8,5 mmol/mol creatinina) amb homocisteïna normal (15/15) amb símptomes neurològics com hipotonia (11/15), retràs del desenvolupament (10/15), sordesa neurosensorial (4/15) i síndrome Leigh o Leigh-like (2/15). A més a més, alguns pacients presentaven acidosi làctica (11/15) i increment de succinilcarnitina (2/15). Els gens *SUCLA2* i *SUCLG1* van ser estudiats en tots els pacients d'aquest grup i només es van identificar 2 pacients amb mutacions, un en el gen *SUCLA2* i l'altre en el gen *SUCLG1*.

El pacient amb mutacions al gen *SUCLA2*, segona filla de pares no consanguinis, va debutar als 4 mesos d'edat amb retràs en les adquisicions motores i retràs del creixement. Els principals símptomes van ser hipotonia severa, discinèsia i falta de control cefàlic. L'anàlisi dels potencials evocats auditius de tronc cerebral va mostrar sordesa neurosensorial. La neuroimatge va mostrar atrofia cerebral moderada. Els estudis bioquímics van revelar una hiperlactacidèmia, nivells de metilmalònic elevats (47 mmol/mol creatinina), increment de propionilcarnitina (C3: 4,2 µmol/L, rang control 0,12 – 1,1 µmol/L) i succinilcarnitina (C4DC: 0,35 µmol/L, rang control 0,03 – 0,08 µmol/L). La biòpsia muscular no va mostrar depleció (50% mtDNA residual), fet que no correlacionava amb la deficiència múltiple de la CRM en el múscul d'aquest pacient. En canvi, quan es va analitzar la relació (mtDNA/nDNA)/CS, els nivells de

mtDNA van disminuir sensiblement fins al 27% de mtDNA residual, el que explicaria molt millor els defectes de la CRM trobats (Taula 4, pàgina 132). Tot i que la depleció de mtDNA no és una de les troballes clàssiques en aquest tipus de pacients^{144, 145}, en aquest cas ens ha permès caracteritzar millor el pacient i donar explicació a les incongruències entre nivells de depleció i activitat de la CRM. La pacient va resultar ser portadora de dues mutacions *missense* no descrites prèviament, c.1048G>A i c.1049G>T. Les dues mutacions afecten al mateix aminoàcid, una glicina altament conservada en la posició 350 de la proteïna i es canvia per una serina i per una valina, respectivament, p.[Gly350Ser];[Gly350Val]. Els pares de la pacient van ser heterozigots i els canvis no es van trobar en 200 al·lels control.

El pacient amb mutacions en el gen *SUCLG1*, primera filla de pares no consanguinis, va presentar, durant els primers mesos de vida, retràs del desenvolupament i hipotonia generalitzada. Bioquímicament es caracteritza per presentar acidosi làctica moderada amb aciduria metilmalònica (80-200 mmol/mol creatinina), nivells elevats de propionilcarnitina (22 µmol/L) i succinilcarnitina (0,48 µmol/L). Actualment la pacient té 20 anys i manté un estatus irritable, amb símptomes extrapiramidals i sordesa neurosensorial. Les imatges MRI mostraven lesions de ganglis basals compatibles amb el síndrom de Leigh.

L'estudi genètic va demostrar que la pacient presentava dues mutacions en heterozigosi en el gen *SUCLG1*: la mutació prèviament descrita c.626C>A (p.Ala209Glu)¹⁴⁶, i una mutació d'splicing no descrita fins al moment, la c.531+4A>T (Figura 14A). Es va estudiar el cDNA de la pacient per esbrinar l'efecte de la mutació c.531+4A>T sobre el mRNA i la proteïna. El cDNA de la pacient tenia 3 bandes, una corresponent al mRNA *wild-type*, de 922 pb, i dues bandes extra situades a sobre i a sota de la banda *wild-type* (Figura 14B). El posterior anàlisi de les bandes va mostrar que la banda inferior corresponia a un transcrit aberrant que li mancava 75 pb, mentre que la banda superior era un heterodúplex format per cadenes *wild-type* i cadenes aberrants (Figura 14B). Aquest resultat mostren que el canvi c.531+4A>T

afectaria a la funció normal del lloc de donació d'splicing de l'exó 4. La presència de la mutació obliga a la maquinària d'splicing a buscar un lloc alternatiu de donació d'splicing, que el troba a l'interior de l'exó 4, provocant la formació del mRNA aberrant (Figura 14C-D). Aquest mRNA codificarà per una proteïna SUCLG1 25 aminoàcids més curta del normal i presumptament no funcional.

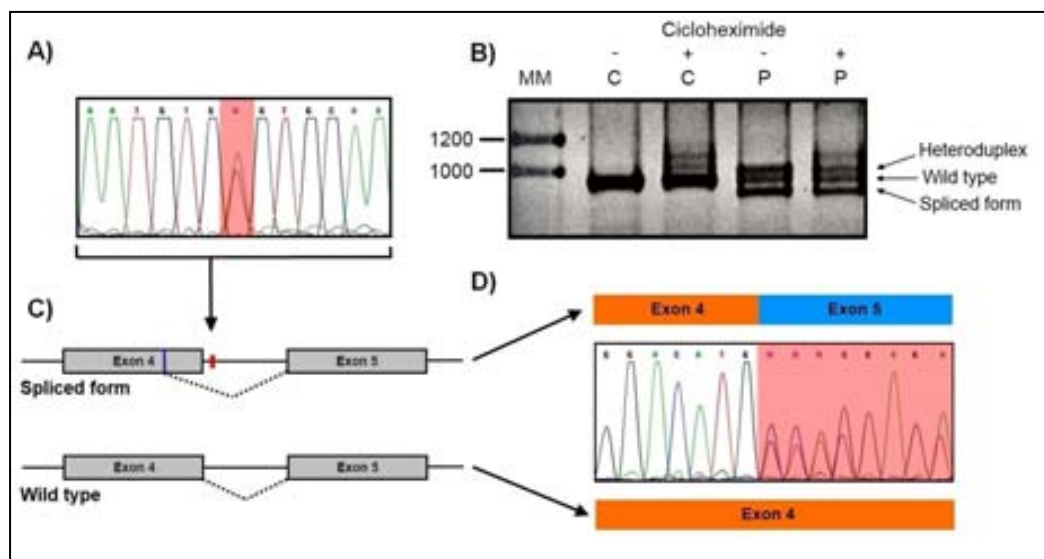


Figura 14. Estudi molecular de la mutació c.531+4A>T del gen *SUCLG1*. **A)** Electroferograma de la mutació c.531+4A>T. **B)** Patró de bandes en un gel d'agarosa de l'amplificació del cDNA de *SUCLG1*, en presència (+) i absència (-) de cicloheximida. **C)** Representació esquemàtica dels efectes de la mutació c.531+4A>T. **D)** Electroferograma del pacient mostrant l'efecte de la mutació c.531+4A>T en la seqüència del cDNA.

MM – Marcador de pes molecular, **P** – pacient, **C** – control.

En general, els pacients afectes de *SUCLG1* acostumen a presentar un fenotip molt sever¹⁴⁷, però tan el fenotip clínic com el fenotip bioquímic de la nostra pacient és molt menys sever i semblant als fenotips dels pacients *SUCLA2*. Aquesta observació també ha estat descrita per altres autors^{43, 148}.

Dels 15 pacients estudiats, només 2 van presentar mutacions en els gens *SUCLA2* o *SUCLG1*. Ambdós amb una excreció moderada d'àcid metilmalònic, juntament amb nivells elevats de C3 i C4DC. Sent la C4DC un biomarcador específic pel diagnòstic de

deficiències de SCS¹⁴⁹. En aquests casos l'estudi dels metabolits és molt més informatiu que els nivells de depleció, que no sempre és positiva en les biòpsies musculars de pacients SCS^{144, 145}. Cap dels altres pacients d'aquest estudi va mostrar una elevació dels nivells de C4DC.

El seguiment de 5 pacients va revelar un augment de metilmalònic transitòri, per tant, l'excreció inicial de metilmalònic d'aquests pacients ha estat inespecífica i s'han de buscar altres causes de patologia.

4.2.3. Pacients amb síndrome d'Alpers

La cerca de mutacions en el gen *POLG1* es va dur a terme en 5 pacients que presentaven síndrome d'Alpers. Dos d'ells presentaven la forma clàssica, caracteritzada per regressió psicomotora, convulsions i fallida hepàtica. Els 3 restants presentaven la forma Alpers-like, sense presentar cap símptoma hepàtic. Dos dels pacients van presentar depleció en múscul (10 i 11% mtDNA residual), mentre que els 3 restants tenien un número normal de còpies de mtDNA.

Es van trobar mutacions en el gen *POLG1* en els casos que presentaven depleció positiva (Taula 4, pàgina 132). Un dels pacients presentava la forma clàssica del síndrome d'Alpers: retràs psicomotor, encefalopatia epilèptica, atrofia cerebral progressiva i enzims hepàtics alterats. El pacient era portador de dues mutacions prèviament descrites, la c.911T>G i la c.2663G>A. La mutació c.911T>G canvia una leucina per una arginina en la posició 304 de la proteïna (p.Leu304Arg) i va ser descrita per primera vegada en pacients que presentaven PEO¹⁵⁰, més endavant es va descriure en pacients amb síndrome d'Alpers¹⁵¹. La mutació c.2663G>A, que canvia una glicina per un àcid aspàrtic en posició 888 de la proteïna (p.Gly888Asp), ha estat descrita prèviament en un pacient heterozigot compost¹⁵². El segon pacient va presentar una clínica Alpers-like, amb convulsions intractables i un estat epilèptic sever. Va resultar ser heterozigot compost per la mutació c.911T>G i una mutació prèviament descrita, la mutació c.844T>G (p.Tyr282Asp), localitzada en una posició

molt conservada en el domini exonucleasa¹⁵³. Els dos pacients POLG1 van presentar un grau de depleció semblant (Taula 4, pàgina 132), en aquest últim cas es va poder relacionar la depleció amb la CS, que va continuar sent important (8% mtDNA residual).

Els 3 pacients restants, 1 amb presentació clàssica i 2 amb presentació Alpers-like, no van presentar depleció i l'estudi genètic va ser negatiu. Per tant, en els nostres pacients, l'aparició de depleció correlaciona amb la presència de mutacions en el gen *POLG1*, independentment de la seva presentació clàssica o Alpers-like. Però s'ha de tenir en compte que la depleció pot aparèixer molt més tard que els primers símptomes clínics i que la seva absència no implica excloure un síndrome de depleció mitocondrial⁵⁰.

Taula 4. Percentatge de depleció de mtDNA, activitats de la cadena respiratòria mitocondrial i els estudis moleculars de 10 pacients amb mutacions en gens relacionats amb MDS.

	Teixit hepàtic		Teixit muscular		Gen	Genotip	Efecte sobre al proteïna
	% mtDNA residual	Activitats CR	% mtDNA residual	Activitats CR			
Pacients amb la forma hepatocerebral de MDS							
P1	0%	-	12%	II+III	DGUOK	c.[677A>G];[677A>G]	p.[His226Arg];[His226Arg]
P2	-	-	9%	I+II+III / II / III / IV	DGUOK	c.[677A>G];[677A>G]	p.[His226Arg];[His226Arg]
P3	4%	I+III / II+III / IV	-	I+III	DGUOK	c.[677A>G];[677A>G]	p.[His226Arg];[His226Arg]
P4	-	-	20% (58%)*	Normal	DGUOK	c.[677A>G];[677A>G]	p.[His226Arg];[His226Arg]
P5	7%	III / IV	-	-	DGUOK	c.[763_766dupGATT]; [763_766dupGATT]	p.[Phe256X];[Phe256X]
P6	11% (2%)*	I+III / II+III / II / IV	20%	Normal	MPVI7	c.[70+5G>A];[70+5G>A]	Mutació d' <i>splicing</i>
Pacients amb la forma encefalopàtica de MDS							
P7	-	-	50% (27%)*	I+III / II+III / II / III / IV	SUCLA2	c.[1048G>A];[1049G>T]	p.[Gly350Ser];[Gly350Val]
P8	-	-	-	-	SUCLG1	c.[626C>A];[531+4A>T]	p.[Ala209Glu]; [Val153_Asn177del]
Pacients amb el síndrome d'Alpers-Huttenlocher							
P9	-	-	10%	I+III / II+III / III / IV	POLG	c.[911T>G];[2663G>A]	p.[Leu304Arg];[Gly888Asp]
P10	-	-	11% (8%)*	II+III / III / IV	POLG	c.[844T>G];[911T>G]	p.[Tyr282Asp];[Leu304Arg]

* Els resultats entre parèntesi representen la relació (mtDNA/nDNA)/CS
Els pacients P1 i P2 són germans, així com els pacients P3 i P4.

4.3. Identificació d'un gen, involucrat en la maduració d'un subgrup de proteïnes Fe-S, l'alteració del qual causa una malaltia mitocondrial fatal.

La homogeneïtat clínica, i sobre tot bioquímica, d'un grup de 10 pacients provinents de 9 famílies espanyoles ens va impulsar a realitzar el mapatge per homozigositat per tal d'esbrinar el defecte genètic d'aquesta entitat desconeguda.

El perfil bioquímic comú es caracteritzava per una acidosis metabòlica amb hiperglicinèmia i hiperlactacidèmia variable. El perfil d'àcids orgànics dels pacients es caracteritzava per una excreció dels àcids 2-cetoglutaric, 2-cetoadípic, 2-hidroxiadípic i àcid glutàric, entre d'altres. En els casos en que es disposava de teixit, l'activitat del sistema de clivatge de la glicina en fetge era baixa o indetectable, l'activitat piruvat deshidrogenasa (PDH) en fibroblast també era baixa, mentre que les activitats parcials piruvat decarboxilasa i dihidrolipoamida deshidrogenasa eren normals. A més a més, les oxidacions de substrats (piruvat, leucina i glutamat) en fibroblasts també estaven disminuïdes.

La clínica dels pacients era molt similar. Tots ells presentaven un desenvolupament adequat durant el període neonatal. Els primer símptomes s'iniciaven entre el 1er i 9è mes de vida, tots els pacients van morir abans de 15 mesos. Les característiques clíniques més rellevants eren; retard del desenvolupament, hipertensió pulmonar i regressió neurològica. El desenvolupament de la malaltia i una història clínica més detallada ens va permetre classificar els pacients en 3 grups. El primer grup (P1-P3) va presentar retard del desenvolupament i manifestacions neurològiques (hipotonia i irritabilitat) sense hipertensió pulmonar. La neuroimatge del pacient P1 va mostrar lesions bilaterals de la substància blanca. En l'autòpsia dels 3 pacients es va demostrar la presència de degeneració espongiforme, astrogliosis i necrosis de la substància blanca amb les fibres U preservades. El segon grup (P4 i P5) van ser diagnosticats d'hipertensió pulmonar, presentant regressió neurològica després d'un episodi febril. El tercer grup (P6-P10) va tenir com a principal característica la hipertensió pulmonar,

acompanyada de retard del desenvolupament en 3 casos. Tot i no presentar símptomes neurològics específics, a tots els pacients als que se'ls hi va practicar l'autòpsia es va observar desmielinització de la substància blanca, vacuolització i astrogliosis en el sistema nerviós central.

Els antecedent d'aquestes famílies suggeria una herència autosòmica recessiva. A més a més, quatre de les famílies eren Basques, una població clarament diferenciada d'altres poblacions europees a nivell històric, lingüístic i genètic¹⁵⁴. Per tant, vam realitzar el mapatge per homozigositat en dos dels pacients d'origen Basc. Els resultats de l'anàlisi van mostrar una regió d'homozigositat de 1,24 Mb on s'hi van trobar 22 *open reading frames* (ORFs). En base al fenotip bioquímic dels pacients es van seleccionar dos gens per a la cerca de mutacions, el gen *FAM136A* i el gen *NFU1*. L'anàlisi del gen *FAM136A* no va presentar cap canvi potencialment patològic, mentre que en el gen *NFU1* es va trobar un canvi en homozigosi en l'exò 7 (c.622G>T), que canvia un glicina altament conservada per una cisteïna en posició 208 de la proteïna (p.Gly208Cys). La glicina 208 està molt a prop del motiu d'unió a clusters de Fe-S, conservat en totes les espècies. Nou pacients van ser homozigots per a la mutació c.622G>T, tots els pares disponibles per a l'anàlisi genètic van ser heterozigots i el canvi no es va trobar en 220 al·lels espanyols (100 d'ells d'origen Basc). El pacient P10 era portador de la mutació c.622G>T i d'un canvi en el lloc donador d'*splicing* de l'exó 6 (c.545+5G>A). L'anàlisi dels pares va demostrar que les mutacions estaven en al·lels diferents i la RT-PCR va mostrar nivells normals d'expressió de mRNA. A través de l'anàlisi per RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) es va veure l'expressió de l'al·lel portador de la mutació c.622G>T, però no de l'al·lel portador de la mutació c.545+5G>A. Tot i no tenir expressió de l'al·lel portador de c.545+5G>A, els nivells de proteïna *NFU1* no es van poder diferenciar dels individus control. Per tal de determinar la patogenicitat de c.545+5G>A es va clonar l'exò 6, amb la mutació i sense la mutació, dins d'un sistema d'un vector Exontrap system. Els resultats van mostrar que la presència de la mutació c.545+5G>A alterava el mecanisme d'*splicing*,

resultant en un *skipping* de l'exò 6. Aquests resultats concorden amb l'absència del transcrit de l'al·lel amb la mutació c.545+5G>A, ja que faltant l'exò 6, el mRNA resultant té la pauta de lectura alterada, sent sensible a ser degradat.

Els equivalents eucariòtics i procariòtics de la proteïna NFU1 interaccionen i s'uneixen a clusters de Fe-S in vitro, i s'ha suggerit que la funció d'aquesta proteïna és la d'actuar com a plataforma on es formen i s'acoblen els clusters Fe-S¹⁵⁵⁻¹⁶². Tot i això, la funció específica de la proteïna NFU1 encara era desconeguda. Les proteïnes Fe-S han estat ampliament estudiades en llevat, però la deleció del gen *NFU1* no es va trobar associat a un fenotip bioquímic específic¹⁶³. La doble deleció *NFU1* i *ISU1*, que codifica per una de les dues proteïnes d'acoblament general de clusters Fe-S es va trobar associada a defectes més profunds de proteïnes Fe-S com l'aconitasa i complexes de la CRM, però el rol específic de *NFU1* i la seva relació amb *ISU1* no es coneixia. El que si es coneixia és la funció que tenen els clusters de Fe-S com a donadors de sofre en la síntesi de l'àcid lipoic, catalitzat per l'enzim lipoic acid sintasa (LAS)¹⁶⁴. Aquest àcid lipoic s'uneix covalentment a residus de lisina específics de quatre enzims mitocondrials; les subunitat E2 de la PDH, KGDH i BCKDH, i la proteïna H del GCS per tal d'actuar com a cofactor de les esmentades proteïnes. El model actual de la síntesi d'àcid lipoic es basa en un model on l'àcid octanoic conjugat amb la *acyl-carrier protein* (ACP) és el substrat per la inserció del sofre mitjançant LAS, probablement des d'un dels dos clusters [4Fe-4S]. La ACP lipoilada actuaria com a intermediari per les *lipoyl protein ligases*, que transferirien el lipoic a les proteïnes diana¹⁶⁵.

El fenotip bioquímic dels pacients era consistent amb un hipotètic bloqueig de la via de síntesi de l'àcid lipoic. Per tant, es va analitzar l'àcid lipoic unit a proteïnes en l'homogenat de múscul de 3 pacients mitjançant un anticòs anti-àcid lipoic unit a proteïnes. Els resultats en controls van mostrar dues bandes, una de 65 kDa i una altre de 50 kDa, corresponent a les subunitats E2 de les proteïnes lipoilades PDH i KGDH, respectivament¹⁶⁶ (Figura 15A), mentre que els nivells de proteïna PDH

lipoilada van disminuir en un 60% en els pacients NFU1 respecte als controls (Figura 15A-B). En canvi, els nivells de proteïna PDH no es trobaven alterats, suggerint que els nivells baixos de subunitat E2 unida a lipoic eren deguts a un defecte de lipoilació.

Per tal de poder estudiar la proteïna NFU1 es va obtenir sèrum anti-NFU1 en conills immunitzats amb proteïna recombinant NFU1-His₆ obtinguda al nostre laboratori. Com és habitual en les mutacions *missense*, cap dels pacients analitzats va mostrar nivells de NFU1 alterats (Figura 15C).

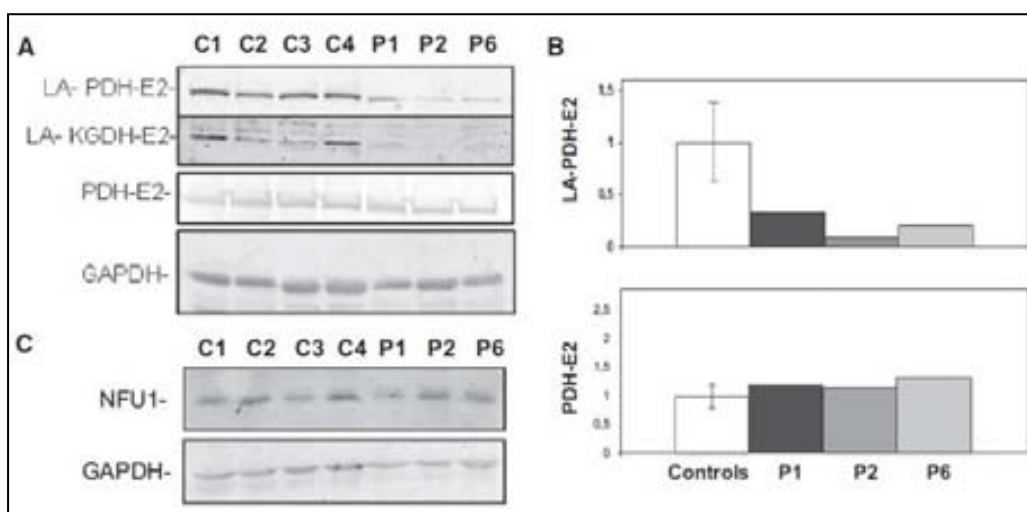


Figura 15. Anàlisi dels nivells de lipoilació i dels nivells de NFU1 en pacients i controls. **A)** Anàlisi per western blot de l'àcid lipoic unit a les proteïnes PDH i KGDH d'individus control i en pacients homozigots per la mutació c.622G>T en extractes de biòpsies musculars. **B)** Quantificació per densitometria de la lipoilació de la proteïna PDH. Els valors han estat normalitzats per GAPDH. **C)** Anàlisi per western blot de NFU1, els extractes de múscul són els mateixos que en (A).

C1-C4, individus control, **P1,P2 i P6**, pacients. La **GAPDH** s'ha utilitzat com a control de càrrega.

Aquestes dades, juntament amb totes les observacions bioquímiques obtingudes suggerien que NFU1 era necessària pel bon funcionament de LAS. A més a més, tan NFU1 com LAS¹⁶⁷ són predominantment, sinó exclusivament, mitocondrials.

Per tal d'esbrinar el rol de NFU1 en la maduració dels clusters Fe-S, es van silenciar un cultiu cel·lular humà amb RNAs d'interferència (siRNA)^{168, 169}. El silenciament de les cèl·lules HeLa amb siRNA es va comprovar mitjançant els nivells de mRNA i de

proteïna (Figura 16A). L'immunoblot dels extractes cel·lulars silenciats van mostrar uns nivells disminuïts de lipoic unit a les subunitats E2 de la proteïna PDH i KGDH, així com la proteïna H del GCS (Figura 16B).

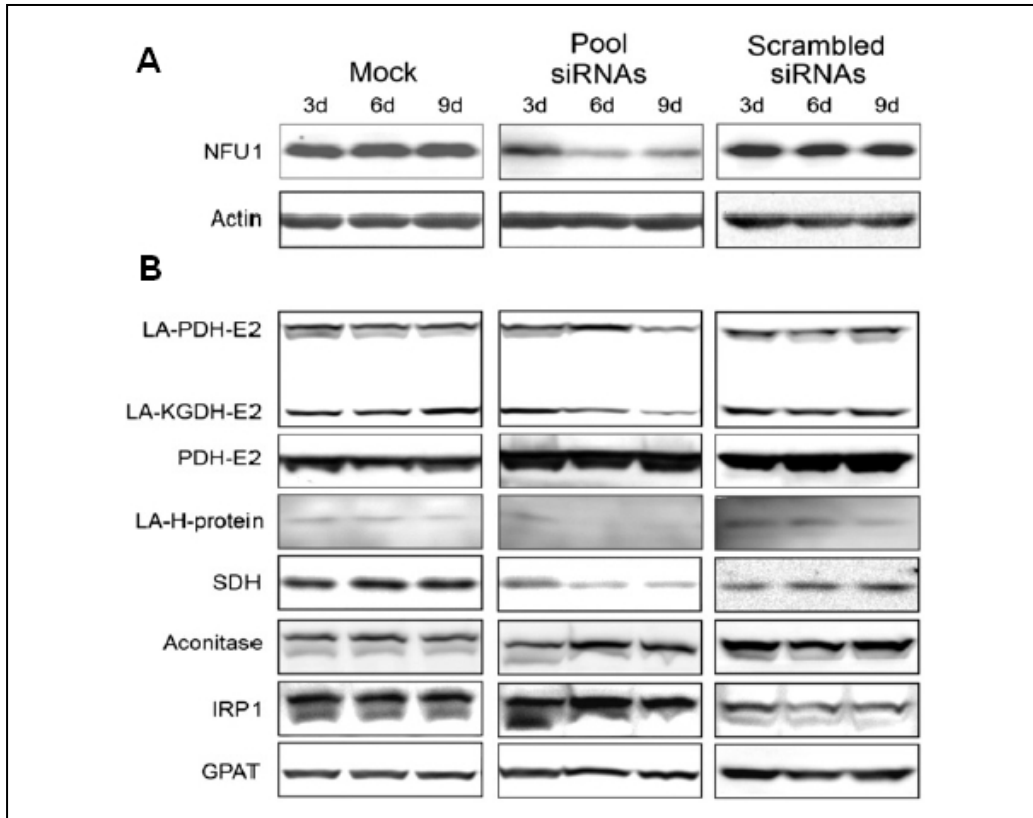


Figura 16. Anàlisi per western blot de l'àcid lipoic unit a proteïnes i de proteïnes Fe-S havent silenciats NFU1. **A)** Eficàcia del silenciament de NFU1 a nivell proteic després de 3 rondes de silenciament. **B)** Efecte del silenciament de NFU1 sobre varies proteïnes cel·lulars i sobre els nivells d'àcid lipoic unit a les proteïnes PDH, KGDH i la proteïna H.

L'**actina** s'utilitza com a control de càrrega. **3d** – cèl·lules recollides 3 dies després del primer silenciament, **6d** – cèl·lules recollides 3 dies després del segon silenciament, **9d** – cèl·lules recollides 3 dies després del tercer silenciament, **SDH** – Succinat deshidrogenasa, **IRP1** – proteïna reguladora de ferro 1, **GPAT** – glutamat fosforibosilpirofosfatasa amido-transferasa..

Consistent amb aquests resultats, no es va detectar activitat PDH després d'un silenciament de 9 dies (Figura 17). En canvi, les activitats de proteïnes Fe-S, incloent la aconitasa mitocondrial i citosòlica i la GPAT citosòlica, no es van veure alterades pel silenciament de NFU1. Aquests resultats demostren un procés de maduració normal

dels clusters Fe-S, que d'altra banda es veurien afectats en cas que hi hagués algun defecte en la formació dels clusters Fe-S¹⁷⁰. De la mateixa manera, l'activitat COX no es va veure alterada per la depleció de NFU1. Tot i que el complexe IV no necessita clusters Fe-S per al seu funcionament, la síntesi del seu grup hemo A requereix la proteïna Fe-S ferredoxina Fdx2¹⁷¹. En canvi, tant la quantitat com l'activitat de la succinat deshidrogenasa (SDH: complexe II) està molt disminuïda (Figura 16B i figura 17).

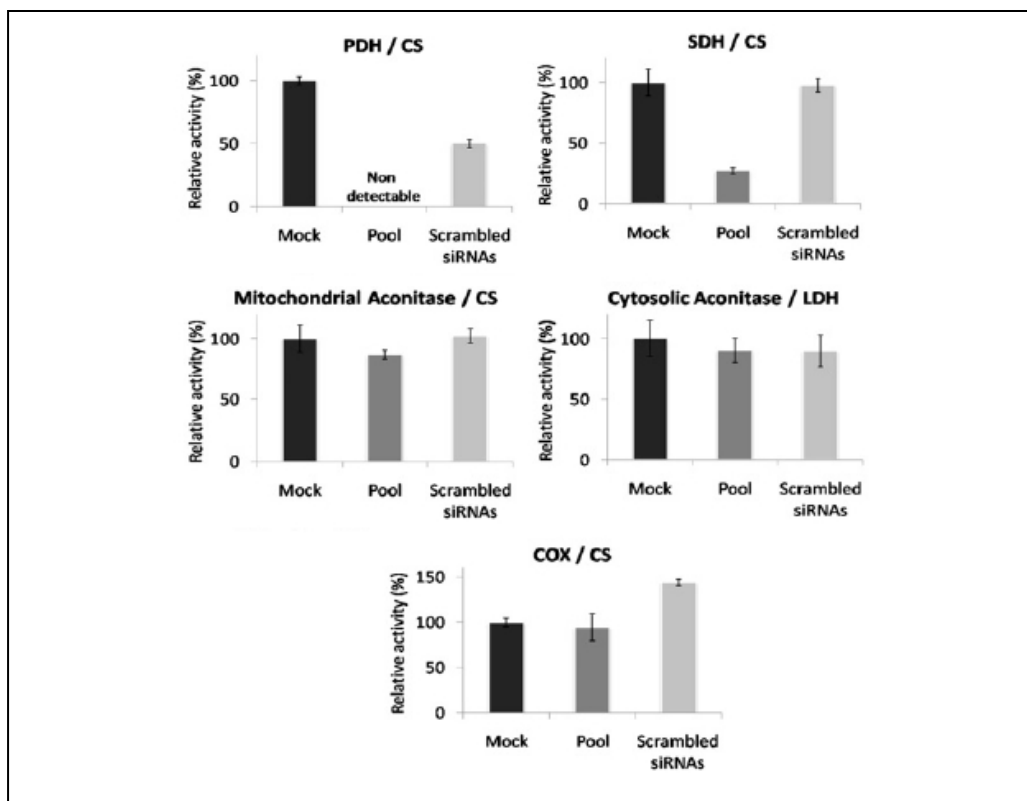


Figura 17. Activitats enzimàtiques d'extractes cel·lulars després del silenciament de NFU1. Els valors han estat normalitzats per CS o lactat deshidrogenasa (LDH) i es presenten en relació als resultats obtinguts en cèl·lules sense silenciar (Mock cells). Les barres d'error indiquen l'error relatiu, rE (n=3).

Confirmant aquests resultats, les activitats de la CRM de tres pacients NFU1, en que es disposava de biòpsia muscular, van mostrar normalitat de les activitats I+III i COX, però les activitats dels complexos II+III eren baixes, consistents amb la disminució

d'activitat de la SDH. Per tant, aquests resultats suggereixen que NFU1 és necessària per a la maduració tant de LAS com de SDH. L'efecte sobre la LAS explicaria el defecte en la biosíntesi de l'àcid lipoic.

La unió *in vitro* de clusters de Fe-S a NFU1 en varies espècies suggereix que NFU1 podria actuar com una plataforma d'acoblament de clusters Fe-S¹⁷²⁻¹⁷⁴. Tot i això, no queda clar si NFU1 fa de plataforma d'acoblament *in vivo* i quina relació té amb la proteïna ISCU¹⁷⁵, una de les proteïnes que juga un paper principal en la formació dels clusters Fe-S. Per a tal efecte, es va silenciar el gen ISCU de la mateixa manera que es va fer amb NFU1 i es van analitzar els efectes sobre la funció i els nivells de diverses proteïnes Fe-S (Figura 18A). Al contrari del que passava amb el silenciament de NFU1, la deficiència de ISCU va afectar de manera molt severa el creixement cel·lular i no va quedar material després de la segona tanda de transfecció. El western blot dels extractes cel·lulars van mostrar una disminució de quasi totes les proteïnes Fe-S, incloent l'aconitasa mitocondrial i citosòlica, la SDH i la GPAT citosòlica (Figura 18B). A més a més, els nivells d'àcid lipoic unit a les proteïnes PDH, KGDH i la proteïna H del GCS va disminuir substancialment, suggerint un defecte en la maduració de LAS degut a l'absència de ISCU. Concordant amb aquests resultats, les activitats PDH, aconitasa mitocondrial, aconitasa citosòlica i SDH també van ser molt baixes (Figura 18C). L'activitat COX només va resultar lleugerament afectada. Aquests resultats mostren una deficiència clara de quasi totes les proteïnes Fe-S estudiades, demostrant que ISCU té un rol molt important com a plataforma d'acoblament dels clusters Fe-S¹⁷⁶, en canvi, NFU1 jugaria un paper més específic, transferint clusters Fe-S a les seves apoproteïnes diana, la SDH i la LAS (Figura 20).

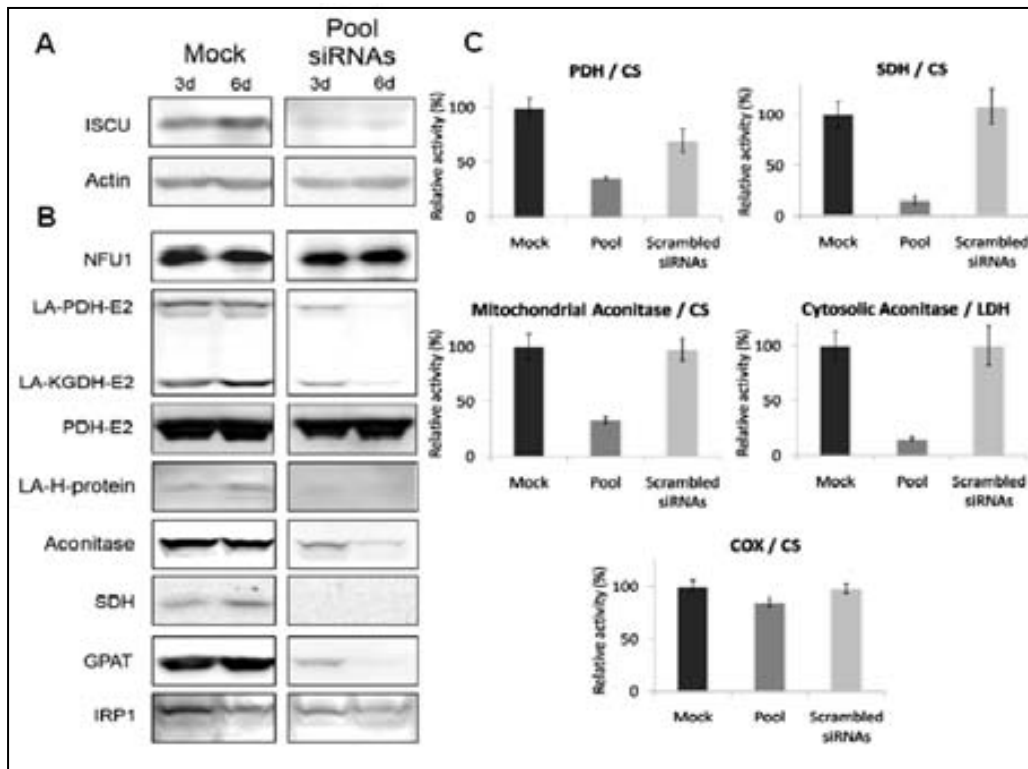


Figura 18. Anàlisi per western blot de l'àcid lipòic unit a proteïnes, nivells de proteïnes Fe-S i activitats enzimàtiques d'extractes cel·lulars havent silenciats ISCU. **A)** Eficàcia del silenciament de ISCU a nivell proteic després de 3 rondes de silenciament. **B)** Efecte del silenciament de ISCU sobre varies proteïnes cel·lulars i sobre els nivells d'àcid lipòic unit a les proteïnes PDH, KGDH i la proteïna H. **C)** Activitats enzimàtiques d'extractes cel·lulars després del silenciament de ISCU. Els valors han estat normalitzats per CS o lactat deshidrogenasa (LDH) i es presenten en relació als resultats obtinguts en cèl·lules sense silenciar (Mock cells). Les barres d'error indiquen l'error relatiu, rE (n=3).

Per entendre millor els efectes funcionals de la mutació p.Gly208Cys en els pacients, es va estudiar el canvi corresponent (p.Gly194Cys) en l'organisme *Saccharomyces cerevisiae*. En estudis anteriors no es van trobar defectes específics atribuïts a la deleció de NFU1 en el llevat, però amb la informació obtinguda d'aquest treball, es van analitzar varis enzims per tal de caracteritzar la soca delecionada. Tot i que es van observar lleus disminucions en les activitats aconitasa i COX, també es va observar una disminució molt més important de les activitats SDH i PDH (Figura 19A). Per a estudiar l'efecte de la mutació *missense*, es va introduir la mutació corresponent (p.Gly194Cys) en llevat. El llevat amb el plasmid codificant per a NFU1 wild type

recuperava l'activitat dels enzims SDH i PDH (Figura 19B). Pel contrari, la soca amb la mutació només és capaç de recuperar mínimament l'activitat, demostrant la seva patogenicitat.

Per saber la mecànica de la mutació p.Gly194Cys es va purificar la proteïna NFU1 i es van fer experiments d'unió als clusters mitjançant ^{55}Fe marcat. Els experiments van mostrar que NFU1 és capaç d'unir clusters Fe-S de manera molt làbil, ja que la senyal del ^{55}Fe va ser molt baixa, inclús en situació de superproducció (Figura 19C). En altres estudis es va demostrar que mutacions en les ferredoxines o en ICSU procariota, podien estabilitzar la associació amb els clusters Fe-S^{177, 178}. Per tant, es va analitzar el grau d'unió de la proteïna NFU1 portadora de p.Gly194Cys amb els clusters Fe-S. Els resultats van mostrar que la mutació uneix grans quantitats de ^{55}Fe in vivo (Figura 19C). Els experiments també mostren com aquesta unió amb el ^{55}Fe depèn de molts membres de la maquinària d'acoblament ISC (Nfs1, Isu1, Ssq1 i Grx5)^{179, 180}, però no de Isa1-2, que actuarà molt més tard. Aquests resultats suggereixen que el Fe unit a NFU1^{Gly194Cys}, que forma part del cluster Fe-S, depèn de Isu1 i dels factors que alliberen el cluster de Isu1 (Ssq1 i Grx5)¹⁸¹.

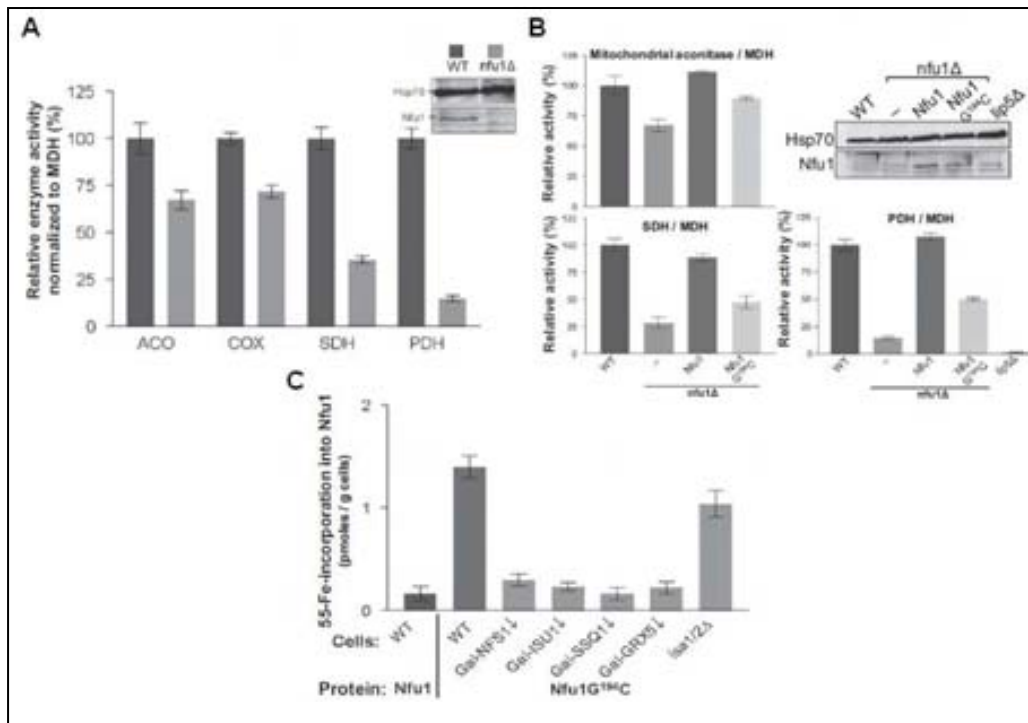


Figura 19. Demostració de la patogenicitat de la mutació Gly208Cys en llevat i evidència de NFU1 com a proteïna transferidora de clusters en un estadi tardà. **A)** Activitats enzimàtiques de l'aconitasa mitocondrial, SDH, COX i PDH en llevat wild type i *nfu1Δ*. Les activitats han estat normalitzat per malat deshidrogenasa (MDH). **B)** Activitats enzimàtiques i western blot de cèl·lules de llevat transfectades amb un vector buit (-), amb el gen NFU1 wild type, o amb la variant mutada Nfu1G^{194C}, l'equivalent humana de Gly194Cys. **C)** Incorporació de Fe en NFU1 wild type (Nfu1 – WT), en Nfu1G^{194C} i en les soques Gal-NFS1, Gal-ISU1, Gal-SSQ1, Gal-GRX5 i Isa1/2Δ.

Amb totes aquestes dades es pot afirmar que NFU1 rebria els clusters de Isu1 i que actuaria de manera específica alhora de transferir els clusters Fe-S (Figura 20). Per tant, no semblaria plausible que NFU1 actués com a plataforma d'acoblament de clusters de forma alternativa a ISCU. NFU1 podria cooperar amb les proteïnes Isa i Iba57, la funció de les quals és la d'actuar en la maduració de proteïnes Fe-S específiques que contenen [4Fe-4S]¹⁸²⁻¹⁸⁴. Aquesta cooperació podria explicar perquè el creixement del llevat no es veu afectat en soques amb *NFU1* deletat, també podria explicar, en el cas dels humans, que el fenotip no es desenvolupi al cap d'uns

mesos, ja que ISCA1 i IBA57 podrien dur a terme una funció parcial alhora de transferir els clusters a LAS i SDH (Figura 20).

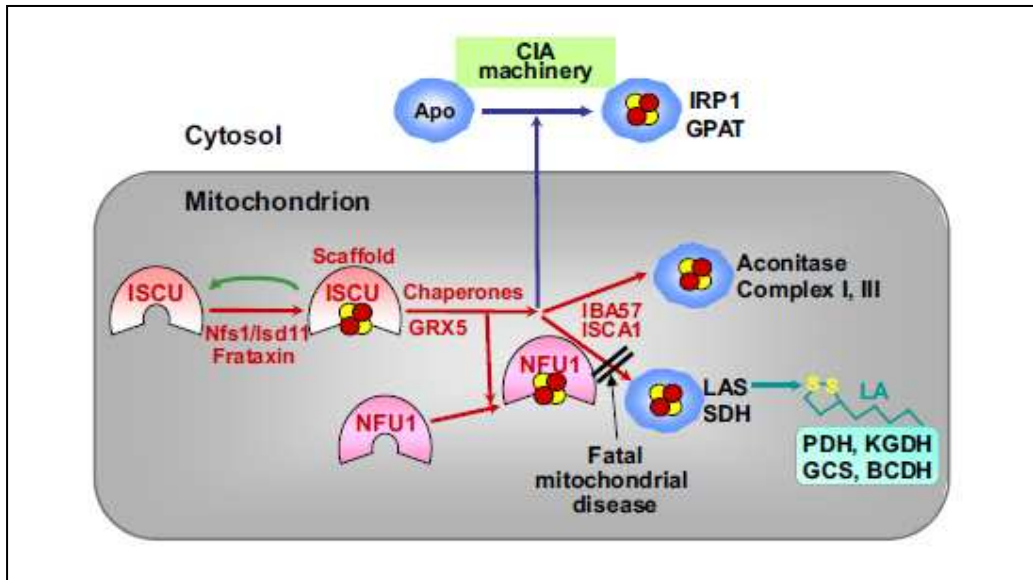


Figura 20. Proposta de model funcional per la funció de NFU1 en la biogènesi de les proteïnes Fe-S mitocondrials.

L'explicació bioquímica del fenotip associat a la malaltia NFU1, juntament amb la identificació de la funció específica de NFU1 en la biosíntesi de proteïnes Fe-S mitocondrials, és de gran importància tant pel diagnòstic com pel tractament potencial dels pacients afectats amb deficiències en la biogènesi de clústers Fe-S o en la síntesi d'àcid lipoic.

5. Conclusions

I. L'estudi del número de còpies de mtDNA en biòpsies musculars i hepàtiques provinents d'individus control ens ha permès obtenir valors de referència.

II. La posta a punt i la validació de l'anàlisi del número de còpies de mtDNA en mostres incloses en parafina serà d'utilitat pel diagnòstic de pacients en que no és possible analitzar mostres congelades.

III. L'estudi molecular dels gens *DGUOK*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1* i *POLG* en 50 individus ens ha permès identificar 4 mutacions no descrites prèviament, c.70+5G>A en el gen *MPV17*, c.1048G>A i c.1049G>T en el gen *SUCLA2*, i c.531+4A>T en el gen *SUCLG1*. A més s'han identificat 7 mutacions prèviament descrites en un total de 10 pacients (8 famílies).

IV. Descriuim un assaig funcional d'splicing basat en la utilització de minigens que ens ha permès caracteritzar la mutació c.70+5G>A com a causant de malaltia *MPV17*.

V. La mesura combinada de la relació mtDNA/nDNA i de l'activitat citrat sintasa, en el mateix homogenat, ha proporcionat una eina addicional per l'estudi de les deplecions de mtDNA i ha permès explicar certes discrepàncies observades en la literatura entre el grau de depleció de mtDNA i les activitats enzimàtiques de la cadena respiratòria mitocondrial.

VI. S'ha identificat per primera vegada un gen, *NFU1*, les mutacions del qual s'associen una nova malaltia mitocondrial, caracteritzada bioquímicament per defectes en els enzims dependents d'àcid lipoic.

VII. Els estudis funcionals ens han permès conèixer la funció específica de la proteïna NFU1 en la biosíntesi dels clústers de Fe-S i en la maduració de proteïnes Fe-S, concretament LAS i SDH.

VIII. La descripció clínica, bioquímica y genètica d'aquesta malaltia és molt important per al diagnòstic de nous pacients i obre les portes a la cerca d'altres gens implicats en la biosíntesi de l'àcid lipoic, així com el disseny futur de noves estratègies terapèutiques.

IX. La identificació de gens causants de noves malalties ens permet conèixer i entendre la funció de dites proteïnes dins de la via metabòlica implicada.

6. Referències

1. Mitchell,P. The Ninth Sir Hans Krebs Lecture. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur. J Biochem.* **95**, 1-20 (1979).
2. Poyton,R.O. & McEwen,J.E. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 563-607 (1996).
3. Enriquez,J.A., Fernandez-Silva,P., & Montoya,J. Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription. *Biol. Chem.* **380**, 737-747 (1999).
4. Giles,R.E., Blanc,H., Cann,H.M., & Wallace,D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 6715-6719 (1980).
5. Wallace,D.C. *et al.* Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr. Genet.* **12**, 81-90 (1987).
6. Wallace,D.C. Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somat. Cell Mol. Genet* **12**, 41-49 (1986).
7. Holt,I.J., Harding,A.E., & Morgan-Hughes,J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331[6158], 717-719. 1988.
8. Poulton,J., Deadman,M.E., & Gardiner,R.M. Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet* **1**, 236-240 (1989).
9. Martin Negrier,M.L. *et al.* Partial triplication of mtDNA in maternally transmitted diabetes mellitus and deafness. *Am J Hum Genet* 63[4], 1227-1232. 1998.
10. Chen,X. *et al.* Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 57[2], 239-247. 1995.

11. Hayashi,J. *et al.* Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 10614-10618 (1991).
12. Poulton,J. & Holt,I.J. Mitochondrial DNA: does more lead to less? *Nat Genet* **8**[4], 313-315. 1994.
Ref Type: Abstract
13. Dunbar,D.R. *et al.* Maternally transmitted partial direct tandem duplication of mitochondrial DNA associated with diabetes mellitus. *Hum Mol. Genet* **2**, 1619-1624 (1993).
14. Boles,R.G., Roe,T., Senadheera,D., Mahnovski,V., & Wong,L.J. Mitochondrial DNA deletion with Kearns Sayre syndrome in a child with Addison disease. *Eur. J Pediatr.* **157**, 643-647 (1998).
15. Ozawa,T. *et al.* Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 1240-1247 (1988).
16. Shanske,S. *et al.* Identical mitochondrial DNA deletion in a woman with ocular myopathy and in her son with pearson syndrome. *Am J Hum Genet* **71**, 679-683 (2002).
17. Spinazzola,A. & Zeviani,M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* **354**, 162-168 (2005).
18. Bender,A. *et al.* High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* **38**, 515-517 (2006).
19. Campbell,G.R. *et al.* Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **69**, 481-492 (2011).
20. Kraytsberg,Y. *et al.* Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* **38**, 518-520 (2006).
21. Prezant,T.R. *et al.* Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* **4**[3], 289-294. 1993.

22. Sue,C.M. *et al.* Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* 52[9], 1905-1908. 1999.
23. Taylor,R.W. *et al.* A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll. Cardiol.* **41**, 1786-1796 (2003).
24. Moraes,C.T. *et al.* Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J Med.* **320**, 1293-1299 (1989).
25. Rotig,A. *et al.* Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin. Invest* **86**, 1601-1608 (1990).
26. Shoffner,J.M. *et al.* Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **61**, 931-937 (1990).
27. Goto,Y., Nonaka,I., & Horai,S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**, 651-653 (1990).
28. Holt,I.J., Harding,A.E., Petty,R.K., & Morgan-Hughes,J.A. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* **46**, 428-433 (1990).
29. Tatuch,Y. *et al.* Heteroplasmic mtDNA mutation (T---G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* **50**, 852-858 (1992).
30. Riordan-Eva,P. & Harding,A.E. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med. Genet* **32**, 81-87 (1995).
31. Suomalainen,A. & Isohanni,P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 429-437 (2010).
32. Rampazzo,C. *et al.* Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation. *J Biol. Chem.* **279**, 17019-17026 (2004).

33. Bourdon,A. *et al.* Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **39**, 776-780 (2007).
34. Oskoui,M. *et al.* Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch. Neurol.* **63**, 1122-1126 (2006).
35. Copeland,W.C. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu. Rev. Med.* **59**, 131-146 (2008).
36. Mancuso,M. *et al.* Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology* **59**, 1197-1202 (2002).
37. Zhou,X. *et al.* Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice. *Hum Mol. Genet* **17**, 2329-2335 (2008).
38. Rahman,S. & Poulton,J. Diagnosis of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Arch. Dis. Child* **94**, 3-5 (2009).
39. Ji,J.Q. *et al.* A novel c.592-4_c.592-3delTT mutation in DGUOK gene causes exon skipping. *Mitochondrion.* **10**, 188-191 (2010).
40. Brahimi,N. *et al.* The first founder DGUOK mutation associated with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome. *Mol. Genet. Metab* **97**, 221-226 (2009).
41. Spinazzola,A. & Zeviani,M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci. Rep.* **27**, 39-51 (2007).
42. Morava,E. *et al.* Dystonia and deafness due to SUCLA2 defect; Clinical course and biochemical markers in 16 children. *Mitochondrion.* **9**, 438-442 (2009).
43. Rouzier,C. *et al.* The severity of phenotype linked to SUCLG1 mutations could be correlated with residual amount of SUCLG1 protein. *J Med. Genet* **47**, 670-676 (2010).
44. Rotig,A. & Poulton,J. Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1103-1108 (2009).
45. Hirano,M. *et al.* Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* **44**, 721-727 (1994).

46. Papadimitriou,A. *et al.* Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology* **51**, 1086-1092 (1998).
47. Nishino,I., Spinazzola,A., & Hirano,M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283[5402], 689-692. 1999.
48. Chan,S.S. & Copeland,W.C. DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 312-319 (2009).
49. DiMauro,S. & Garone,C. Historical perspective on mitochondrial medicine. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **16**, 106-113 (2010).
50. Cohen,B.H. & Naviaux,R.K. The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods* **51**, 364-373 (2010).
51. Naviaux,R.K. *et al.* Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol* **45**, 54-58 (1999).
52. Spelbrink,J.N. *et al.* Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* **28**, 223-231 (2001).
53. Sarzi,E. *et al.* Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* **62**, 579-587 (2007).
54. Wong,L.J. *et al.* Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy. *Hepatology* **46**, 1218-1227 (2007).
55. Alberio,S., Mineri,R., Tiranti,V., & Zeviani,M. Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion.* **7**, 6-12 (2007).
56. Dimmock,D., Tang,L.Y., Schmitt,E.S., & Wong,L.J. Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clin. Chem.* **56**, 1119-1127 (2010).
57. Morten,K.J. *et al.* Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion.* **7**, 386-395 (2007).

-
58. El-Hattab,A.W. *et al.* MPV17-associated hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: new patients and novel mutations. *Mol. Genet. Metab* **99**, 300-308 (2010).
59. Spinazzola,A. *et al.* MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **38**, 570-575 (2006).
60. Spinazzola,A. *et al.* Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inherit. Metab Dis.* **32**, 143-158 (2009).
61. Kaji,S. *et al.* Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol. Genet. Metab* **97**, 292-296 (2009).
62. Parini,R. *et al.* Glucose metabolism and diet-based prevention of liver dysfunction in MPV17 mutant patients. *J. Hepatol.* **50**, 215-221 (2009).
63. Lara,M.C. *et al.* Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* **67**, 1461-1463 (2006).
64. Yavuz,H. *et al.* Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch. Neurol* **64**, 435-438 (2007).
65. Hirano,M. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* **67**, 1458-1460 (2006).
66. Hiltunen,J.K. *et al.* Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1195-1202 (2010).
67. Yi,X. & Maeda,N. Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development. *Mol. Cell Biol.* **25**, 8387-8392 (2005).
68. Mayr,J.A. *et al.* Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *Am J Hum Genet* **89**, 806-812 (2011).
69. Horvath,R. Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ(10)). *J Inherit. Metab Dis.*(2012).

70. Galluccio, M. *et al.* Over-expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of isoform 2 of human FAD synthetase. *Protein Expr. Purif.* **52**, 175-181 (2007).
71. Ho, G. *et al.* Maternal riboflavin deficiency, resulting in transient neonatal-onset glutaric aciduria Type 2, is caused by a microdeletion in the riboflavin transporter gene GPR172B. *Hum Mutat.* **32**, E1976-E1984 (2011).
72. Green, P. *et al.* Brown-Vialetto-Van Laere syndrome, a ponto-bulbar palsy with deafness, is caused by mutations in c20orf54. *Am J Hum Genet* **86**, 485-489 (2010).
73. Olsen, R.K. *et al.* ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain* **130**, 2045-2054 (2007).
74. Cotelli, M.S. *et al.* Riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency with unknown genetic defect. *Neurol Sci.* (2011).
75. Ernster, L. & Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 195-204 (1995).
76. Crane, F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll. Nutr.* **20**, 591-598 (2001).
77. Ernster, L. & Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 195-204 (1995).
78. Overvad, K. *et al.* Coenzyme Q10 in health and disease. *Eur. J Clin. Nutr.* **53**, 764-770 (1999).
79. Crane, F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll. Nutr.* **20**, 591-598 (2001).
80. Crane, F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll. Nutr.* **20**, 591-598 (2001).
81. Nohl, H. & Gille, L. The role of coenzyme Q in lysosomes in *Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease* (ed. Kagan VEQ, P.L.) 99-106 (Boca Raton: CRC press, 2001).
82. Overvad, K. *et al.* Coenzyme Q10 in health and disease. *Eur. J Clin. Nutr.* **53**, 764-770 (1999).

-
83. Rustin,P., Munnich,A., & Rotig,A. Mitochondrial respiratory chain dysfunction caused by coenzyme Q deficiency. *Methods Enzymol.* **382**, 81-88 (2004).
84. Shoffner,J.M. Oxidative phosphorylation diseases in *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (eds. Scriver,C.R., Beaudet,A.L., Sly,W.S. & Valle,D.) 2367-2392 (McGraw-Hill, New York, 2001).
85. Beinert,H., Holm,R.H., & Munck,E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659 (1997).
86. Fontecave,M., Choudens,S.O., Py,B., & Barras,F. Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J Biol. Inorg. Chem.* **10**, 713-721 (2005).
87. Johnson,D.C., Dean,D.R., Smith,A.D., & Johnson,M.K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 247-281 (2005).
88. Kispal,G. *et al.* Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* **24**, 589-598 (2005).
89. Lill,R. & Muhlenhoff,U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 133-141 (2005).
90. Balk,J. & Lobreaux,S. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* **10**, 324-331 (2005).
91. Lill,R. & Muhlenhoff,U. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 457-486 (2006).
92. Lill,R. *et al.* Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 652-667 (2006).
93. Kispal,G., Csere,P., Prohl,C., & Lill,R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**, 3981-3989 (1999).
94. Schilke,B., Voisine,C., Beinert,H., & Craig,E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10206-10211 (1999).

95. Muhlenhoff,U., Gerber,J., Richhardt,N., & Lill,R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* **22**, 4815-4825 (2003).
96. Frazzon,J. & Dean,D.R. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 166-173 (2003).
97. Adam,A.C., Bornhovd,C., Prokisch,H., Neupert,W., & Hell,K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J* **25**, 174-183 (2006).
98. Biederbick,A. *et al.* Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell Biol.* **26**, 5675-5687 (2006).
99. Adinolfi,S. *et al.* Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat Struct. Mol. Biol.* **16**, 390-396 (2009).
100. Bencze,K.Z. *et al.* The structure and function of frataxin. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269-291 (2006).
101. O'Neill,H.A., Gakh,O., & Isaya,G. Supramolecular assemblies of human frataxin are formed via subunit-subunit interactions mediated by a non-conserved amino-terminal region. *J Mol. Biol.* **345**, 433-439 (2005).
102. Lange,H., Kispal,G., & Lill,R. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol. Chem.* **274**, 18989-18996 (1999).
103. Paradkar,P.N., Zumbrennen,K.B., Paw,B.H., Ward,D.M., & Kaplan,J. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1007-1016 (2009).
104. Camaschella,C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353-1358 (2007).
105. Wingert,R.A. *et al.* Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* **436**, 1035-1039 (2005).
106. Lill,R. & Muhlenhoff,U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669-700 (2008).

107. Netz,D.J., Pierik,A.J., Stumpfig,M., Muhlenhoff,U., & Lill,R. The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat Chem. Biol.* **3**, 278-286 (2007).
108. Song,D. & Lee,F.S. A role for IOP1 in mammalian cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol. Chem.* **283**, 9231-9238 (2008).
109. Srinivasan,V. *et al.* Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure.* **15**, 1246-1257 (2007).
110. Biederbick,A. *et al.* Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell Biol.* **26**, 5675-5687 (2006).
111. Lill,R. & Muhlenhoff,U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 133-141 (2005).
112. Campuzano,V. *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427 (1996).
113. Stehling,O., Elsasser,H.P., Bruckel,B., Muhlenhoff,U., & Lill,R. Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol. Genet* **13**, 3007-3015 (2004).
114. Martelli,A. *et al.* Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol. Genet* **16**, 2651-2658 (2007).
115. Puccio,H. *et al.* Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* **27**, 181-186 (2001).
116. Becker,E.M., Greer,J.M., Ponka,P., & Richardson,D.R. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood* **99**, 3813-3822 (2002).
117. LARSSON,L.E., LINDERHOLM,H., MUELLER,R., RINGQVIST,T., & SOERNAES,R. HEREDITARY METABOLIC MYOPATHY WITH PAROXYSMAL MYOGLOBINURIA DUE TO ABNORMAL GLYCOLYSIS. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry* **27**, 361-380 (1964).

118. LINDERHOLM,H., Essen-Gustavsson,B., & Thornell,L.E. Low succinate dehydrogenase (SDH) activity in a patient with a hereditary myopathy with paroxysmal myoglobinuria. *J Intern. Med.* **228**, 43-52 (1990).
119. Haller,R.G. *et al.* Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and aconitase. Pathophysiology of exercise in a novel human muscle oxidative defect. *J Clin. Invest* **88**, 1197-1206 (1991).
120. Hall,R.E., Henriksson,K.G., Lewis,S.F., Haller,R.G., & Kennaway,N.G. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin. Invest* **92**, 2660-2666 (1993).
121. Mochel,F. *et al.* Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am J Hum Genet* **82**, 652-660 (2008).
122. Olsson,A., Lind,L., Thornell,L.E., & Holmberg,M. Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol. Genet* **17**, 1666-1672 (2008).
123. Muhlenhoff,U., Gerber,J., Richhardt,N., & Lill,R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* **22**, 4815-4825 (2003).
124. Rodriguez-Manzaneque,M.T., Tamarit,J., Belli,G., Ros,J., & Herrero,E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1109-1121 (2002).
125. Camaschella,C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353-1358 (2007).
126. Allikmets,R. *et al.* Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol. Genet* **8**, 743-749 (1999).
127. Bekri,S. *et al.* Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256-3264 (2000).

128. Bottomley,S.S. Congenital sideroblastic anemias. *Curr. Hematol. Rep.* **5**, 41-49 (2006).
129. Allikmets,R. *et al.* Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol. Genet* **8**, 743-749 (1999).
130. Pagon,R.A., Bird,T.D., Detter,J.C., & Pierce,I. Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *J Med. Genet* **22**, 267-273 (1985).
131. Bekri,S. *et al.* Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256-3264 (2000).
132. Clarke,S.L. *et al.* Iron-responsive degradation of iron-regulatory protein 1 does not require the Fe-S cluster. *EMBO J* **25**, 544-553 (2006).
133. Kispal,G., Csere,P., Prohl,C., & Lill,R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**, 3981-3989 (1999).
134. Andreu,A.L., Martinez,R., Marti,R., & Garcia-Arumi,E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors. *Mitochondrion.* **9**, 242-246 (2009).
135. Font,A. *et al.* Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue.125-129 .
136. Vu,T.H. *et al.* Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. *Neurology* **50**, 1783-1790 (1998).
137. Gnanapragasam,V.J. Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU. Int.* **105**, 274-278 (2010).
138. Yu,J. *et al.* Copy-number analysis of topoisomerase and thymidylate synthase genes in frozen and FFPE DNAs of colorectal cancers. *Pharmacogenomics.* **9**, 1459-1466 (2008).

139. Dimmock,D.P. *et al.* Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum Mutat.* **29**, 330-331 (2008).
140. Salviati,L. *et al.* Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations. *Ann. Neurol.* **52**, 311-317 (2002).
141. Karadimas,C.L. *et al.* Navajo neurohepatopathy is caused by a mutation in the MPV17 gene. *Am J Hum Genet* **79**, 544-548 (2006).
142. Sarzi,E. *et al.* Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J. Pediatr.* **150**, 531-4, 534 (2007).
143. Saada,A. *et al.* Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation. *J. Med. Genet.* **44**, 784-786 (2007).
144. Sakamoto,O. *et al.* Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene. *Pediatr. Int.* **53**, 921-925 (2011).
145. Valayannopoulos,V. *et al.* New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion.* **10**, 335-341 (2010).
146. Rivera,H. *et al.* Marked mitochondrial DNA depletion associated with a novel SUCLG1 gene mutation resulting in lethal neonatal acidosis, multi-organ failure, and interrupted aortic arch. *Mitochondrion.* **10**, 362-368 (2010).
147. Ostergaard,E. Disorders caused by deficiency of succinate-CoA ligase. *J. Inherit. Metab Dis.*(2008).
148. Ostergaard,E. *et al.* A novel missense mutation in SUCLG1 associated with mitochondrial DNA depletion, encephalomyopathic form, with methylmalonic aciduria. *Eur. J Pediatr.* **169**, 201-205 (2010).
149. Fowler,B., Leonard,J.V., & Baumgartner,M.R. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J. Inherit. Metab Dis.* **31**, 350-360 (2008).
150. Van,G.G., Dermaut,B., Lofgren,A., Martin,J.J., & Van,B.C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* **28**, 211-212 (2001).

-
151. Horvath,R. *et al.* Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* **129**, 1674-1684 (2006).
152. Tang,S. *et al.* Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med. Genet* **48**, 669-681 (2011).
153. Wang,W. *et al.* Identification of rare DNA variants in mitochondrial disorders with improved array-based sequencing. *Nucleic Acids Res.* **39**, 44-58 (2011).
154. Rodriguez-Ezpeleta,N. *et al.* High-density SNP genotyping detects homogeneity of Spanish and French Basques, and confirms their genomic distinctiveness from other European populations. *Hum. Genet.* **128**, 113-117 (2010).
155. Angelini,S. *et al.* NfuA, a new factor required for maturing Fe/S proteins in *Escherichia coli* under oxidative stress and iron starvation conditions. *J. Biol. Chem.* **283**, 14084-14091 (2008).
156. Balasubramanian,R., Shen,G., Bryant,D.A., & Golbeck,J.H. Regulatory roles for IscA and SufA in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **188**, 3182-3191 (2006).
157. Bandyopadhyay,S. *et al.* A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *J. Biol. Chem.* **283**, 14092-14099 (2008).
158. Schilke,B., Voisine,C., Beinert,H., & Craig,E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10206-10211 (1999).
159. Tong,W.H., Jameson,G.N., Huynh,B.H., & Rouault,T.A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9762-9767 (2003).
160. Touraine,B. *et al.* Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant J.* **40**, 101-111 (2004).

161. Yabe, T. *et al.* The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell* **16**, 993-1007 (2004).
162. Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., & Dean, D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 599-604 (2000).
163. Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., & Craig, E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10206-10211 (1999).
164. Booker, S.J., Cicchillo, R.M., & Grove, T.L. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 543-552 (2007).
165. Hiltunen, J.K. *et al.* Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1195-1202 (2010).
166. Padmalayam, I., Hasham, S., Saxena, U., & Pillarisetti, S. Lipoic acid synthase (LASy): a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. *Diabetes* **58**, 600-608 (2009).
167. Booker, S.J., Cicchillo, R.M., & Grove, T.L. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 543-552 (2007).
168. Stehling, O. *et al.* Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5517-5528 (2008).
169. Stehling, O., Sheftel, A.D., & Lill, R. Chapter 12 Controlled expression of iron-sulfur cluster assembly components for respiratory chain complexes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* **456**, 209-231 (2009).
170. Stehling, O. *et al.* Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5517-5528 (2008).
171. Sheftel, A.D. *et al.* Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 11775-11780 (2010).

172. Bandyopadhyay, S. *et al.* A proposed role for the *Azotobacter vinelandii* NfuA protein as an intermediate iron-sulfur cluster carrier. *J. Biol. Chem.* **283**, 14092-14099 (2008).
173. Tong, W.H., Jameson, G.N., Huynh, B.H., & Rouault, T.A. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 9762-9767 (2003).
174. Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., & Dean, D.R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 599-604 (2000).
175. Tong, W.H. & Rouault, T.A. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* **3**, 199-210 (2006).
176. Tong, W.H. & Rouault, T.A. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* **3**, 199-210 (2006).
177. Unciuleac, M.C. *et al.* In vitro activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* **46**, 6812-6821 (2007).
178. Yeh, A.P. *et al.* Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J. Mol. Biol.* **300**, 587-595 (2000).
179. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831-838 (2009).
180. Muhlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., & Lill, R. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol. Chem.* **286**, 41205-41216 (2011).
181. Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., & Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* **22**, 4815-4825 (2003).

182. Gelling,C., Dawes,I.W., Richhardt,N., Lill,R., & Muhlenhoff,U. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell Biol.* **28**, 1851-1861 (2008).
183. Muhlenhoff,U. *et al.* The ISC [corrected] proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**, 495-504 (2007).
184. Muhlenhoff,U., Richter,N., Pines,O., Pierik,A.J., & Lill,R. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol. Chem.* **286**, 41205-41216 (2011).

7. Apèndix

Durant la realització de la present Tesi doctoral s'ha col·laborat en la realització d'altres treballs experimentals que han donat lloc a les següents publicacions:

Article Annèx 1

Coenzyme Q10 deficiency associated with a mitochondrial DNA depletion syndrome: a case report.

Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Navarro-Sastre A, Gallardo E, Bornstein B, Herrero-Martín D, Rivera H, Martín MA, Martí R, García-Cazorla A, Montoya J, Navas P, Artuch R.

Revista: Clinical Biochemistry. 2009 May; 42(7-8):742-5. Factor d'impacte: 2,076

Aquest treball descriu l'estudi d'un pacient amb sospita de patir el síndrome de depleció de mtDNA. Els anàlisis de laboratori van confirmar la presència de depleció (22% mtDNA residual) en muscular, juntament amb una deficiència de coenzim Q10. L'estudi mutacional no va mostrar cap mutació en els gens relacionats amb la depleció del mtDNA però el suplement amb CoQ10 va resultar en una millora del cultiu de fibroblasts. Aquesta deficiència de CoQ10 probablement sigui deguda a algun efecte secundari de la depleció i el seu estudi en futurs pacients sembla adequat.



Available online at www.sciencedirect.com

Clinical Biochemistry 42 (2009) 742–745

**CLINICAL
BIOCHEMISTRY**

Case Report

Coenzyme Q₁₀ deficiency associated with a mitochondrial DNA depletion syndrome: A case report

Raquel Montero^{a,b,c}, Jose A. Sánchez-Alcázar^{c,d}, Paz Briones^{c,e}, Aleix Navarro-Sastre^{c,e},
Ester Gallardo^{c,f}, Belén Bornstein^{c,f}, Dolores Herrero-Martin^{c,g}, Henry Rivera^{c,h},
Miguel A. Martín^{c,h}, Ramón Martí^{c,i}, Angels García-Cazorla^{a,b,c}, Julio Montoya^{c,g},
Plácido Navas^{c,d}, Rafael Artuch^{a,b,c,*}

^a Departments of Clinical Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain^b Pediatric Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain^c CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Spain^d Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC, Sevilla, Spain^e Instituto de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic, Barcelona, Spain^f Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain^g Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain^h Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spainⁱ Laboratori de Patologia Mitochondrial, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received 18 September 2008; received in revised form 28 October 2008; accepted 29 October 2008

Available online 3 December 2008

Abstract**Objectives:** To report on a case with a mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome.**Design and methods:** Laboratory studies were done in muscle biopsy and fibroblasts to evaluate coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) status and quantify mitochondrial DNA.**Results:** Decreased CoQ₁₀ values and a 78% of mtDNA depletion were detected in muscle. Mutational studies failed to reveal any pathogenic mutation in nuclear genes related with mtDNA maintenance.**Conclusions:** mtDNA depletion syndrome was associated with CoQ₁₀ deficiency in our patient.

© 2008 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Mitochondrial DNA depletion; Coenzyme Q₁₀ deficiency; Pediatric patients; Mitochondrial respiratory chain**Introduction**

Mitochondrial DNA depletion syndromes are a relatively common cause of mitochondrial diseases in infancy that bring about dysfunction of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. These disorders are of autosomal recessive inheritance and all of their causative mutations are located in

nuclear genes. These genes are involved in mtDNA maintenance, and in fact, an important reduction of the mtDNA copy number is the molecular basis of these syndromes [1]. Several clinical pictures have been reported, ranging from those presenting a fatal neonatal clinical presentation to milder phenotypes [2]. Mutations in *DGUOK*, *POLG*, *TK2*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B* and *PEO1* (*Twinkle*) genes are responsible for mtDNA depletion syndromes. However, there remain mtDNA depletion cases of unknown origin [2].

Primary CoQ₁₀ deficiency syndromes are an expanding clinical group of mitochondrial disorders that have recently been associated with mutations in several genes involved in CoQ₁₀ metabolism [3–5] CoQ₁₀ acts as a mobile electron carrier of the

* Corresponding author. Department of Clinical Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 280 3626.

E-mail address: rartuch@hsjdbcn.org (R. Artuch).

mitochondrial respiratory chain (MRC) and it is essential for ATP biosynthesis. CoQ₁₀ deficiency causes impairment in MRC enzyme activities, (mainly NADH: cytochrome c oxidoreductase (complex I+CoQ₁₀+III) and succinate: cytochrome c oxidoreductase (complex II+CoQ₁₀+III)). At present, five main phenotypes have been associated with primary CoQ₁₀ deficiency: encephalomyopathy with myoglobinuria, a severe multisystemic disease, Leigh syndrome, cerebellar ataxia and isolated myopathic form [6].

In this paper we report a neonatal case presenting an mtDNA depletion syndrome associated with CoQ₁₀ deficiency.

Case report

We report on a one-day-old girl, the third child of healthy first degree consanguineous parents from Morocco. Two previous pregnancies were characterized by pre-eclampsia ending in fetal death. During the current pregnancy maternal hypertension and edema were present. The child was born prematurely (33 weeks), birth weight was 1950 g and head circumference 32 cm. Generalized hydrops, escleredema-like lesions, petechiae, equimosis, poor activity, hypotonia, joint contractures and respiratory failure leading to mechanical ventilation were present. Impaired clotting factors (prothrombin rate 25%) and hyperlactacidaemia (9.7 mmol/l) were detected. Plasma amino acids showed high alanine values (722 μmol/l; reference values: 155–450), and organic acids disclosed high excretion of lactate. Plasma ammonia, serum transferrin isoelectrofocusing pattern, blood acylcarnitines, urine amino acids (no tubulopathy) and other biochemical tests for screening of inborn errors of metabolism were normal. Cranial, abdominal and cardiac ultrasound and X-ray skeletal studies were normal as well. The patient needed constant mechanical ventilation and remained severely hypotonic with decreased tendon reflexes and no spontaneous movements. Due to the refractory clinical and biochemical status of the child and the persistent hyperlactacidaemia in spite of symptomatic treatment (bicarbonate, thiamine, riboflavin, biotine, carnitine), the effect of artificial ventilation was limited and the child died at 10 days of life. Following the diagnostic protocol of mitochondrial disorders, muscle, skin and liver biopsies were collected.

Respiratory chain enzymology performed on whole muscle homogenate revealed a decrease in citrate synthase and complex II+ III activities of the mitochondrial respiratory chain, while complex I+ III activity was in the lower limit of the reference range and the activities of other mitochondrial respiratory chain complexes were normal (Table 1). These results led us to

measure CoQ₁₀ content, which was reduced in muscle (46 nmol/gram of protein; reference values: 110–480) and cultured skin fibroblasts (19 nmol/gram of protein; reference values: 107–145). Owing to the neonatal fatal clinical presentation, mtDNA depletion was investigated by quantitative real-time-PCR, revealing 78% depletion in muscle. Mutational study of *DGUK*, *POLG*, *TK2*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B* and *PEO1* (*Twinkle*) genes by sequencing of all exons and intron boundaries failed to reveal any pathogenic mutation.

To study the effect of the CoQ₁₀ deficiency detected, fibroblasts were cultured in the presence or absence of CoQ₁₀. Fibroblasts from healthy volunteers and patient were cultured in D-MEM media (4500 mg/L glucose, 1-glutamine, pyruvate; Invitrogen) supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS, Linus) and antibiotics (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. One hundred thousands fibroblasts per well were cultured in the absence or presence of CoQ₁₀ (10 μmol) for 1 week. After discharging supernatant and dead cells, cell counting was performed from 10 high power fields using an inverted microscope and a 40× objective. A clear improvement in fibroblast growth was observed in the presence of CoQ₁₀ (Fig. 1). The patient's fibroblasts growth was four times greater than control fibroblast, which increased about 40%. Complex II+ III activity increased up to 41% after fibroblast incubation with duroquinone compared with baseline conditions, while in control fibroblast incubated with duroquinone, the Complex II+ III activity increase was less than 30% [2].

Discussion

To our knowledge, this is the first time that mtDNA depletion syndrome has been associated with CoQ₁₀ deficiency. We could not detect mutations in the nuclear genes that have been associated with mtDNA depletion syndromes. Nevertheless, the clinical picture and the percentage of depletion support the diagnosis of this disorder, and other unknown nuclear genes related with mtDNA maintenance might be involved in this case.

One explanation for the observed association between CoQ₁₀ deficiency and mtDNA depletion in the patient is that mtDNA depletions may lead to secondary CoQ₁₀ deficiency. In fact, secondary CoQ₁₀ deficiencies have been associated with several genetic conditions, such as Kearns-Sayre syndrome [7], aprataxin deficiency [8] and mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase genes [9].

Table 1
Biochemical results of mitochondrial respiratory chain activities and CoQ₁₀ concentrations in patient muscle compared with reference values (expressed as range)

	CoQ ₁₀ (nmol/g protein)	CoQ ₁₀ (nmol/CS units)	CS* (nmol/min, mg protein)	CI+ III (mU/CS units)	CI+ III (mU/CS units)	CII (mU/CS units)	CIII (mU/CS units)	CIV (mU/CS units)
Patient values	46	1.6	63	107	21	60	937	916
Reference values	110–480	2.7–8.5	71–200	107–560	75–149	33–69	610–1760	590–1300

* CS: citrate synthase.

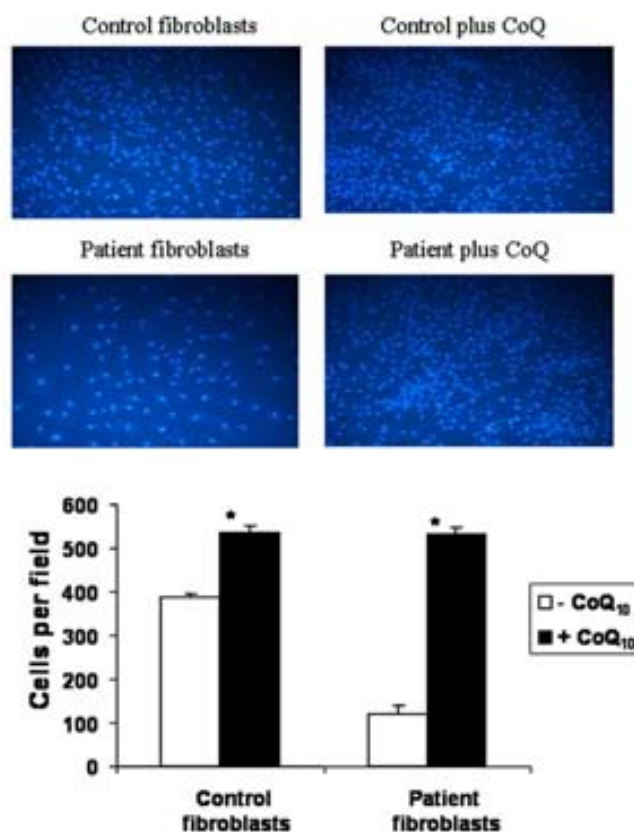


Fig. 1. Control and patient fibroblasts cultured with and without 10 $\mu\text{mol/L}$ CoQ₁₀. A significant increase in cell number (121 to 533 cells) was observed after CoQ₁₀ supplementation in patient culture media when compared with control fibroblasts (387 to 536). Data represent the mean \pm SD of three separate experiments (*Student *T*-test; $P < 0.01$).

Other explanation for this association might be related with primary CoQ₁₀ deficiencies. Biochemical data in muscle strongly supported the presence of a CoQ₁₀ deficiency (a defect in CoQ₁₀ values together with an impairment of MRC CoQ₁₀-dependent enzyme activities). These results were confirmed in fibroblasts, where CoQ₁₀ values were extremely low. The improvement of fibroblast growth and of complex II+III activity after CoQ₁₀ supplementation in the culture medium (Fig. 1) lends support to the hypothesis that CoQ₁₀ deficiency has a deleterious effect on fibroblast metabolism, as has been demonstrated in the metabolism of nucleotides in primary CoQ₁₀ deficiency [10]. At present, the first patients presenting mutations in some of the genes controlling CoQ₁₀ biosynthesis are being reported [4,5,10]. Although the clinical phenotype of our case is not similar to those previously reported as associated with mutations in CoQ₁₀ genes, sequencing of these genes seems advisable in order to rule out a primary CoQ₁₀ deficiency. It is noteworthy that primary CoQ₁₀ deficiency (mutations in *COQ2*

gene) has been associated with impaired de novo pyrimidine synthesis [7], and genetic defects in nucleotide metabolism have already been associated with mtDNA depletion, such as DGOUG and TK2 deficiencies [11].

Although therapeutical approaches to mtDNA depletion syndromes have improved in the last decade, no effective treatments are available for patients with such severe phenotype and such early presentation. Nonetheless, patients with primary CoQ₁₀ deficiency usually respond very well to CoQ₁₀ supplementation. Unfortunately, CoQ₁₀ therapy was not assayed in this case, since the detection of the CoQ₁₀ deficiency was carried out after the patient's death.

In conclusion, mtDNA depletion syndrome was associated in our patient with CoQ₁₀ deficiency, probably as a secondary consequence, which might have contributed to the pathophysiology of the disease. The investigation of CoQ₁₀ status in patients with an mtDNA depletion syndrome therefore seems advisable.

Acknowledgments

This project was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS:P104–0009, P107-0045, P104-0567 and P104-1351), Diputación General de Aragón (Grupos Consolidados B33) and European Union contract LSHB-CT-2004-005151. M.D.H.-M. is supported by a predoctoral fellowship FIS (FI05/00501). The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. We acknowledge the expert technical assistance of Sonia Moliner.

References

[1] Alberio S, Mineri R, Tirazzi V, Zeviani M. Depletion of mtDNA: Syndromes and genes. *Mitochondrion* 2007;7:6–12.

[2] Sazzi E, Bourdon A, Chrétien D, et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007;105:531–4.

[3] DiMauro S, Quinzii CM, Hirano M. Mutations in coenzyme Q10 biosynthetic genes. *J Clin Invest* 2007;117:587–9.

[4] Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, et al. ADCK3, an ancestral kinase is mutated in form of recessive ataxia associated with Coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008;82:661–72.

[5] Mollet J, Delahodde A, Serre V, et al. CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* 2008;82:623–30.

[6] Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M. Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res* 2007;32:723–7.

[7] Zierz S, Jahns G, Jerusalem F. Coenzyme Q in serum and muscle of 5 patients with Kearns-Sayre syndrome and 12 patients with ophthalmoplegia plus. *J Neurol* 1989;236:97–101.

[8] Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, et al. Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 2005;64:539–41.

[9] Gempel K, Topaloglu H, Talim B, et al. The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain* 2007;130:2037–44.

[10] Lopez-Martin JM, Salviati L, Trevisson E, et al. Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 2007;16:1091–7.

[11] Mandel H, Szargel R, Labay V, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 2001;29:337–41.

Article Annèx 2

Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease.

Ferrer-Cortés X, Font A, Bujan N, Navarro-Sastre A, Matalonga L, Arranz JA, Riudor E, Del Toro M, Garcia-Cazorla A, Campistol J, Briones P, Ribes A, Tort F.

Enviat per publicar a la revista *Journal of Molecular Genetics and Metabolism*.

Els defectes de cofactors del metabolisme energètic mitocondrial són un grup de malalties amb un ampli espectre de símptomes clínics, perfils metabòlics molt concrets i defectes enzimàtics variables. Mutacions en NFU1 van ser indentificades recentment en pacients amb encefalopatia fatal, mostrant un fenotip bioquímic coherent amb els defectes dels complexos de CRM depenents d'àcid lipoic. Aquest descobriment va permetre conèixer la funció de NFU1 com a proteïna Fe-S necessària per l'activitat de la lipoic àcid sintasa i per les activitats de la CRM. Per entendre els mecanismes fisiopatològics de la malaltia, s'han caracteritzat els perfils d'expressió proteica dels pacients portadors de mutacions en NFU1. Els fibroblasts dels pacients portadors de la mutació p.Gly208Cys van mostrar una total absència d'àcid lipoic unit a proteïnes, amb una disminució de les subunitats SDHA i SDHB del complex II. En canvi, les altres subunitats de la CRM van ser normals. La lipoilació també es va trobar disminuïda en fetge i múscul, però no en altres teixits disponibles (cervell, ronyó, pulmó) de pacients NFU1. Tot i que l'expressió de les subunitats no està alterada en teixits, el BN-PAGE va mostrar un defecte d'acoblament del complex II en múscul, consistent amb la deficiència enzimàtica d'aquest mateix complex. Aquest estudi ofereix nova informació sobre les bases moleculars de la malaltia NFU1, així com també en la regulació de la proteïna NFU1 en teixits humans. Demostrem que l'expressió de la proteïna NFU1 és ubiqüa i corroborem que els defectes en la

biosíntesis de la lipoilació i la deficiència del complex II són les característiques més rellevants de la malaltia, particularment en els pacients portadors de la mutació p.Gly208Cys. Segons les nostres observacions, recomanem l'anàlisi d'aquests marcadors proteics en fibroblasts com el primer pas a l'hora de diagnosticar aquests pacients.

*Manuscript

[Click here to download Manuscript: Manuscript.doc](#)[Click here to view linked References](#)**Protein expression profiles in patients carrying *NFUI* mutations.****Contribution to the pathophysiology of the disease**

Xènia Ferrer-Cortès¹, Aida Font¹, Núria Bujan¹, Aleix Navarro-Sastre^{1,2}, Leslie Matalonga¹, José Antonio Arranz³, Encarnació Riudor³, Mireia del Toro⁴, Angels García-Cazorla^{2,5}, Jaume Campistol^{2,5}, Paz Briones^{1,2,6}, Antonia Ribes^{1,2,*}, Frederic Tort^{1,2,*}

¹ Secció d'Errors Congènits del Metabolisme, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, IDIBAPS, 08028, Barcelona, Spain

² CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

³ Laboratori de Metabolopaties, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁴ Servei de Neurologia Pediàtrica, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁵ Servei de Neurologia, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁶ Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain

Address for correspondence:

Secció d'Errors Congènits del Metabolisme -IBC

Servei de Bioquímica i Genètica Molecular,

Hospital Clínic

Edifici Helios III, planta baixa

C/ Mejía Lequerica s/n

08028-Barcelona

Phone: +34 93 227 56 00

Fax: +34 93 227 56 68

***Co-corresponding authors**

Frederic Tort

E-mail: frederic.tort.escale@gmail.com

Antonia Ribes

E-mail: aribes@clinic.ub.es

Word Count: 2832

Summary word count: 263

Number of figures: 5

Number of Tables: 1

SUMMARY

1 Cofactor disorders of mitochondrial energy metabolism are a heterogeneous group of
2 diseases with a wide variety of clinical symptoms, particular metabolic profiles and
3 variable enzymatic defects. Mutations in *NFU1* were recently identified in patients with
4 fatal encephalopathy displaying a biochemical phenotype consistent with defects in
5 lipoic acid-dependent enzymatic activities and respiratory chain complexes. This
6 discovery highlighted the molecular function of NFU1 as an iron-sulfur(Fe-S) cluster
7 protein necessary for lipoic acid biosynthesis and respiratory chain complexes activities.
8
9 To understand the pathophysiological mechanisms underlying this disease we have
10 characterized the protein expression profiles of patients carrying *NFU1* mutations.
11 Fibroblasts from patients with the p.Gly208Cys mutation showed complete absence of
12 protein-bound lipoic acid and decreased SDHA and SDHB subunits of complex II. In
13 contrast, subunits of other respiratory chain complexes were normal. Protein lipoylation
14 was also decreased in muscle and liver but not in other tissues available (brain, kidney,
15 lung) from NFU1 patients. Although levels of the respiratory chain subunits were
16 unaltered in tissues, BN-PAGE showed an assembly defect for complex II in muscle,
17 consistent with the low enzymatic activity of this complex. This study provides new
18 insights into the molecular bases of NFU1 disease as well as into the regulation of
19 NFU1 protein in human tissues. We demonstrate a ubiquitous expression of NFU1
20 protein and further suggest that defects in lipoic acid biosynthesis and complex II are
21 the main molecular signature of this disease, particularly in patients carrying the
22 p.Gly208Cys mutation. Based on our observations we strongly recommend the analysis
23 of these protein markers in fibroblasts as the first approach to properly diagnose this
24 disease.

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Take-home message: The defects in lipoic acid biosynthesis and respiratory chain complex II are the main molecular signatures of patients carrying *NFU1* missense mutations.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Funding: This research was supported in part by Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) and the grants FIS PI08/90348 and FIS PI08/0307. The authors confirm independence from the sponsors. The content of this article has not been influenced by the sponsors.

Acknowledgements: We are grateful to the families involved in this study.

Details of ethics approval: All the procedures were approved by the ethics committee of the Hospital Clinic, Barcelona.

Patient consent statement: Informed consent has been obtained for all the samples used.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cofactor disorders of mitochondrial energy metabolism constitute a heterogeneous group of diseases with a wide variety of clinical symptoms associated with particular metabolic profiles and variable enzymatic defects of the energy metabolism. Although most of the genes involved in mitochondrial cofactor biosynthesis still remain to be elucidated, an increasing number of genes have recently been identified (Ylikallio and Suomalainen 2012, Navarro-Sastre et al 2011, Cameron et al 2011, Haack et al 2012, Mayr et al 2012, Mayr et al 2011, Quinzii and Hirano 2011). The understanding of the pathophysiological and molecular bases of these diseases will help to develop potential therapeutic strategies.

In 2011 we identified mutations in *NFU1* (MIM 608100) in ten patients with fatal infantile encephalopathy and/or pulmonary hypertension displaying a biochemical phenotype consistent with a defect in lipoic acid biosynthesis (Navarro-Sastre et al 2011). Lipoic acid is an essential cofactor which is covalently bound to the E2 subunits of the pyruvate dehydrogenase (PDH), α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD) complexes and to the H subunit of the glycine cleavage system (GCS) (Hiltunen JK et al 2010). Clinically, patients presented with acute neurological deterioration secondary to vacuolating leukoencephalopathy, pulmonary hypertension and metabolic acidosis. The biochemical phenotype included hyperglycinemia, lactic acidemia, and high urinary excretion of 2-ketoglutaric, 2-ketoadipic and 2-hydroxyadipic acids, among others. These patients also had low PDH activity and low or undetectable GCS activity, low rates of substrate oxidation and deficiency of the mitochondrial respiratory chain complex II (Navarro-Sastre et al 2011).

NFU1 is a conserved protein involved in the pathway of iron sulfur (Fe-S) cluster biogenesis. Fe-S clusters are essential protein cofactors that participate in a wide variety

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of enzymatic reactions, including electron transfer in the mitochondrial respiratory complexes I to III and sulfur donors in the synthesis of lipoic acid catalyzed by the mitochondrial enzyme lipoic acid synthase (LAS) (Johnson et al 2005, Beinert 2000, Booker SJ et al 2007, Lill et al 2012).

The discovery of human mutations in *NFU1* allowed a better understanding of the molecular function of this protein and its relationship to lipoic acid-dependent pathways (Navarro-Sastre et al 2011, Cameron et al 2011). Indeed, patients carrying *NFU1* mutations showed a strong reduction of protein-bound lipoic acid, suggesting that *NFU1* might be involved in lipoic acid biosynthesis probably delivering Fe-S to LAS in the mitochondria. In addition, *NFU1* patients showed heterogeneous patterns of mitochondrial respiratory chain alterations including isolated complex II deficiency (Navarro-Sastre et al 2011) or combined deficiencies of complexes I, II and III (Cameron et al 2011). However, the physiopathology of the disease caused by *NFU1* mutations still remains to be completely understood.

The aim of this study was to characterize the expression pattern of a subset of proteins dependent on Fe-S clusters in a series of *NFU1* patients to further delineate the molecular bases of the disease and to provide efficient tools for the diagnosis.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The seven patients involved in this study have previously been described and characterized clinically and biochemically (Navarro-Sastre et al 2011). These patients presented with neurological deterioration and pulmonary hypertension or failure to thrive with pulmonary hypertension and metabolic acidotic episodes. Symptoms started at 1-9 months of age and all them died before the age of 15 months. Their biochemical phenotype was characterized by metabolic acidosis with variable lactic acidemia, hyperglycinemia and high urinary excretion of 2-ketoglutaric, 2-ketoadipic and 2-hydroxyadipic acids, among others. They all had low PDH and GCS activities and low rates of ¹⁴C substrate (pyruvate, glutamate and leucine) oxidation. The mitochondrial respiratory chain complexes analysis in frozen muscle showed slightly reduced complex II activity.

All patients were homozygous for a missense mutation except patient 1 (P1) that was compound heterozygous. The genotype and the available tissues for each patient are shown in Table 1.

Protein expression analysis and Blue Native gel electrophoresis

Fibroblasts and tissues obtained from patients and control individuals were homogenised in SETH buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA, 5x10⁴ U/l heparin). Cleared lysates were subjected to SDS-PAGE, electroblotted and proteins were visualized by immunostaining with specific antibodies followed by colorimetric detection (Opti-4CN™ Substrate Kit ,Bio-Rad, U.S). IMAGEJ software was used for densitometry analysis of protein expression levels (Abramoff et al 2004).

1 Anti-NFU1 antibody was obtained by immunizing rabbits with purified NFU1 protein
2 (Navarro-Sastre et al 2011). Antibodies against SDHA, SDHB, NDUFA9, ATP5A and
3 UQCRC2 were from Invitrogen (Paisley, UK). Protein conjugated-lipoic acid antibody
4 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
5 Germany), PDHc (kindly donated by Dr. W. Ruitenbeck, the Netherlands) and
6 UQCRFS1 (Abcam, Cambridge, UK) were also used in this study. The mitochondrial
7 respiratory chain complexes assembly was analyzed by Blue-Native Polyacrylamide
8 Gel Electrophoresis (BN-PAGE) as described (Wittig I et al 2006).
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

Protein expression profiles in fibroblasts from NFU1 patients

We have analyzed NFU1, protein-bound lipoic acid and several subunits of the respiratory chain complexes by western blot in two homozygous (P2 and P3) and one compound heterozygous patient (P1) (Table 1). Results showed absence of lipoic acid bound to E2 subunits of PDH and KGDH complexes in the three patients studied (Fig. 1). SDHA and SDHB subunits of complex II, the latter containing Fe-S clusters, were both strongly reduced in all our NFU1 patients. In contrast, subunits from complex I (NDUFA9) and complex III (UQCRC2 and the Fe-S cluster protein UQCRFS1) showed similar levels to those of controls. The alpha subunit of complex V (ATP5A) was used as non Fe-S control and showed no changes in protein expression in any of the samples analyzed. NFU1 protein levels were similar in all patients and did not differ from controls (Fig. 1). Nevertheless, P1 was compound heterozygous for the common missense mutation and an additional nucleotide substitution that generates a transcript with a premature termination codon (PTC), which is most likely degraded by the non-sense mediated mRNA decay mechanism (Navarro-Sastre et al 2011). Therefore, the expression of NFU1 was expected to be reduced in this patient, but this was not evident by western blot analysis (Fig.1). To know if the NFU1 protein was decreased in P1 we performed a quantitative western blot using anti-NFU1 antibody (Fig.2). The intensity of the bands was analyzed with the IMAGEJ densitometry software and normalized to GAPDH and UQCRC2 signals, which were used as loading controls for global and mitochondrial protein expression, respectively. Our results showed that NFU1 in P1 is in fact reduced up to 40% of the levels found in controls (Fig.2).

Lipoylated proteins and NFU1 expression profiles in human control tissues

1 To investigate the regulation and the physiological behavior of NFU1 we have studied
2
3 protein lipoylation and NFU1 expression in a series of human control tissues (brain,
4
5 muscle, heart, kidney, lung, spleen and liver). UQCRC2 and citrate synthase activity
6
7 were used as markers of the mitochondrial content (Fig.3). Using the IMAGEJ software
8
9 we quantified the levels of NFU1, protein-bound lipoic acid and UQCRC2 in human
10
11 tissues (Fig.3, lower panel). As a general rule, the results showed a positive association
12
13 between NFU1 and lipoylated protein levels, being both increased in tissues with high
14
15 mitochondrial content, as demonstrated by UQCRC2 expression and citrate synthase
16
17 activity. Heart and brain tissue had the highest levels of NFU1 and protein-bound lipoic
18
19 acid together with the highest levels of UQCRC2 expression and citrate synthase
20
21 activity. Kidney, spleen, muscle and liver showed intermediate levels of these proteins
22
23 whereas lung showed the lowest levels, consistent with very low mitochondrial content
24
25 (Fig.3).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

Lipoylated proteins and respiratory chain expression profiles in tissues from NFU1 patients

37 To investigate the pathophysiology and the molecular background of NFU1 disease we
38
39 studied a series of available tissues from NFU1 patients and healthy individuals
40
41 including brain, kidney, liver, lung (Fig.4A) and muscle (Fig.4B). The levels of protein-
42
43 bound lipoic acid and of several subunits of the respiratory chain complexes were
44
45 analyzed by western blot. Our results showed no apparent defects in patients' brain,
46
47 kidney or lung for lipoylated proteins and respiratory chain subunits, including those
48
49 containing Fe-S clusters (Fig 4A). However, liver (Fig.4A) and muscle (Fig.4B) showed
50
51 a strong reduction of protein-bound lipoic acid but not of the respiratory chain subunits.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Because the enzymatic activities of complexes containing Fe-S clusters, particularly complex II were low in these patients (Navarro-Sastre et al 2011), we investigated whether the respiratory chain complexes were correctly assembled by BN-PAGE in muscle tissue from the only patient where enough material was available. Immunostaining using antibodies against subunits of complexes I, II and III showed a strong reduction of assembled complex II but normal amounts of assembled complexes I and III (Fig.4C).

Age-related NFU1 protein expression

To study the age-related regulation of NFU1 we have analyzed control tissues from the first week of life until the adulthood. Western blot analysis of muscle homogenates showed high levels of NFU1 protein until 3 months after birth and decreasing amounts along the first years of life until the adult age (Fig. 5).

DISCUSSION

1 The aim of this study was to provide a better understanding of the molecular and
2 pathophysiological mechanisms involved in the fatal infantile encephalopathy caused by
3 *NFU1* mutations. As previously reported, these patients presented with early onset
4 neurological deterioration and a biochemical phenotype compatible with defects in
5
6 *NFU1* mutations. As previously reported, these patients presented with early onset
7 neurological deterioration and a biochemical phenotype compatible with defects in
8
9 lipolic acid dependent enzymatic activities. *NFU1* gene encodes for a conserved protein
10 suggested to participate in Fe-S cluster biogenesis (Navarro-Sastre etl 2011, Cameron et
11 al 2011). However, the exact role of *NFU1* has not been completely understood until
12
13 *NFU1* disease-causing mutations have been discovered to be associated with that
14 particular phenotype (Navarro-Sastre et al 2011, Cameron et al 2011). These findings
15 and the subsequent functional analyses pointed to the role of *NFU1* as a late acting
16 factor involved in Fe-S cluster delivery and maturation of a subset of mitochondrial
17 proteins, including several subunits of the respiratory chain complexes and LAS
18 (Navarro-Sastre et al 2011, Cameron et al 2011, Lill et al 2012, Rouault 2012).

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Until now only two studies identified patients with mutations in this gene (Navarro-Sastre et al 2011, Cameron et al 2011). One of these studies was performed by our group and reported on nine patients carrying a homozygous *NFU1* missense mutation (c.622G>T, p.Gly208Cys) and one additional patient who was compound heterozygous for this and an additional splice site mutation (c.545+5G>A) that generates an unstable transcript with a premature termination codon (Navarro-Sastre et al 2011). A parallel study by another group (Cameron et al 2011) identified a homozygous *NFU1* null mutation (c.545G>A) generating an aberrant splicing in three siblings. Phenotypically the disease was similar to that of our patients, but with a more severe presentation in the neonatal period, that led to death before 1 month of life (Seyda et al 2001, Cameron et al 2011).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

To better understand the molecular bases of this disease we have analyzed the levels lipoylated E2 subunits of PDH and KGHD complexes in fibroblasts and tissues from homozygous and compound heterozygous patients with *NFU1* mutations. Because respiratory chain complexes I, II and III have components that contain Fe-S, we have also studied the levels of several subunits from these multienzymatic complexes including the iron-sulfur proteins SDHB and UQCRFS1 from complex II and III, respectively.

In agreement to previous observations in fibroblasts carrying *NFU1* null mutations (Cameron et al 2011), our results showed almost complete absence of lipoiic acid bound to E2 subunits of PDH and KGDH complexes (Fig. 1). However, when analysing the respiratory chain subunits, both results differ because our patients with missense mutations (showing normal levels of *NFU1*) have decreased amounts of both subunits (SDHA and SDHB) of complex II (Fig. 1), while patients with null mutations (showing absence of *NFU1*) had decreased levels not only of the subunits of complex II but also of NDUFA9 (complex I) and UQCRFS1 (complex III) (Cameron et al 2011). This suggests a possible role of *NFU1* both in the delivery of Fe-S clusters and also in the stability of some complexes of the respiratory chain. These observations fit well with the BN-PAGE results in muscle of one of our patients carrying *NFU1* missense mutations (Fig. 4C) that showed defective assembly of complex II, but not of complexes I and III.

Because missense and null *NFU1* mutants had shown different behavior in terms of molecular phenotype, we analyzed precisely *NFU1* protein levels by western blot in patient P1 carrying the common missense mutation and a splice site mutation that generates a transcript with a PTC which is not expressed (Navarro-Sastre et al 2011). Our results showed that *NFU1* is expressed over 60 % of the levels found in controls. Moreover, the expression profile of respiratory chain proteins detected was exactly the

1
2
3 same as in patients homozygous for the common mutation, suggesting that the levels of
4 NFU1 in the compound heterozygous patient may be enough to overcome the loss of
5 expression of the allele with the premature termination codon (Fig. 2).

6
7 To our knowledge NFU1 protein expression has not been accurately determined in
8 humans and its regulation remains to be elucidated. Only two studies documented the
9 expression profile of NFU1 mRNA by northern blot in human and mouse tissues
10 (Ganesh et al 2003, Lorain et al, 2001). To further understand the regulation of NFU1 in
11 human tissues as well as the requirement of NFU1 for protein lipoylation in
12 physiological conditions we analyzed the expression levels of NFU1 and protein bound
13 lipoic acid in a series of human control tissues (Fig.3). Our results showed that the
14 expression of NFU1 and of lipoylated proteins correlated with the levels of the
15 UQCRC2 and citrate synthase activity (Fig. 3). These results complement previous
16 observations made in human and mouse tissues by providing further evidence of the
17 ubiquitous expression of NFU1 and they showed that the differences in several tissues
18 are mainly due to the particular mitochondrial content of each tissue rather than a tissue-
19 specific regulation of NFU1 expression.

20
21 With the aim to further extending the knowledge of the mitochondrial dysfunction
22 caused by NFU1 disruption we performed similar studies in a series of available tissues
23 from patients. Results showed that lipoylated E2 subunits of PDH and KGDH
24 complexes were clearly reduced in patients' liver (Fig.4A) and muscle (Fig.4B) but
25 were unchanged in brain, kidney and lung. This suggests that proteins other than NFU1
26 may be involved in Fe-S cluster delivery to LAS in these tissues where they compensate
27 for the NFU1 deficiency in a tissue-specific manner (Fig. 4A-B). To this effect, it has
28 recently been reported that other proteins involved in Fe-S cluster biogenesis such as
29 NDUFAB1, IBA57, ISCA1 and ISCA2 are necessary for lipoic acid biosynthesis since
30 cell lines depleted of these proteins showed a strong reduction of protein-bound lipoic
31

1 acid (Muhlenhoff et al 2011, Gelling et al 2008, Song et al 2009, Shefel et al 2012,
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

acid (Muhlenhoff et al 2011, Gelling et al 2008, Song et al 2009, Shefel et al 2012, Feng et al 2009). In contrast to fibroblasts none of the subunits of the mitochondrial respiratory chain, including SDHA and SDHB subunits, were altered in the pathological tissues analyzed (Fig. 4A-B). However, the respiratory chain activities in frozen muscle from two of these patients had consistently reduced complex II activity (Navarro-Sastre et al 2011) and BN-PAGE performed in muscle from one of them demonstrated decreased amounts of fully assembled complex II, but normal complex I and III (Fig. 4C). These observations, together with the fact that the *NFU1* p.Gly208Cys mutation impairs the transfer of Fe-S cluster to target apoproteins, support the proposed role of *NFU1* in the delivery of Fe-S cluster to SDHB subunit of complex II (Navarro-Sastre et al 2011).

Another issue not yet clarified is why patients carrying missense mutations in *NFU1* are able to bypass the requirement for full *NFU1* function during the first months of life, as they don't show any symptoms until at least 1 month of age (Navarro-Sastre et al 2011), while patients carrying *NFU1* null mutations presented symptoms during the first days of life and died before one month after birth (Seyda et al 2001, Cameron et al 2011). To address this question we studied age-related *NFU1* expression in muscle tissue from control individuals. Interestingly, *NFU1* protein levels seem to be higher in the first's months of life suggesting that *NFU1* protein functions might be specially required during the early neonatal period (Fig. 5). These observations fit well with a previous study that showed higher *NFU1* mRNA levels in fetal tissues in comparison to their corresponding adult counterparts (Lorain et al 2001). Our results provide a possible explanation why *NFU1* null mutant patients developed symptoms immediately after birth while patients with less severe *NFU1* missense mutations presented later in infancy (Navarro-Sastre et al 2011).

In summary, this study provides new insights into the molecular bases of NFU1 disease as well into the regulation of NFU1 protein in human tissues. Our results demonstrated a ubiquitous expression of human NFU1 protein and further suggest that defects in lipoic acid biosynthesis and complex II are the main molecular signatures of this disease, particularly in patients carrying the p.Gly208Cys mutation. Finally, our observations strongly recommend the analysis of these protein markers in fibroblasts as the first molecular approach to adequately diagnose this disease.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

- 1
2 Abramoff M.D, Magalhães, Paulo J, Ram, Sunanda J (2004) Image processing with
3 ImageJ. *Biophotonics international* 11(7): 36-42
4
- 5 Beinert H (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol*
6 *Inorg Chem* 5(1):2-15.
7
- 8
9 Booker SJ, Cicchillo RM, Grove TL (2007) Self-sacrifice in radical S-
10 adenosylmethionine proteins. *Curr Opin Chem Biol* 11(5):543-52
11
- 12 Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V et al (2011) Mutations in iron-sulfur cluster
13 scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain
14 and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am J Hum Genet* 7;89(4):486-95.
15
- 16
17 Feng D, Witkowski A, Smith S. (2009) Down-regulation of mitochondrial acyl carrier
18 protein in mammalian cells compromises protein lipoylation and respiratory complex I
19 and results in cell death. *J Biol Chem* 24;284(17): 11436-45.
20
- 21
22 Ganesh S, Tsurutani N, Suzuki T, et al (2003) The Lafora disease gene product laforin
23 interacts with HIRIP5, a phylogenetically conserved protein containing a NiU-like
24 domain. *Hum Mol Genet* 15;12(18):2359-68.
25
- 26
27 Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Mühlenhoff U. (2008) Mitochondrial Iba57p
28 is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM
29 enzymes. *Mol Cell Biol* 28(5):1851-61.
30
- 31
32 Haack TB, Rolinski B, Haberberger B, et al. (2012) Homozygous missense mutation in
33 BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *J Inherit*
34 *Metab Dis* 5.
35
- 36
37 Hiltunen JK, Autio KJ, Schonauer MS, Kursu VA, Dieckmann CL, Kastaniotis AJ.
38 (2010) Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochim Biophys Acta*
39 1797(6-7):1195-202.
40
- 41
42 Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. (2005) Structure, function, and
43 formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74:247-81.
44
- 45
46 Lill R, Hoffmann B, Molik S, et al (2012) The role of mitochondria in cellular iron-
47 sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823(9):1491-
48 508.
49
- 50
51 Lorain S, Lécluse Y, Scamps C, Mattéi MG, Lipinski M. (2001) Identification of human
52 and mouse HIRA-interacting protein-5 (HIRIP5), two mammalian representatives in a
53 family of phylogenetically conserved proteins with a role in the biogenesis of Fe/S
54 proteins. *Biochim Biophys Acta* 16;1517(3):376-83
55
- 56
57 Mayr JA, Zimmermann FA, Fauth C, et al (2011) Lipoic acid synthetase deficiency
58 causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine
59 elevation. *Am J Hum Genet* 9;89(6):792-7.
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Mayr JA, Freisinger P, Schlachter K, et al (2011) Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway. *9;89(6):806-12.*

Mühlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R. (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem 2;286(48):41205-16.*

Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O et al (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFX1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J Hum Genet 11;89(5):656-67.*

Quinzii CM, Hirano M. Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans (2011) *Biofactors 37(5):361-5.*

Rouault TA (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech. 5(2):155-64.*

Seyda A, Newbold RF, Hudson TJ, et al (2001) A novel syndrome affecting multiple mitochondrial functions, located by microcell-mediated transfer to chromosome 2p14-2p13. *Am J Hum Genet 68(2):386-96.*

Sheffel AD, Wilbrecht C, Stehling O, et al (2012) The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell 23(7):1157-66.*

Song D, Tu Z, Lee FS. (2009) Human ISCA1 interacts with IOPI/NARFL and functions in both cytosolic and mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem 18;284(51):35297-307.*

Wittig I, Braun HP, Schägger H (2006). Blue native PAGE. *Nature protocols, 1(1), 18–28.*

Ylikallio E, Suomalainen A (2012) Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med 44(1):41-59.*

FIGURE LEGENDS

1 **Fig. 1** Protein expression analysis in fibroblasts from patients carrying *NFU1* mutations.
2
3 Expression of E2-PDH and E2-KGDH-bound lipoic acid (LA) and respiratory chain
4 subunits in *NFU1* mutant and control fibroblasts. NDUFA9 (complex I), SDHA and
5 SDHB (complex II), UQCRC2 and UQCRFS1 (complex III) and ATP5A (complex V).
6 GAPDH was used as a loading control. Asterisks indicate subunits containing Fe-S
7 clusters. C1-C2, control individuals; P, patients. P1 is compound heterozygous for the
8 c.622C>T and the c.545+5G>A mutations. P2 and P3 are homozygous for the
9 c.622C>T substitution.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Fig. 2** *NFU1* protein expression levels in a compound heterozygous patient. GAPDH
25 and UQCRC2 were used as loading controls. Protein expression levels were quantified
26 using the densitometry program IMAGEJ. P1 is compound heterozygous for the
27 c.622C>T and the c.545+5G>A mutations; RU, relative units.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Fig. 3** *NFU1* protein is ubiquitously expressed and is associated with mitochondrial
40 content in human tissues. *NFU1*, E2-PDH and E2-KGHD-bound lipoic acid (LA) and
41 the mitochondrial marker UQCRC2 were analyzed by western blot in protein extracts
42 from control tissues. Protein levels were estimated using the densitometry software
43 IMAGEJ. All values were normalized against GAPDH. CS, citrate synthase activity
44 (nmol/min x mg prot); RU, relative units.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 **Fig. 4** Protein expression analysis in tissues of patients carrying *NFU1* mutations and
58 control individuals. (a) Expression of lipoic acid (LA) bound to PDH and KGDH E2
59
60
61
62
63
64
65

1 subunits and respiratory chain complexes subunits in *NFU1* patients and control tissues
2 from brain, liver, kidney, lung and (b) muscle. *NDUFA9* (complex I), *SDHA* and
3 *SDHB* (complex II), *UQCRC2* and *UQCRC1* (complex III) and *ATP5A* (complex V).
4 *GAPDH* was used as a loading control. (c) BN-PAGE analysis in muscle tissue from a
5 *NFU1* patient. Anti-*NDUFA9*, *SDHA* and *UQCRC2* antibodies were used. Asterisks
6 indicate subunits containing Fe-S clusters. C, control individuals; P, patients. P1 is
7 compound heterozygous for the c.622C>T and the c.545+5G>A mutations. P3-P7 are
8 homozygous for the c.622C>T *NFU1* mutation.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Fig. 5** Age-related *NFU1* protein expression in muscle tissue. *GAPDH* was used as a
23 loading control. Protein expression levels were quantified using the densitometry
24 program IMAGEJ. d, days; m, months; y, years.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table

[Click here to download Table: Table1.doc](#)

Table 1. Biological samples used in this study

Patient	Genotype	Effect on protein	Available tissues
P1	c.622C>T/ c.545+5G>A	p.Gly208Cys/PTC [*]	Fibroblast, lung
P2	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Fibroblast
P3	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Fibroblast, kidney, brain
P4	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Liver
P5	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Muscle
P6	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Muscle
P7	c.622C>T/ c.622C>T	p.Gly208Cys	Muscle

^{*} The c.545+5G>A mutation generates a transcript with a premature termination codon (PTC) which is likely degraded by non-sense mediated mRNA decay (Navarro-Sastre et al 2011).

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

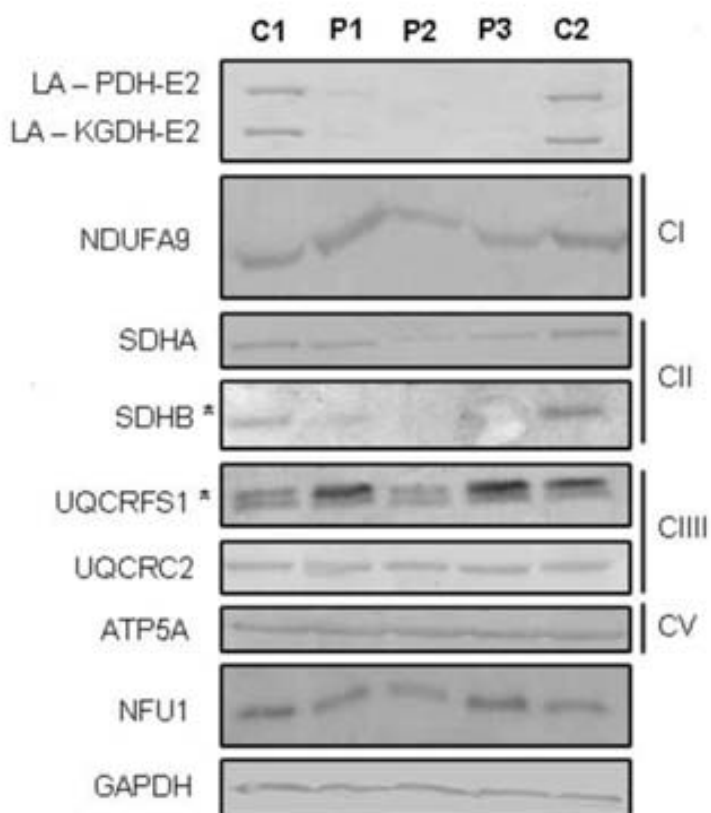
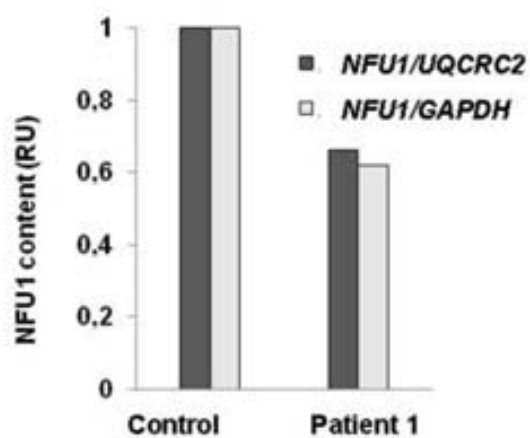
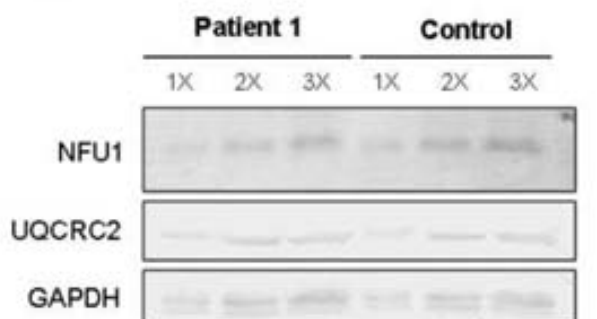
Fig. 1

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Fig. 2



	NFU1/UQCRC2	NFU1/GAPDH
Control	1	1
Patient 1	0.7	0.6

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Fig. 3

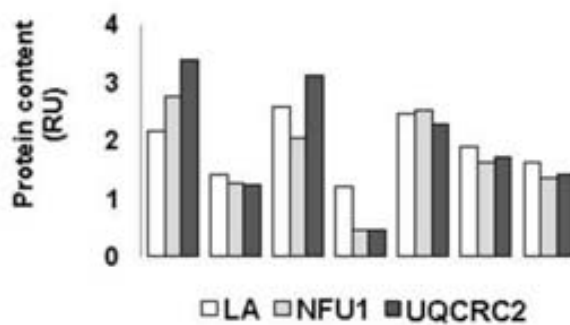
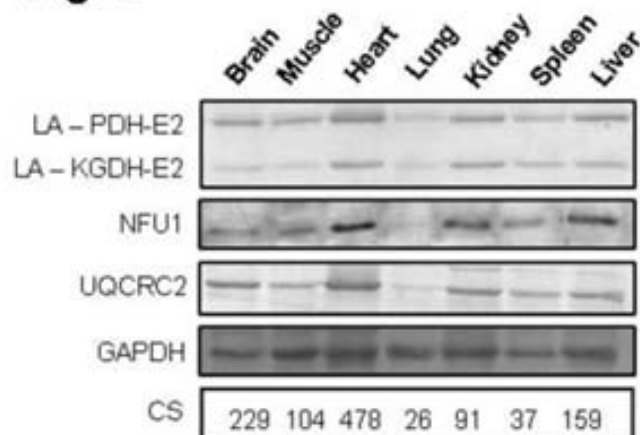


Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Fig. 4

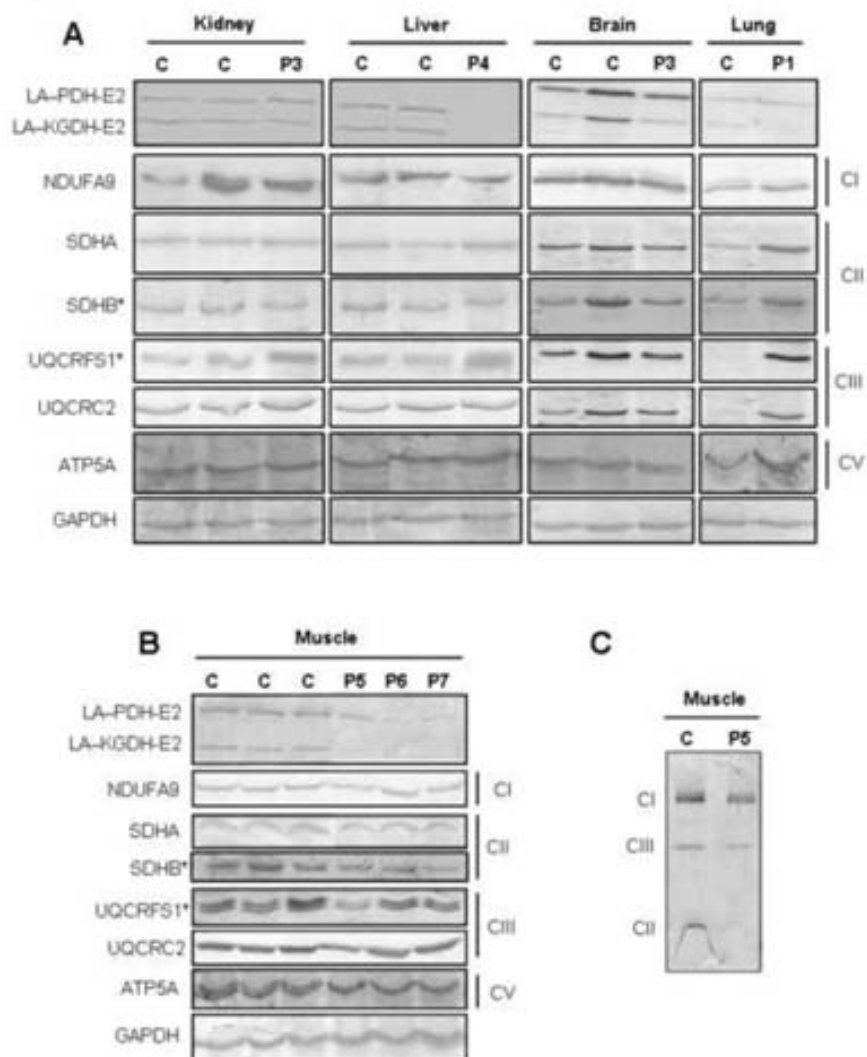


Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Fig. 5

