

TESIS DE LA UNIVERSIDAD  
DE ZARAGOZA

2023

230

Javier Amezcua Gil

Patogenicidad de variantes  
genéticas nucleares con  
implicación en el metabolismo del  
RNA mitocondrial

Director/es

Bayona Bafaluy, María Pilar  
Montoya Villarroya, Julio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad  
Universidad Zaragoza

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**PATOGENICIDAD DE VARIANTES GENÉTICAS  
NUCLEARES CON IMPLICACIÓN EN EL  
METABOLISMO DEL RNA MITOCONDRIAL**

Autor

**Javier Amezcua Gil**

Director/es

Bayona Bafaluy, María Pilar  
Montoya Villarroya, Julio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2023







**Universidad  
Zaragoza**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

# **Patogenicidad de variantes genéticas nucleares con implicación en el metabolismo del RNA mitocondrial**

Memoria de la Tesis Doctoral presentada por

**Javier Amezcua Gil**

Graduado en Biotecnología

para optar al Grado de Doctor

Dirigida por los Doctores

M<sup>a</sup> Pilar Bayona Bafaluy y Julio Montoya Villarroya

Zaragoza, marzo de 2023





Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular  
**Universidad Zaragoza**

**Dña. M<sup>a</sup> PILAR BAYONA BAFALUY**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

y

**D. JULIO MONTOYA VILLARROYA**, Catedrático Emérito del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

**CERTIFICAN:**

Que **D. Javier Amezcua Gil** ha realizado la Tesis Doctoral que lleva por título ***“Patogenicidad de variantes genéticas nucleares con implicación en el metabolismo del RNA mitocondrial”*** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela, y que ésta se ajusta al proyecto de tesis y reúne, a su juicio, las condiciones para optar al grado de doctor.

Zaragoza, marzo de 2023

Fdo.: M<sup>a</sup> Pilar Bayona Bafaluy

Fdo.: Julio Montoya Villarroya



Este trabajo ha sido realizado con un contrato de personal investigador predoctoral en formación para el periodo 2018-2022 del Gobierno de Aragón, cofinanciado por el Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020, así como con las subvenciones del Instituto de Salud Carlos III (PI17/00021 y PI21/00229); Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33\_20R, FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”); convenio de colaboración entre la Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI) y la Universidad de Zaragoza; Fundación Mutua Madrileña (2017 y 2021); programa de *crowdfunding* Precipita-FECYT (PR194).



Parte del contenido de la presente tesis doctoral ha sido expuesto en los siguientes seminarios y congresos:

- *IX International Conference BIFI 2020*. Zaragoza (España), febrero de 2020.
- *Mitocondrias y enfermedades mitocondriales*. Zaragoza (España), abril de 2021 y 2022.
- *43<sup>rd</sup> Annual Meeting of SEBBM*. Barcelona (España), julio de 2021.

Durante la realización de la presente tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos científicos:

Emperador, S., Garrido-Pérez, N., Amezcua-Gil, J., Gaudó, P., Andrés-Sanz, J.A., Yubero, D., ... Bayona-Bafaluy, M.P. Molecular characterization of new FBXL4 mutations in patients with mtDNA depletion syndrome. *Frontiers in Genetics*, 10(1300), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01300>





# **AGRADECIMIENTOS**

---



“El paso feliz que tus andares dan, que tu sonrisa provoca y que tus ojos iluminan”. Así finaliza uno de los textos que escribí en mi tierna adolescencia, intentando expresar todo lo que sentía con el noble arte de la escritura: con la comunicación, el lenguaje, las palabras, esa arma tan poderosa que tenemos y con la que podemos marcar la diferencia, podemos hacer el bien. Ahora, tras estar finalizando esta etapa de mi vida y escribir estas líneas, vuelvo a sentirme como por aquel entonces y una frase poderosa de Ortega y Gasset viene a mi mente: “yo soy yo y mi circunstancia”. A esa “circunstancia”, que no ha sido una, sino múltiple, es a lo que quiero dedicar este espacio más personal. Quiero agradecerle su existencia y su asistencia en el camino para que mi “yo” perseverase, siguiera avanzando y, en definitiva, haya podido culminar esta gran carrera de fondo que supone el desarrollo de una tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a todo el grupo de investigación *Biogénesis y patología mitocondrial*, tanto a sus miembros pasados como actuales, por haberme acogido desde el principio, desde que finalizaba la carrera y daba mis primeros pasitos en la ciencia. Han sido muchos años, marcados con diversas experiencias, que han derivado en una evolución tanto personal como profesional. Por parte de la Facultad de Ciencias, a **Paula** por todo su apoyo, arrojo y energía (has sido una compañera inspiradora); a **Nuria** por los ánimos, los fardelejos y todas nuestras conversaciones sobre la vida, en general, y la educación, en particular (le deseo lo mejor a Oliver); a **Patricia** por estar siempre dispuesta a escuchar y echar una mano (y por haberme cedido tu espacio en el laboratorio); a **Laura**, la incorporación predoctoral más reciente, le mando toda la fuerza y ánimo con su tesis (¡Somos el ejemplo de que el mundo es un pañuelo!); a **Irene**, quien fue una alumna ejemplar y a la que espero que le vaya todo bien. Por parte de la Facultad de Veterinaria, gracias a todos por el trato que me habéis dado en todo momento: a **Alba, Alejandro, Ana, Carmen, David, Eldris, Ester, Irene, Laura, Mouna y Sonia** (y, al margen del grupo, pero en el mismo contexto, también a **Ana Cris, Javi, Luis y Tania**). Con especial mención a **Ana**, por su locura y espontaneidad contagiosas y, junto a **Eldris**, por nuestra experiencia y graduación en la síntesis de proteínas mitocondriales; a **Ester** por todo su buen hacer, su conocimiento y su implicación; a **Sonia** por haber sido un punto luminoso para mí cuando más lo necesitaba. Finalmente, y no por ello menos importante, a **Eduardo**, por su experiencia, humildad y pasión por la ciencia, y a mis directores de tesis, **Julio y Pilar**, por su guía y sabiduría inestimables. En particular, **Pilar**, te agradezco en gran medida muchos aspectos: la confianza que siempre has depositado en mí, el respeto, las buenas palabras, todas tus ideas, nuestros momentos de lucidez y de desesperanza y, en definitiva, toda tu predisposición a ayudarme.

Fuera del grupo, pero continuando con el ámbito científico y académico, mis siguientes agradecimientos son para todo el personal del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, mi segunda casa durante todos estos años: compañeros, profesores, personal administrativo, técnicos y personal de limpieza. Para mí todos somos piezas de un mismo engranaje que va girando continuamente hacia un camino lleno de incertidumbre, pero que, como la vida, puede ser maravilloso. Agradezco la oportunidad de haber formado parte de ese mecanismo y haber aprendido de él. Gracias a las limpiadoras **M<sup>a</sup> José y Piluca** (quién iba a decir que a raíz de la pandemia podría formarse una conexión tan agradable como la que establecimos); a **Ester, Fina, Ismael, Manoli, Maribí y Pili** por toda la labor técnica y de gestión que realizaron o siguen llevando a cabo en el departamento; a **Irene y M<sup>a</sup> José**, técnicos del Servicio de secuenciación del CIBA, por toda la ayuda prestada para poder realizar qPCR (en que

incluyo a **Ana, Judith, Marc, Pili Mozas y Reyes**) y por el lazo tan especial que creamos desde el principio (lo que Él promete, Él lo cumple); a **Marta Fajés** por su amabilidad, serenidad y por su gran labor administrativa; a las profesoras **M<sup>a</sup> Ángeles Álava y M<sup>a</sup> José Villacampa** por avivar el interés innato en mí por lo desconocido, las buenas prácticas y, ya durante la tesis, haberme dado la oportunidad de impartir seminarios y expandir mi interés en la enseñanza; a **Fermín Lampreave** por sus consejos durante mi colaboración en las prácticas de laboratorio y su entusiasmo palpable por las glicoproteínas; a **Eva Latorre** por los piques, compartir batallitas y las ganas de enseñar; a **Raquel Moreno** (junto a los chicos que han pasado por su ala, con mención especial para **María, Natanel y Soraya**) y a **Patricio Fernández** por el buen ambiente que generan y su trabajo constante: sois unos científicos admirables y espero que sigáis teniendo éxitos; a **Marta Martínez** y, de nuevo, a **Pili Mozas** por su cercanía en las conversaciones compartidas durante las comidas.

En cuanto a mis compañeros del departamento, gracias a todos por haber formado parte de esta aventura, tanto dentro como fuera del laboratorio, y tanto a los que ya se fueron como a los más recientes. Os deseo de corazón mucho éxito en vuestros respectivos proyectos y tesis. De mi pasillo, gracias a **Andrea** (eres la personificación de la educación y el saber estar, no pierdas nunca tu positivismo), **Cristina, Ernesto, Helena** (guardo con especial cariño toda tu orientación sobre la bioinformática en un momento clave para mí), **Irene** (todo un gusto haber hablado contigo sobre *anime* y otras *frikadas*), **Jorge** (trabajador de los pies a la cabeza, estoy convencido de que tu esfuerzo se verá recompensado), **Juanjo, Maribel** (me llevo conmigo la anécdota del taladro y todas las risas), **Martha** (echaré de menos tus palabras tan bonitas, ya sabes), **Nerea** (posiblemente una de las personas del departamento con las que más me he sentido identificado. ¡Ánimo que ya nos queda poco a los dos!), **Olga** (gracias por todas las experiencias vividas y compartidas), **Patricia, Ritwik, Sandra, Silvia y Tony** (la próxima vez que nos veamos...). Del otro pasillo a **Ana, Chantal** (siempre con una sonrisa, tienes una cultura y unas dotes culinarias dignas de alabar), **Evelyn, Joaquín** (un placer haber conocido a un Hufflepluff orgulloso de serlo), **Laura, Manu** (*tempus fugit*. Nos conocimos en el Máster y henos aquí: ¡ya casi doctores!), **Nelly, Patricia, Pilar, Raquel y Ruth** (transmites mucha implicación e intensidad en todo lo que haces. No pierdas tu naturalidad y sigue apuntando a lo más alto). Finalmente, destacar a **Andrea Benedí y David Giraldos**, con quienes he compartido numerosos pensamientos, sensaciones e inquietudes, tanto sobre nuestro pasado, presente como futuro. Ha sido un verdadero estímulo haber coincidido académicamente una vez más con vosotros en esta etapa. En especial, **David**, me quedo con todo lo que hemos compartido sobre *hobbies*, lo que nos hemos ido abriendo el uno con el otro (hasta el punto de repetir conversaciones, aunque nunca llegaré a saber de dónde sacaste la sogá), con las dos victorias seguidas del Torneo Navideño de Guiñote y con la creación, junto a **Gabriel**, de las fabulosas Barlimpiadas.

Precisamente, junto a **Helena, Andrea Benedí y David Giraldos**, no podía dejarme al resto de mis amigos de la carrera, a los demás *Biosexyomics*: **Ángela, Dani, David Martínez, Edu, Jessica, María, Patri, Iratxe, Isa y Vero**. Conocerlos a todos para mí supuso un auténtico soplo de aire fresco, unas personas con las que sentía que compartía un mismo fondo de autenticidad. La distancia ha hecho que algunas de nuestras uniones macromoleculares se pierdan, pero nuestros enlaces siguen siendo covalentes y espero que continuemos reuniéndonos de vez en cuando todos los que podamos y pasándolo en grande (¡Tenemos pendiente un paso de tesis y un viaje!). Especialmente, gracias, **Edu**, señor Ruiz, el clon del que me separaron al nacer, y no

por el físico, sino por el interior: desde que te conozco tengo la seguridad de que si alguna vez necesito de verdad a alguien vas a estar ahí, de la misma manera que sabes que yo lo estaré para ti. Gracias, **María**, mi terremotillo favorito, pensar en ti y estar contigo es sinónimo de bienestar, de dulzura, de comprensión y, sobre todo, de fe en la humanidad, de fe en que existen las buenas personas. Gracias, **Isa** por toda tu fuerza, sensatez y paciencia (y por llevarme a todas partes). Como nos gusta decir, ambos formamos un auténtico *pack* y no albergo dudas de que, en caso de abrirse, la pastelería Valero arrasará con todo.

Y, como de amigos va el asunto, tampoco puedo olvidarme a los de toda la vida: gracias a **Alicia**, **Don Álvaro**, **Ana**, **Dani**, **JM** y al gran **Vittorio di Mare**. Os agradezco enormemente que sigamos teniéndonos en cuenta, generando buenos momentos y, en particular durante la tesis, todo lo que me habéis permitido desconectar. Como suelen decir **Alicia** y **JM**, formamos un grupo tremendamente variopinto y, añadido, que bien podríamos ser el comienzo de un chiste malo o de una obra maestra: “la periodista, el matemático, la jefa de tienda, el *game master*, el emprendedor, el médico y un servidor: el biotecnólogo”. A veces, hasta puede resultar difícil entender cómo nos hemos mantenido, pero precisamente tal vez sea por esa diversidad y porque nos une un pasado y un presente lleno experiencias y bromas que sólo entendemos entre nosotros. Espero que sigamos así mucho, mucho tiempo. Para mí constituís uno de los círculos más importantes en mi vida.

Para acabar, mis últimos agradecimientos van a mi familia, en general, y a mi núcleo familiar, en particular: **papá**, **mamá** y **mi Mar**. Escribir todo esto me ha puesto sensible y ahora mismo estoy llorando, si bien tampoco voy a comentar nada que no sepáis ya: sois mi pilar y mi mayor fortaleza para continuar. **Papá**, gracias por todo, por absolutamente todo: por la vida que nos has dado, por la educación, la disciplina, el trabajo duro, las risas, las metas, la visión de la vida... constituimos un auténtico dúo dinámico. **Mamá**, de ti he heredado mi carácter y mi manera de ser, así que en cierto modo dirigirme a ti es como si me hablara a mí mismo: gracias por tu sencillez, por tu honradez, por tratar de ver el lado bueno de las cosas, por caerte y volver a levantarte y por todo el cariño y alegría que desprendes tanto hacia mí como hacia los demás. Y, como no podía ser de otra manera, finalizo con **mi Mar**. Puedes experimentar tempestades que arrasen con todo, pero siempre llega la calma y no hay mejor lugar para navegar que tus aguas cuando eso ocurre. Con una vitalidad desbordante y una ilusión contagiosa, no podría haber pedido una hermana mejor.

¡Muchas gracias a todos!

**Javier.**

**“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro.”**

**Santiago Ramón y Cajal**

(Madrid, 20 de diciembre de 1898; prólogo 2ª ed. *Los tónicos de la voluntad*)



# ÍNDICE

---





---

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>19</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>31</b>
1.1 Mitocondrias: origen, morfología, estructura y funciones .....	33
1.2 Sistema OXPHOS .....	35
1.2.1 Estructura y función .....	35
1.2.2 Modelos de organización: modelo de plasticidad .....	37
1.2.3 Producción de ROS .....	37
1.3 mtDNA.....	38
1.3.1 Características .....	38
1.3.2 Herencia materna.....	41
1.3.3 Replicación: modelo de desplazamiento de la hebra .....	42
1.4 Metabolismo del mtRNA.....	46
1.4.1 Síntesis de los mtRNA.....	47
1.4.2 TEFM.....	49
1.4.3 Procesamiento, maduración y degradación de los mtRNA.....	52
1.4.4 PNPT1/PNPasa.....	54
1.4.4.1 Estructura .....	55
1.4.4.2 Localización .....	56
1.4.4.3 Degradosoma .....	58
1.5 Enfermedades mitocondriales .....	61
1.5.1 Características generales.....	61
1.5.2 Clasificación: etiología genética .....	63
1.5.3 Diagnóstico: NGS y comprobación funcional .....	65
1.5.4 Tratamientos .....	67
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	<b>71</b>
2.1 Antecedentes .....	73
2.2 Objetivos .....	77
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>79</b>
3.1 Cultivos eucariotas .....	81
3.1.1 Células utilizadas .....	81
3.1.2 Equipos y materiales empleados.....	82
3.1.3 Mantenimiento de las células y recogida de pellets .....	82
3.1.4 Congelación y descongelación celular.....	83

3.1.5 Contaje y viabilidad celular .....	83
3.1.6 Evaluación de contaminación con <i>Mycoplasma</i> .....	84
3.1.7 Ensayo de complementación .....	85
3.1.8 Inmortalización de cultivos primarios .....	86
3.1.9 Curvas de crecimiento: tiempo de duplicación .....	87
3.2 Cultivos bacterianos .....	89
3.2.1 Bacterias, medios y placas utilizadas .....	89
3.2.2 Clonaje de productos de PCR y transformación de bacterias .....	89
3.2.3 Eficiencia de transformación .....	90
3.2.4 Selección de colonias por PCR de colonia .....	91
3.2.5 Aislamiento de los vectores bacterianos .....	91
3.2.6 Clonaje de insertos en vector lentiviral .....	92
3.2.7 Almacenamiento en gliceroles y expansión de un vector .....	93
3.3 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos .....	93
3.3.1 Extracción de RNA total .....	93
3.3.2 Eliminación de DNA en muestras de RNA total con DNasa I .....	94
3.3.3 Extracción de DNA total .....	94
3.3.4 Cuantificación de DNA y RNA total por espectrofotometría .....	95
3.3.5 Retrotranscripción de RNA .....	95
3.3.6 Diseño de primers para amplificar por PCR y secuenciar las mutaciones .....	96
3.3.7 Amplificación de DNA mediante PCR .....	98
3.3.8 Electroforesis horizontal en gel de agarosa .....	99
3.3.9 Mutagénesis dirigida .....	100
3.3.10 Estudio de primers R-loop mediante 3'-RACE .....	101
3.3.10.1 Fosforilación en 5' del <i>linker</i> .....	101
3.3.10.2 Ligación de RNA con el <i>linker</i> fosforilado en 5' .....	102
3.3.10.3 Retrotranscripción a cDNA y PCR de <i>primers R-loop</i> (3'-RACE) .....	103
3.3.10.4 Clonaje, replicación en bacterias y secuenciación .....	104
3.3.11 Secuenciación de insertos clonados y productos de PCR .....	104
3.3.12 Secuenciación del mtDNA .....	104
3.3.13 Análisis de niveles de transcritos por qPCR .....	107
3.3.13.1 SYBR Green .....	107
3.3.13.2 Sondas TaqMan® .....	109
3.3.14 Cuantificación relativa del número de copias del mtDNA .....	111

---

3.3.15 Cuantificación relativa del número de copias del 7S DNA .....	111
3.3.16 Depleción del mtDNA, mtRNA y cinética de repoblación .....	112
3.3.17 RNA-seq.....	113
3.4 Técnicas de manipulación de proteínas.....	114
3.4.1 Extracción de proteínas totales.....	114
3.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	115
3.4.3 Purificación de mitocondrias.....	115
3.4.4 Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.....	117
3.4.4.1 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	117
3.4.4.2 Electrotransferencia de proteínas a una membrana de PVDF.....	118
3.4.4.3 Incubación con anticuerpos y detección quimioluminiscente.....	119
3.4.4.4 Reutilización de las membranas.....	120
3.4.5 Localización intramitocondrial de proteínas.....	121
3.4.5.1 Separación de las proteínas mitocondriales solubles y de membrana.....	121
3.4.5.2 Tratamiento de mitocondrias con tripsina y digitonina.....	122
3.4.6 Estudio de complejos mitocondriales con BN-PAGE.....	122
3.4.6.1 BN-PAGE 1D.....	123
3.4.6.2 BN-PAGE 2D.....	124
3.5 Ensayos funcionales del sistema OXPHOS .....	125
3.5.1 Medida de los niveles de ATP mitocondrial .....	125
3.5.2 Medida de las actividades del CIV y la CS por espectrofotometría.....	126
3.5.2.1 Actividad del CIV .....	127
3.5.2.2 Actividad de la CS .....	127
3.5.3 Síntesis de proteínas mitocondriales .....	128
3.5.3.1 Preparación de las muestras: síntesis <i>in vivo</i> .....	128
3.5.3.2 Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida .....	128
3.5.3.3 Tinción del gel, desteñido, rehidratación y escaneo.....	130
3.5.3.4. Secado del gel, revelado de resultados y análisis .....	130
3.5.4 Evaluación del consumo de oxígeno basal de células en cultivo .....	131
3.6 Estudio de los niveles de serotonina.....	132
3.7 Aplicaciones bioinformáticas .....	133
3.8 Análisis estadístico y diseño gráfico .....	134
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
4.1 PNPasa.....	137
4.1.1 Confirmación de la presencia de las variantes en fibroblastos del paciente.....	137

4.1.2	Análisis bioinformático: predicción de la patología .....	138
4.1.3	Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de PNPT1.....	139
4.1.4	Análisis de la replicación: niveles de mtDNA y 7S DNA.....	140
4.1.5	Cuantificación de los mtRNA.....	141
4.1.6	Análisis de mRNA nucleares codificantes para proteínas mitocondriales .....	142
4.1.7	Estudio de los niveles de proteínas mitocondriales.....	144
4.1.8	Crecimiento celular y estudio de la funcionalidad OXPHOS .....	145
4.1.9	Ensayo de complementación: sobreexpresión de PNPT1.....	147
4.1.10	Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de SUV3.....	148
4.1.11	Estudio de la localización intramitocondrial de la PNPasa.....	150
4.2	TEFM.....	153
4.2.1	Confirmación de la presencia de la variante en fibroblastos del paciente.....	153
4.2.2	Secuenciación del mtDNA del paciente .....	153
4.2.3	Análisis bioinformático: predicción de la patología .....	154
4.2.4	Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de TEFM .....	155
4.2.5	Análisis de la replicación: niveles de mtDNA y 7S DNA.....	156
4.2.6	Cuantificación de RNA implicados en la funcionalidad mitocondrial .....	156
4.2.7	Estudio de los niveles de proteínas mitocondriales.....	158
4.2.8	Crecimiento celular y estudio de la funcionalidad OXPHOS .....	159
4.2.9	Ensayo de complementación: sobreexpresión de TEFM, POLRMT y TEFM <sup>mut</sup> .....	161
4.2.9.1	Sobreexpresión de <i>TEFM</i> .....	161
4.2.9.2	Sobreexpresión de <i>TEFM</i> y <i>POLRMT</i> .....	163
4.2.9.3	Sobreexpresión de <i>TEFM</i> con la mutación del paciente.....	165
4.2.10	Efecto de la funcionalidad de OXPHOS sobre los niveles de serotonina .....	168
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
5.1	PNPasa.....	173
5.2	TEFM.....	180
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>189</b>
6.1	PNPasa.....	191
6.2	TEFM.....	192
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>193</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>223</b>
8.1	Vectores utilizados en este trabajo.....	225
8.1.1	pCR <sup>TM</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup> y pCR <sup>TM</sup> 4Blunt-TOPO <sup>®</sup> .....	225

---

8.1.2 pWPXLd y pLOX-Ttag-iresTK.....	225
8.1.3 pMD2.G y psPAX2.....	227
8.2 Supervivencia de fibroblastos con puromicina .....	228
8.3 Tratamiento de fibroblastos con EtBr y actinomicina D .....	229
8.4 Tratamiento de RNA total con DNasa I para eliminar DNA contaminante .....	230
8.5 Comparación entre realizar la qPCR en uno o dos pasos.....	231
8.6 Secuencia del hmtDNA y localizaciones funcionales de interés (hebra ligera).....	232
8.7 Especificidad de los <i>primers</i> para el 7S DNA .....	237
8.8 Alineamientos de la PNPasa y TEFM en 250 especies .....	239
8.9 Análisis del degradosoma mitocondrial por BN-PAGE 2D .....	241
8.10 Panel virtual de RNA-seq y las diferencias observadas en los fibroblastos (en %) .....	242
8.11 Estudio del mitotranscriptoma de fibroblastos (MitoCarta 3.0).....	244
8.12 Investigación de la patología de variantes encontradas en <i>CARS2</i> y <i>FARS2</i> .....	246
8.12.1 <i>CARS2</i> .....	246
8.12.2 <i>FARS2</i> .....	249



## **ABREVIATURAS**

---





<b>5-HIAA</b>	Ácido 5-hidroxiindolacético
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>A</b>	Amperio
<b>Å</b>	Ángstrom
<b>aARS</b>	Aminoacil-tRNA sintetasa
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ACMG/AMP</b>	Colegio americano de genética y genómica médica y Asociación de patología molecular
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>Ag/AgCl</b>	Plata/cloruro de plata
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BLAST</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales
<b>BN-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) azul nativa (BN)
<b>bp</b>	Par de bases
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CI</b>	Complejo I del sistema OXPHOS: NADH deshidrogenasa
<b>CII</b>	Complejo II del sistema OXPHOS: succinato deshidrogenasa
<b>CIII</b>	Complejo III del sistema OXPHOS: citocromo c oxidorreductasa
<b>CIV</b>	Complejo IV del sistema OXPHOS: citocromo c oxidasa
<b>CV</b>	Complejo V del sistema OXPHOS: ATP-sintasa
<b>CARS2</b>	Cisteinil-tRNA sintetasa mitocondrial
<b>CDKN1B</b>	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CDS</b>	Región de codificación de un gen
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COXPD</b>	Deficiencia de fosforilación oxidativa combinada
<b>CS</b>	Citrato sintasa
<b>CSBI</b>	Bloque de secuencias conservadas I
<b>CSBII</b>	Bloque de secuencias conservadas II
<b>CSBIII</b>	Bloque de secuencias conservadas III
<b>DAMP</b>	Patrón molecular asociado al daño
<b>DDM</b>	n-dodecil-β-D-maltósido
<b>DDX28</b>	Helicasa 28 con caja-DEAD
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DHODH</b>	Dihidrorotato deshidrogenasa
<b>DHX30</b>	Helicasa 30 con caja-DExH
<b>DMEM</b>	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNasa I</b>	Desoxirribonucleasa I
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>dsDNA</b>	DNA bicatenario
<b>dsRNA</b>	RNA bicatenario
<b>EC</b>	Complejo de elongación de la transcripción del mtDNA
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ERCC</b>	Consortio de controles de RNA externos
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de flavina y adenina reducido

<b>FARS2</b>	Fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial
<b>FASTK</b>	Serina/treonina quinasa activada por Fas
<b>FASTKD</b>	Proteína con dominio FASTK
<b>FBXL4</b>	Proteína 4 con caja-F y repeticiones ricas en leucina
<b>g</b>	Gramo
<b>GMP</b>	Guanosín monofosfato
<b>GRSF1</b>	Factor de secuencia rica en guaninas 1
<b>h</b>	Hora
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>HGVS</b>	Sociedad de variación del genoma humano
<b>HMG</b>	Grupo de alta movilidad (dominio proteico)
<b>hmtDNA</b>	mtDNA humano
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>HRP</b>	Peroxidasa del rábano picante
<b>HVA</b>	Ácido homovanílico
<b>IC</b>	Complejo de iniciación de la transcripción del mtDNA
<b>IFI27</b>	Proteína 27 inducible por IFN- $\alpha$
<b>IFI44L</b>	Proteína similar a la 44 inducible por IFN
<b>IFIT1</b>	Proteína 1 con repeticiones del tetratricopéptido inducida por IFN
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IIER</b>	Instituto de investigación de enfermedades raras (forma parte del ISCIII)
<b>IM</b>	Membrana interna
<b>IMS</b>	Espacio intermembrana
<b>ISCIII</b>	Instituto de salud Carlos III
<b>kb</b>	1 000 pb
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KCN</b>	Cianuro de potasio
<b>KO</b>	<i>Knockout</i> (inactivación génica)
<b>l</b>	Litro
<b>LB</b>	Caldo Luria
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LGG</b>	Glioma de grado bajo (grado I y II)
<b>LHON</b>	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
<b>lncRNA</b>	RNA largo no codificante
<b>LONP1</b>	Proteasa Lon mitocondrial
<b>LRPPRC</b>	Proteína mitocondrial que contiene el motivo PPR rico en leucina
<b>LSP</b>	Promotor de la cadena ligera del mtDNA
<b>MAVS</b>	Proteína mitocondrial de señalización antiviral
<b>MELAS</b>	Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular
<b>MGME1</b>	Exonucleasa 1 de mantenimiento del genoma mitocondrial
<b>MIA</b>	Ruta de importe y ensamblaje del IMS
<b>MIDD</b>	Diabetes con sordera de transmisión materna
<b>MPP</b>	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
<b>MRCA</b>	Ancstro común más reciente (matrilineal)
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MRP</b>	Proteína ribosómica mitocondrial
<b>MRPL12</b>	Proteína ribosómica mitocondrial L12 de la subunidad 39S
<b>MRPP1/TRMT10C</b>	tRNA metiltransferasa 10 homólogo C
<b>MRPP2/HSD17B10</b>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de tipo 2

<b>MRPP3/PRORP</b>	Subunidad catalítica de la ribonucleasa P mitocondrial
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>mt-dsRNA</b>	mtRNA de doble cadena
<b>MTERF</b>	Factor de terminación de la transcripción mitocondrial
<b>MTPAP</b>	Poli(A) RNA polimerasa mitocondrial
<b>MTRES1</b>	Factor de rescate de la transcripción mitocondrial 1
<b>mtRNA</b>	RNA mitocondrial (abarca los distintos tipos)
<b>mtRNasa P</b>	Ribonucleasa P mitocondrial
<b>mtSSB/SSBP1</b>	Proteína mitocondrial de unión a ssDNA
<b>MW</b>	Peso molecular
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotidamida y adenina reducido
<b>NCBI</b>	Centro nacional para la información biotecnológica (de Estados Unidos)
<b>NCR</b>	Región no codificante (del mtDNA)
<b>ncRNA</b>	RNA no codificante
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>NMD</b>	Degradación de mRNA medida por mutaciones sin sentido
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>OM</b>	Membrana interna
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa
<b>PAM</b>	Motor de importe asociado a una translocasa de presecuencia
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEO</b>	Oftalmoplejía externa progresiva
<b>PHS II</b>	<i>Phusion hot start II</i> (DNA polimerasa de alta fidelidad)
<b>Pi</b>	Grupo fosfato (fosfato inorgánico)
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PMPCA</b>	Subunidad alfa de la peptidasa de procesamiento mitocondrial
<b>PMPCB</b>	Subunidad beta de la peptidasa de procesamiento mitocondrial
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PNPasa</b>	Polinucleótido fosforilasa
<b>PNPT1</b>	Polirribonucleótido nucleotidil transferasa 1 (gen codificante para PNPasa)
<b>POLG</b>	DNA polimerasa $\gamma$ (DNA polimerasa mitocondrial humana)
<b>POLRMT</b>	RNA polimerasa mitocondrial humana
<b>Pt</b>	Platino
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RAP</b>	Dominio de unión a RNA, abundante en los apicomplejos (dominio proteico)
<b>rcf</b>	Fuerza centrífuga relativa (gravedad)
<b>rCRS</b>	Secuencia de referencia Cambridge del mtDNA revisada
<b>REXO2</b>	Oligorribonucleasa mitocondrial
<b>RIN</b>	Número de integridad del RNA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa

<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revolución por minuto
<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>RSAD2</b>	Proteína 2 que contiene el dominio radical S-adenosil metionina
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
<b>s</b>	Segundo
<b>SAM</b>	Maquinaria de clasificación y ensamblaje
<b>SAXS</b>	Dispersión de rayos X a bajo ángulo
<b>SC</b>	Supercomplejo respiratorio del sistema OXPHOS
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS)
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SIGLEC1</b>	Sialoadhesina
<b>SLIRP</b>	Proteína mitocondrial de unión a RNA y que interacciona con el SRA
<b>SOC</b>	Caldo súper óptimo con represión catabólica
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SRA</b>	Activador del RNA del receptor de esteroides (es un tipo de lncRNA con múltiples estructuras en forma de bucle tallo)
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena simple (monocatenario)
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena simple (monocatenario)
<b>SV40</b>	Virus simio 40
<b>T4 PNK</b>	T4 polinucleótido quinasa
<b>TAg</b>	Antígeno T grande
<b>TALEN</b>	Nucleasa de actividad similar a un activador de la transcripción
<b>TAS</b>	Secuencia asociada a terminación (del mtDNA)
<b>TEFM</b>	Factor de elongación de la transcripción mitocondrial
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TFAM</b>	Factor de la transcripción mitocondrial A
<b>TFB1M</b>	Factor de la transcripción mitocondrial B1
<b>TFB2M</b>	Factor de la transcripción mitocondrial B2
<b>THG1L</b>	Proteína similar a la tRNA <sup>H</sup> guanililtransferasa 1
<b>TIM</b>	Translocasa de la membrana interna
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de hibridación
<b>TOM</b>	Translocasa de la membrana externa
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>TRNT1</b>	tRNA nucleotidiltransferasa 1
<b>TRUB2</b>	Miembro 2 de la familia TruB de pseudouridina sintasas
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonia
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltio
<b>WES</b>	Secuenciación del exoma completo
<b>WGS</b>	Secuenciación del genoma completo

## **RESUMEN**

---



Las enfermedades mitocondriales son un conjunto de desórdenes metabólicos y genéticos en que, sobre todo, se encuentra comprometida la fosforilación oxidativa de las mitocondrias. Además, se caracterizan por ser enfermedades muy heterogéneas desde un punto de vista clínico y genético, influyendo en esto último el hecho de que su etiología puede residir en variantes que ocurran tanto en el mtDNA como en el nDNA. La interpretación de la patogenicidad de una variante genética es un proceso complejo que requiere de la integración de los datos clínicos, análisis bioinformáticos y estudios moleculares. En la presente tesis doctoral se han analizado los fibroblastos de dos pacientes con variantes en genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales: un primer paciente con un cuadro clínico característico de una enfermedad mitocondrial y con las variantes p.A507S (cambio de sentido) y p.K562\* (sin sentido) en *PNPT1*, encontradas en heterocigosis compuesta; un segundo paciente con una clínica que se aleja de la neuromuscular más característica de las enfermedades mitocondriales (presenta, sobre todo, una alteración del metabolismo serotoninérgico) y con la variante *de novo* p.Q346\* (sin sentido) en *TEFM*, detectada en heterocigosis.

*PNPT1* codifica para la PNPasa, proteína que actúa en forma de homotrímero y que, junto a la helicasa SUV3 constituye el degradosoma, principal complejo implicado en la degradación de los mtRNA. Los experimentos llevados a cabo en células del paciente con las variantes en este gen han permitido concluir que dichas mutaciones son patológicas y que constituyen la etiología genética de su enfermedad, ya que derivan en un déficit de la PNPasa que provoca, en última instancia, una disfuncionalidad del sistema OXPHOS. Además, se ha obtenido que la sobreexpresión de *PNPT1* es perjudicial para los fibroblastos primarios, si bien en los inmortalizados puede ser capaz de revertir el fenotipo patológico, y que una alteración en los niveles transcripcionales o proteicos de la PNPasa deriva en una regulación de dichos niveles de la helicasa SUV3. Finalmente, los resultados obtenidos han motivado la propuesta de un modelo por el que la PNPasa se encuentra localizada en la matriz mitocondrial, pero con la posibilidad de que pueda estar tanto en forma soluble como anclada por su N-terminal a la membrana interna de las mitocondrias.

*TEFM* codifica para la proteína homónima, cuya principal función descrita hasta la fecha es la de elongar la transcripción mitocondrial mediante diversos mecanismos con los que apoya a POLRMT en su función, entre los que destacan el aumento de la procesividad de la RNA polimerasa y una función anti-terminadora de la transcripción en CSBII. Los ensayos realizados en células del paciente con la variante en este gen han llevado a concluir que ésta provoca una alteración de la fosforilación oxidativa y abren las puertas a la implicación de TEFM en los mecanismos que relacionan al sistema OXPHOS con los niveles de la serotonina. Además, se ha obtenido que la sobreexpresión de *TEFM* es tóxica para los fibroblastos, ya que produce una afectación generalizada de todos los parámetros evaluados. Entre ellos, destaca un descenso drástico de la proteína TFAM, unos *primers R-loop* de tamaño insuficiente para desempeñar su función en el inicio de la replicación y una gran afectación del sistema OXPHOS. Todos estos resultados, junto a los del propio paciente, especialmente al someter a los modelos celulares de estudio a estrés con EtBr, así como los publicados por otros autores, llevan a establecer que la función de TEFM es más compleja que la descrita hasta el momento y que se encuentra condicionada por sus niveles: actúa como un sensor del metabolismo del mtDNA y mtRNA.





# **INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1 Mitocondrias<sup>1</sup>: origen, morfología, estructura y funciones

Según la teoría de la endosimbiosis, postulada por Lynn Margulis, las mitocondrias, orgánulos presentes en la mayoría de células eucariotas, surgieron a partir de la endosimbiosis entre diferentes procariotas y su evolución (Sagan, 1967). En particular, se considera que el ancestro primigenio de las mitocondrias fue una  $\alpha$ -proteobacteria, un filo de bacterias aerobias intracelulares que carecen de pared bacteriana, que se introdujo en una célula filogenéticamente relacionada con las arqueas de Asgard (Roger et al., 2017).

Las mitocondrias no se encuentran estáticas, sino que se mueven por el citoplasma mediante el citoesqueleto. Además, poseen una arquitectura dinámica, ya que pueden encontrarse aisladas o agrupadas, formando una red interconectada con el retículo endoplásmico. Esto depende, entre otros estímulos intracelulares y extracelulares, del estado energético de las células; es una adaptación bioenergética. En general, cuando se necesita una mayor cantidad de energía las mitocondrias se fusionan formando redes, mientras que al requerir una menor energía se fisionan en mitocondrias más pequeñas. Como resultado del balance entre la fusión y fisión, la morfología de las mitocondrias es heterogénea, pudiendo ser diferente tanto entre distintos tejidos como dentro de una misma célula. A este dinamismo se le añade el hecho de que las mitocondrias pueden incrementar su número mediante la biogénesis mitocondrial<sup>2</sup> o ser destruidas, en caso de estar dañadas, por un proceso conocido como mitofagia, un tipo de autofagia, poniendo así fin al ciclo de vida mitocondrial (Bereiter-Hahn & Vöth, 1994; S. R. Lee & Han, 2017; Ravanidis & Doxakis, 2020; Rusecka et al., 2018).

A pesar de estas diferencias, todas las mitocondrias poseen la misma estructura: se encuentran separadas del citoplasma celular mediante dos membranas, que son la externa (OM) y la interna (IM), entre las que se encuentra el espacio intermembrana (IMS). Además, el interior de las mitocondrias está constituido por la matriz mitocondrial y las crestas mitocondriales, que son invaginaciones de la membrana interna, es decir, hundimientos de la IM hacia la matriz (Figura 1.1). De estas crestas cabe destacar que es donde se localiza el sistema OXPHOS, cuya principal función es la producción de energía en forma de ATP, que su morfología puede variar y que son importantes desde un punto de vista bioenergético: incrementan la superficie de la IM y, por tanto, la cantidad de cadenas de transporte de electrones mitocondrial, aumentando la capacidad de producción de ATP por la fosforilación oxidativa (Enríquez, 2016).

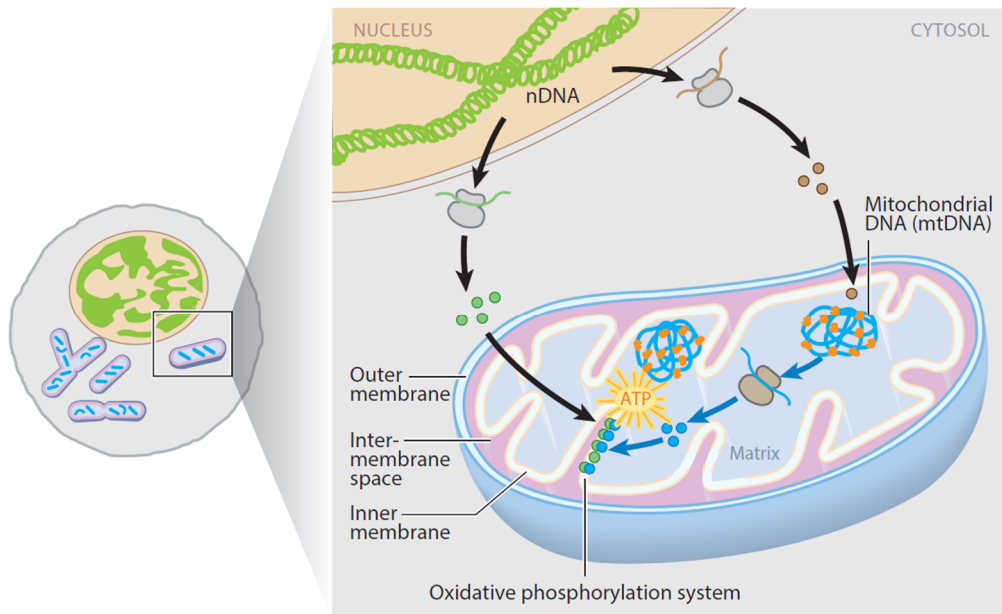
Las membranas mitocondriales se diferencian entre sí en dos puntos fundamentales: su permeabilidad al paso de iones y moléculas, siendo más impermeable la membrana interna (S. R. Lee & Han, 2017), y en las proteínas que podemos encontrar en las mismas, cambiando incluso dentro de la propia IM (Dudkina et al., 2010). Todas las proteínas localizadas en la mitocondria están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma y viajan hasta la mitocondria mediante un péptido señal (Dudek et al., 2013). La excepción la suponen las 13 proteínas codificadas en el mtDNA y que forman parte de los complejos del sistema OXPHOS. Una vez en las mitocondrias, las proteínas procedentes del citoplasma pueden integrarse en la

---

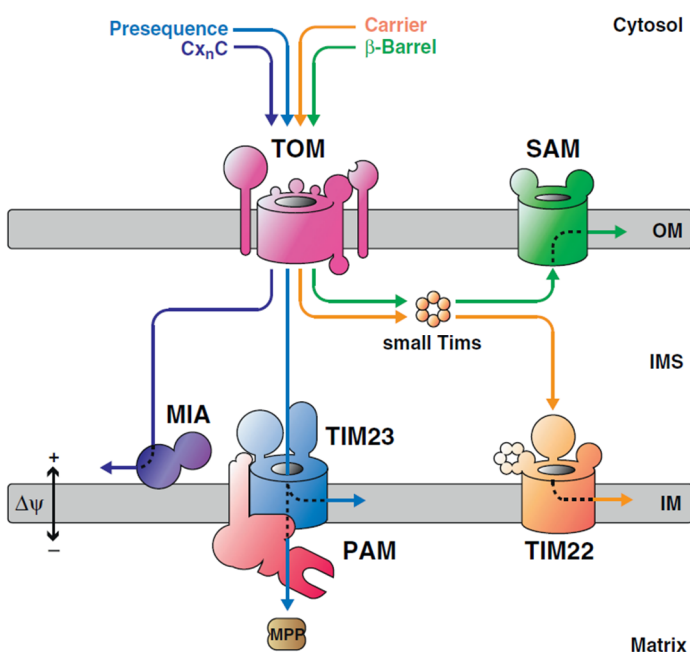
<sup>1</sup> Las características de las mitocondrias reflejadas en el presente apartado son generales, pero, sobre todo, se encuentran enfocadas en las humanas.

<sup>2</sup> En situaciones patológicas se lleva a cabo este proceso para intentar incrementar la producción de energía (Kauppila et al., 2017).

OM, la IM, quedarse en el IMS o viajar hasta la matriz. Para ello son necesarias proteínas transportadoras, translocasas, también sintetizadas en el citoplasma: entre otras, el complejo TOM (del que forman parte las proteínas Tom20 y Tom70) en la OM y los transportadores TIM22 y TIM23 en la IM (Figura 1.2).



**Figura 1.1** (Gustafsson et al., 2016). Estructura de las mitocondrias y síntesis del sistema OXPHOS. Las mitocondrias se encuentran constituidas por una membrana externa (*outer membrane*), interna (*inner membrane*), un espacio intermembrana (*intermembrane space*) y una matriz. La membrana interna tiene invaginaciones hacia la matriz mitocondrial, llamadas crestas, en que se localiza el sistema OXPHOS (*oxidative phosphorylation system*). Éste se encarga de la síntesis de ATP y está constituido por proteínas con un doble origen genético: codificadas por el nDNA, que se sintetizan en el citoplasma y viajan hasta las mitocondrias (círculos verdes); codificadas por el mtDNA y traducidas en la matriz mitocondrial (círculos azules). Además, las mitocondrias presentan una gran variedad adicional de proteínas, todas de origen nuclear, que cumple diversas funciones (círculos marrones y naranjas).



**Figura 1.2** (Dudek et al., 2013). Transporte de proteínas sintetizadas en el citosol a las mitocondrias. En general, todas las proteínas entran en las mitocondrias a través del complejo TOM, situado en la OM, y, después, toman diversos caminos, según su naturaleza. Algunos de ellos: integrarse en la OM (proteínas con estructura de barril  $\beta$ ) o en la IM (transportadores), para lo que son necesarios los complejos SAM y TIM22, respectivamente, así como las chaperonas Tims; quedarse en el IMS mediante la ruta de importe y ensamblaje MIA (proteínas con señales ricas en cisteína: C<sub>n</sub>C); viajar hasta la matriz por medio de la translocasa TIM23 y el motor PAM, en que se procesa el péptido señal de su N-terminal por la peptidasa MPP, una de las varias que se encuentran en las mitocondrias (Mossmann et al., 2012).  $\Delta\psi$ , potencial de membrana a través de la IM.

Como se ha expuesto previamente, la principal función de las mitocondrias es la obtención de energía en forma de ATP por medio del sistema OXPHOS<sup>3</sup>, un proceso que se inicia con la glucólisis en el citoplasma, continúa con el complejo piruvato deshidrogenasa en la matriz mitocondrial (transforma los piruvatos de la glucólisis en acetil-CoA) y sigue en el ciclo de Krebs, por medio del que, entre otras, se generan las moléculas con poder reductor NADH y FADH<sub>2</sub>. Finalmente, el NADH y FADH<sub>2</sub> sintetizados ingresan a la cadena de transporte de electrones, en que, en balance, por cada molécula de NADH se generan 2 de ATP y por cada molécula de FADH<sub>2</sub> 1,5 de ATP (Nelson et al., 2005). Sin embargo, la anterior no es la única función que desempeñan las mitocondrias. Entre otras, participan en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Dudek et al., 2013; Enríquez, 2016) y en la síntesis de bases pirimidínicas<sup>4</sup> (Enríquez, 2016; Pesini et al., 2014); contribuyen al envejecimiento (entre otros procesos, por medio de la producción de ROS<sup>5</sup> (Acín-Perez & Enriquez, 2014; Kauppila et al., 2017) o como consecuencia del fallo de alguna proteína mitocondrial, como la helicasa TWINKLE (Peter & Falkenberg, 2020)); tienen un papel central en la vía intrínseca de la apoptosis, con la salida del citocromo c al citosol (Liu et al., 1996), y en la regulación de la respuesta inmune innata. Esto último lo realizan, por un lado, participando en la cascada de señalización antiviral con la proteína MAVS (situada en la OM) y, por otro, bajo ciertas condiciones fisiopatológicas (daño mitocondrial y muerte celular), en que ellas mismas constituyen una fuente de estímulo del sistema inmune innato mediante la liberación al citoplasma de factores inmunogénicos, conocidos como alarminas o DAMP, entre los que se encuentran el mtDNA, el mt-dsRNA<sup>6</sup>, TFAM o el propio citocromo c (Cantó-Santos et al., 2020; Grochowska et al., 2022).

## 1.2 Sistema OXPHOS

### 1.2.1 Estructura y función

El sistema OXPHOS, también llamado cadena de transporte de electrones, es el encargado de realizar la fosforilación oxidativa (respiración celular), mediante la que genera energía en forma de ATP y consume el O<sub>2</sub> que respiramos. El sistema se encuentra formado por cinco complejos respiratorios (CI-V), constituidos a su vez por múltiples proteínas o subunidades. La composición de estos complejos hace único al sistema OXPHOS, ya que presentan un doble origen genético: 13 subunidades están codificadas en el mtDNA, mientras que el resto en el nDNA (Figuras 1.1 y 1.4; Tabla 1.1). En concreto, el CI está constituido por 45 subunidades, de las que 7 están codificadas en el mtDNA (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5* y *MT-ND6*); el CII, que participa en el ciclo de Krebs, está formado por 4 subunidades, todas ellas codificadas por el nDNA; el CIII consta de 11 subunidades, 1 de ellas codificada en el mtDNA (*MT-CYB*); el CIV tiene 13 subunidades, 3 codificadas en el mtDNA

<sup>3</sup> Sintetiza el 95 % del ATP celular (Sirey & Ponting, 2016).

<sup>4</sup> En la IM se localiza la DHODH. Esta enzima es la encargada de sintetizar orotato, que es la primera base pirimidínica y precursora de las demás. La DHODH conecta con el sistema OXPHOS, ya que es capaz de ceder a la coenzima Q los electrones que toma de la oxidación del dihidroorotato a orotato.

<sup>5</sup> Conlleva un descenso en el ensamblaje de los SC y éste a una mayor producción de ROS.

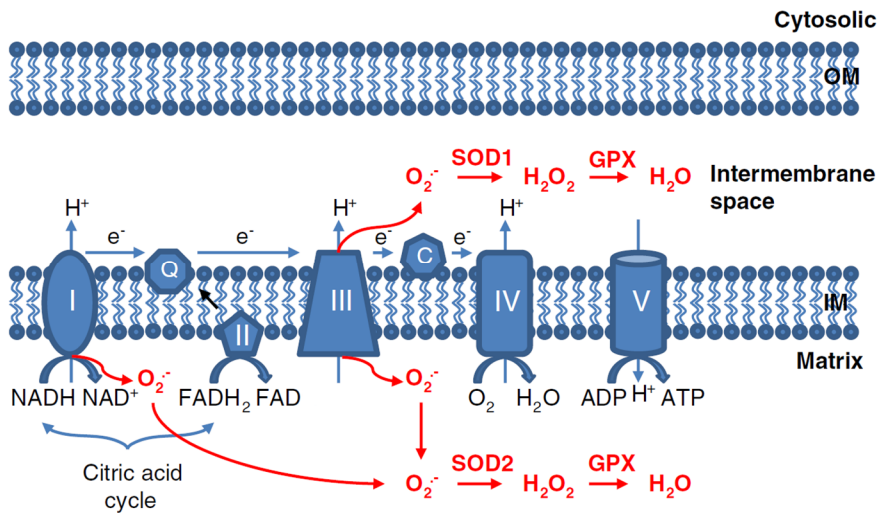
<sup>6</sup> Su síntesis puede suceder de distintas maneras, pero lo habitual es que se formen mediante la hibridación de los transcritos codificantes con sus complementarios o antisentido.

(*MT-CO1*, *MT-CO2* y *MT-CO3*); el CV está formado por 16 subunidades, 2 del mtDNA (*MT-ATP6* y *MT-ATP8*) (Montoya, 2005).

**Tabla 1.1.** Número de subunidades del sistema OXPHOS codificadas por el mtDNA y el nDNA

Genoma	CI	CII	CIII	CIV	CV	Total
mtDNA	7	0	1	3	2	13
nDNA	38	4	10	10	14	76
Total	45	4	11	13	16	89

El proceso que tiene lugar en el sistema OXPHOS se encuentra representado en la [Figura 1.3](#) y es el que sigue: se parte de NADH o FADH<sub>2</sub> (sintetizados en procesos como el ciclo de Krebs), que son oxidados a NAD<sup>+</sup> o FAD por el CI o el CII, respectivamente<sup>7</sup>. En esta primera oxidación se liberan electrones que capta la coenzima Q (molécula también conocida como coenzima Q<sub>10</sub> o ubiquinona) y se reduce. Esta molécula viaja por la IM, le cede los electrones al CIII, que a su vez se los transfiere a la proteína citocromo c para que, finalmente, este se los pase al CIV. En este complejo interviene el último aceptor de electrones, el O<sub>2</sub>, que se reduce a H<sub>2</sub>O. Paralelamente a este proceso, y aprovechando la energía liberada en la transferencia de electrones, se produce un bombeo de protones (H<sup>+</sup>) desde los complejos CI, CII y CIV al IMS, acumulándose en el mismo y, por tanto, produciéndose un doble desequilibrio químico a ambos lados de la membrana interna (se crea un potencial de membrana mitocondrial, Δψ<sub>m</sub>): de carga y de pH. Para regresar al equilibrio, los protones viajan a la matriz, pero no a través de los complejos anteriores, cuyo bombeo es sólo hacia el espacio intermembrana, sino por medio del CV. Finalmente, el CV aprovecha la energía producida por el paso de protones a favor de gradiente de concentración (fuerza motriz de protones) para sintetizar ATP a partir de la adición de un grupo fosfato (fosforilación) a una molécula de ADP<sup>8</sup> (X. Li et al., 2013).



**Figura 1.3** (X. Li et al., 2013). Fosforilación oxidativa y producción de ROS. Leer texto para más información.

<sup>7</sup> El sustrato real del CII es el succinato, al que oxida a fumarato. El FAD actúa como cofactor, reduciéndose temporalmente a FADH<sub>2</sub> para, posteriormente, ceder los electrones a la coenzima Q (Kim & Winge, 2013). Tanto en el texto como en la [Figura 1.3](#) se ha omitido esta información para simplificar el proceso.

<sup>8</sup> El tejido adiposo marrón supone una excepción, ya que en él la fuerza motriz de protones se desacopla de la síntesis de ATP y, en su lugar, se usa para la generación de calor (Enríquez, 2016).

### 1.2.2 Modelos de organización: modelo de plasticidad

La funcionalidad del sistema OXPHOS, explicada en el apartado anterior, responde al modelo fluido de organización de los complejos, esto es, que los complejos se encuentran separados entre sí. Sin embargo, existen otros dos modelos que tratan de explicar cómo se encuentra estructurado el sistema OXPHOS en las crestas mitocondriales: el modelo sólido y el modelo de plasticidad. El primero de estos modelos señala que los complejos respiratorios en realidad están unidos unos con otros formando supercomplejos o SC, mientras que el modelo de plasticidad, el último en proponerse y más aceptado actualmente, aboga por un dinamismo entre el modelo fluido y el sólido (Acín-Pérez et al., 2008; Acin-Perez & Enriquez, 2014; Enríquez, 2016). De forma muy simplificada, este modelo señala que, según las necesidades energéticas, los complejos pueden agruparse o separarse<sup>9</sup>: en células con pocas necesidades energéticas los complejos se encuentran separados, de forma que el coenzima Q y el citocromo c actúan como puentes entre los mismos (modelo fluido); en células con una mayor demanda energética los complejos se agrupan para que la cadena de transporte de electrones funcione de forma más rápida y eficiente (modelo sólido) (Greggio et al., 2017; Letts & Sazanov, 2017).

Mediante crio-microscopía electrónica y la medida de la capacidad del consumo de oxígeno de SC aislados de una BN-PAGE, entre otros ensayos, se ha demostrado tanto la existencia como la funcionalidad de los SC, respectivamente (Acín-Pérez et al., 2008; Dudkina et al., 2010; Letts & Sazanov, 2017). Además, también se ha determinado que la formación de los SC es posterior al ensamblaje de los complejos individuales (Acín-Pérez et al., 2008) y que no todos los complejos tienen la misma tendencia a agruparse entre sí: el CII no se asocia con el resto, mientras que el CI es el más inestable y dependiente de los demás, especialmente del CIII. Las asociaciones que más suelen encontrarse son CI+CIII<sub>2</sub>, CIII<sub>2</sub>+CIV y CI+CIII<sub>2</sub>+CIV. Esta última constituye el SC más grande que se ha localizado, recibe el nombre de respirasoma y, junto a la coenzima Q y al citocromo c, es capaz de transferir electrones por completo desde el NADH hasta el oxígeno (Enríquez, 2016; Lapuente-Brun et al., 2013; Letts & Sazanov, 2017).

### 1.2.3 Producción de ROS

El sistema OXPHOS también es el principal centro productor de especies reactivas de oxígeno de las células. Las ROS son moléculas pequeñas y altamente reactivas que se dividen en radicales libres y no radicales libres (Gülçin, 2012). Durante la fosforilación oxidativa puede ocurrir que, como puede verse en la Figura 1.3, en lugar de que los electrones sean aceptados por los intermediarios de la cadena (coenzima Q y citocromo c), haya una fuga de electrones en el CI (hacia la matriz) y en el CIII (hacia el IMS y hacia la matriz) y sean adquiridos por el oxígeno previamente a su llegada al CIV, dando lugar al radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y a otras ROS a partir de éste (X. Li et al., 2013; Madamanchi & Runge, 2007)<sup>10</sup>.

En situación fisiológica, las ROS participan en procesos de señalización celular, como la biogénesis mitocondrial, la adaptación a la hipoxia o la respuesta inflamatoria, esta última mediante la oxidación de ciertas cisteínas reactivas de proteínas. Sin embargo, el exceso de ROS

<sup>9</sup> Su organización responde a fuentes de carbono, ya que los SC organizan el flujo de electrones de manera que pueda optimizarse el uso de los sustratos disponibles (Acin-Perez & Enriquez, 2014; Lapuente-Brun et al., 2013).

<sup>10</sup> Los SC contribuyen a reducir la producción de ROS (Letts & Sazanov, 2017).

en el organismo, conocido como estrés oxidativo y generado por un desequilibrio entre las especies pro-oxidantes (las propias ROS) y antioxidantes<sup>11</sup>, causa peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, daños al mtDNA y se ha relacionado con numerosas patologías, como las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes (Acin-Perez & Enriquez, 2014; X. Li et al., 2013).

### 1.3 mtDNA<sup>12</sup>

#### 1.3.1 Características

El mtDNA es un DNA propio de las mitocondrias que se encuentra en la matriz. Fue descubierto por primera vez en 1963 (Nass & Nass, 1963) y secuenciado en 1981 (Anderson et al., 1981). Se trata de un verdadero sistema genético, ya que es capaz de replicarse, transcribirse y traducirse. Sin embargo, no es autónomo, debido a que para llevar a cabo todos estos procesos requiere de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Gustafsson et al., 2016). Además, es un DNA circular, cerrado, superenrollado, está formado por dos cadenas (H y L)<sup>13</sup>, es poliploide<sup>14</sup> y tiene un tamaño mucho menor que el nDNA: contiene 16 569 pares de bases frente a las  $3 \cdot 10^9$  de pares de bases aproximadas que constituyen el nDNA (Montoya, 2005; Steward et al., 2017).

Las 16 569 pb del mtDNA se organizan en 37 genes: 13 dan lugar a mRNA, que después se traducen en las 13 proteínas mitocondriales que forman parte del sistema OXPHOS; 2 rRNA (12S y 16S) que, junto a proteínas codificadas en el nDNA, constituyen los ribosomas mitocondriales; 22 tRNA que participan en la traducción de los mRNA sintetizados. Además, el mtDNA también se caracteriza por ser muy compacto, dado que, a diferencia del nDNA, carece de intrones y de regiones intergénicas no codificantes (Figura 1.4). No obstante, existe una excepción: una región no codificante conocida como región control o NCR (Jemt et al., 2015), constituida por 1 100 pb, que supone el sitio de anclaje del mtDNA a la IM (Albring et al., 1977; S. R. Lee & Han, 2017) y que actúa como centro regulador para la replicación y transcripción del mtDNA. Esto último se debe a que contiene el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ )<sup>15</sup>, los promotores de la transcripción, los bloques de secuencias conservadas (CSBIII, CSBII y CSBI) y la región TAS (Figura 1.5).

---

<sup>11</sup> Moléculas que por secuestro o catálisis enzimática eliminan las ROS. Dos ejemplos son la superóxido dismutasa (en la mitocondria se encuentran las isoformas SOD1 y SOD2, que son, respectivamente, la SOD del IMS y la SOD de la matriz; (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001)) y la glutatión peroxidasa (Handy & Loscalzo, 2012).

<sup>12</sup> El mtDNA en que va a centrarse este apartado y los posteriores de la presente memoria es el hmtDNA. A partir de este punto los términos mtDNA y hmtDNA se usan indistintamente.

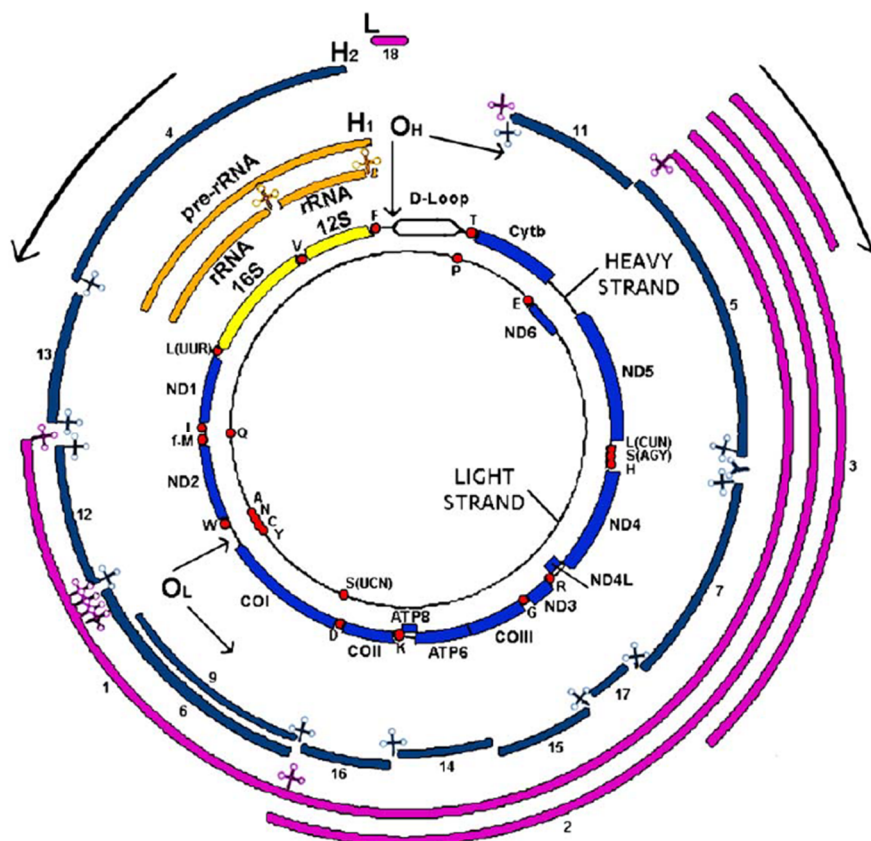
<sup>13</sup> La cadena H (*heavy*, pesada) y la cadena L (*light*, ligera) se llaman así por su mayor o menor contenido en guaninas, respectivamente: ambas hebras pueden separarse cuando se someten a centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio, precisamente por esta diferencia en su composición (Anderson et al., 1981).

<sup>14</sup> Existen en torno a 2-10 copias de mtDNA por mitocondria (Montoya, 2010) y entre  $10^3$ - $10^4$  moléculas de mtDNA por célula (López-Pérez & Montoya, 2012) frente a las 2 copias de nDNA por célula.

<sup>15</sup>  $O_H$  se considera un único par de bases (191), pero podría interpretarse como una región que abarca al LSP, las CSB y el propio  $O_H$  (Gustafsson et al., 2016).



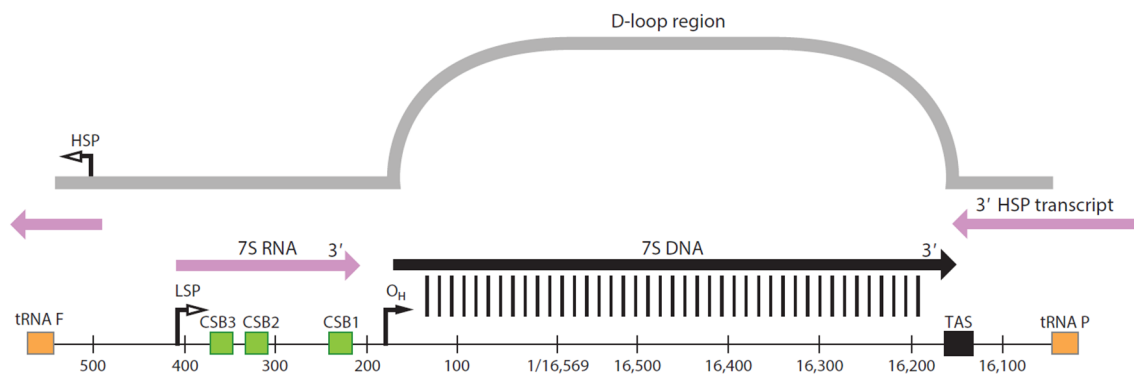
Otra diferencia del mtDNA con respecto al nDNA es que sus 37 genes se transcriben en forma de policistrones, esto es, cada gen o cistron no se transcribe bajo un promotor particular, sino que el mtDNA cuenta con 3 promotores (Montoya et al., 1982, 1983) bajo los que se sintetizan todos los transcritos que, posteriormente, son procesados para su maduración. Concretamente, los promotores son el HSP1 y HSP2 para la cadena pesada, que cuentan con los orígenes de transcripción  $H_1$  y  $H_2$ , respectivamente, y el LSP para la cadena ligera, que presenta el origen de transcripción L (Figuras 1.4 y 1.5). Además, el mtDNA tiene su propio código genético, algo distinto del universal (Anderson et al., 1981; Montoya et al., 1981): UGA no es un codón de terminación, sino que codifica para triptófano; AUA y AUU son también codones de iniciación (además de AUG); AGA y AGG, codones de arginina en el código universal, son señales de terminación de la traducción.



**Figura 1.4** (Montoya et al., 2006). Mapa genético del htmDNA con sus transcritos maduros. Las dos circunferencias interiores representan al mtDNA, con la cadena ligera (*light strand*) y la pesada (*heavy strand*). En ellas se indican y representan los genes para cuya transcripción sirven de molde<sup>16</sup>, a saber: los rRNA en amarillo, los tRNA como puntos rojos (y con la letra del aminoácido que les corresponde) y los mRNA en azul. Por su parte, las semicircunferencias exteriores se corresponden con los transcritos

<sup>16</sup> En 1981, se publicaron las secuencias del mtDNA humano (Anderson et al., 1981) y de ratón (Bibb et al., 1981) con nomenclaturas distintas: la de Anderson definía la hebra codificante como complementaria a la molde para la transcripción (en otras palabras, igual que se concibe actualmente en el nDNA); la de Bibb establecía la hebra molde como la codificante. Por tanto, en la nomenclatura de Anderson la principal hebra codificante es la ligera, mientras que en la de Bibb es la pesada. Clayton y Attardi emplearon la misma nomenclatura que la de Bibb y, dada la gran contribución de sus laboratorios a la investigación del mtDNA, es la que se encuentra más extendida y la utilizada en la presente memoria (Shokolenko & Alexeyev, 2017).

maduros de la cadena pesada y ligera, con la excepción del policistrón pre-rRNA (naranja), que se sintetiza bajo el origen de transcripción  $H_1$  (posición 561) y que al procesarse da lugar a los rRNA 12S y 16S. Los transcritos poliadenilados se encuentran numerados: los RNA 4-17 en azul oscuro y obtenidos a partir del origen  $H_2$  (posición 646); los RNA 1-3 y 18 en rosa y generados bajo el inicio de la transcripción L (posición 407). Además,  $O_H$  y  $O_L$  simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, en base al modelo de desplazamiento de la hebra (Figura 1.7); las flechas exteriores indican el sentido de la transcripción de la cadena pesada (antihorario) y de la ligera (horario), mientras que las flechas que están al lado de  $O_H$  y  $O_L$  señalan el sentido de síntesis de la cadena pesada (horario) y ligera (antihorario); se representa el bucle de desplazamiento o *D-loop* (7S DNA), incluido en la NCR (no mostrada en la imagen; ver Figura 1.5).



**Figura 1.5** (Gustafsson et al., 2016). Esquema de la NCR del hmtDNA. La NCR (en gris), formada por 1 100 pb, es la principal región no codificante del mtDNA y se encuentra comprendida entre los tRNA<sup>F</sup> (cadena pesada) y tRNA<sup>P</sup> (cadena ligera). En ella se incluyen los promotores HSP<sup>17</sup> y LSP, el  $O_H$  u origen de replicación de la cadena pesada y los bloques de secuencias conservadas CSBIII, CSBII y CSBI, que actúan como elementos regulatorios para la transcripción y replicación: la terminación prematura de la transcripción en CSBI da lugar a la formación del 7S RNA<sup>18</sup> o RNA 18 (Figura 1.4), mientras que en CSBII se genera un *R-loop* que, por acción de la RNasa H1, puede iniciar la replicación desde CSBIII o CSBII (no mostrado en la imagen; ver Figura 1.8). Por último, la región TAS participa en la regulación de la replicación, ya que promueve su terminación prematura y, por tanto, la síntesis del *D-loop* o 7S DNA.

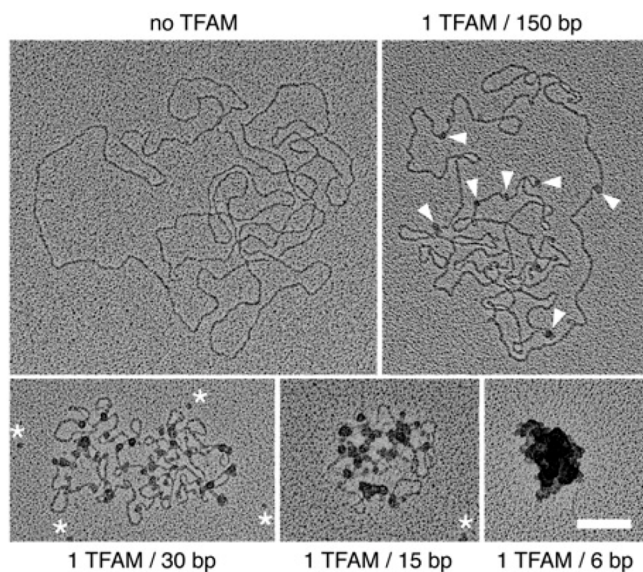
Para finalizar con las características del mtDNA, éste no está aislado, sino que sus 5  $\mu$ m se encuentran empaquetados con 50 o más proteínas en unas estructuras esféricas de 100 nm de diámetro, que carecen de membrana, son dinámicas y se conocen como nucleoides (S. R. Lee & Han, 2017). La proteína básica que permite esta organización es TFAM<sup>19</sup> (Ramos et al., 2019), que es capaz de unirse específicamente al mtDNA para iniciar la transcripción o de forma inespecífica para compactarlo (Gustafsson et al., 2016). En particular, según la proporción de TFAM y el número de copias del mtDNA, éste último se encontrará más o menos compacto cuanto mayor sea la cantidad de moléculas de TFAM unidas (Figura 1.6), lo que supone un mecanismo fundamental para regular la accesibilidad al mtDNA del resto de proteínas asociadas

<sup>17</sup> Existe un debate extendido sobre si la cadena pesada contiene sólo un promotor o dos (Blumberg et al., 2017). Este es el motivo por el que en algunas figuras de la presente memoria sólo está HSP como promotor de la cadena pesada.

<sup>18</sup> El 7S RNA es un transcrito poliadenilado con dos potenciales ORF (Ojala, Crews, et al., 1981) que inhibe el inicio de la transcripción. Esto lo consigue promoviendo la dimerización de POLRMT, forma en que la RNA polimerasa no es activa (Zhu et al., 2022).

<sup>19</sup> La unidad fundamental de los nucleoides es una molécula de mtDNA compactada por TFAM (Kukat et al., 2015).

a nucleoides (Kukat et al., 2015)<sup>20</sup>. Entre estas otras proteínas, están las implicadas en la replicación y la transcripción del mtDNA: las que constituyen la unidad básica de la replicación o replisoma, es decir, POLG, POLRMT, mtSSB y TWINKLE (Peter & Falkenberg, 2020); las que permiten que se sinteticen los mtrRNA, entre las que se encuentran POLRMT, TFAM, TFB2M y TEFM (Ježek et al., 2019). Cabe destacar que, de media, hay 1,4 copias de mtDNA por nucleoide (Kukat et al., 2015; S. R. Lee & Han, 2017), que se pueden encontrar en torno a 1 800 nucleoides en un fibroblasto humano (Bonekamp & Larsson, 2018) y que la replicación del mtDNA incrementa el número de nucleoides sin alterar el tamaño de los mismos. En consecuencia, que haya más o menos nucleoides depende directamente del número total de moléculas de mtDNA (Kukat et al., 2015).



**Figura 1.6** (Kukat et al., 2015). Micrografías electrónicas de mtDNA con TFAM. Conforme aumenta la cantidad de copias de TFAM (puntitos grises) por molécula de mtDNA (hilo) se produce una mayor compactación de este último. Las moléculas de TFAM unidas al mtDNA están indicadas con flechas blancas, mientras que las que no hibridadas con asteriscos blancos. Las imágenes se encuentran tomadas a una escala de 100 nm.

### 1.3.2 Herencia materna

El mtDNA se transmite a la descendencia, pero no mediante una herencia mendeliana, sino una que es exclusivamente materna (Giles et al., 1980; Pyle et al., 2015). Por tanto, una madre transmite la información mitocondrial a toda su descendencia, pero sólo las hijas podrán perpetuarla. Esto se debe a que, aunque tanto los espermatozoides como los oocitos presentan mitocondrias<sup>21</sup>, el mtDNA paterno es eliminado tras la fecundación por parte de los oocitos (Kaneda et al., 1995) mediante la ubiquitinación de las mitocondrias de los espermatozoides (Sutovsky et al., 1999, 2000) y la acción de la endonucleasa G mitocondrial (Zhou et al., 2016)<sup>22</sup>. Este proceso se lleva a cabo debido a que los espermatozoides requieren una gran cantidad de ATP y, por tanto, presentan una activación anormal del sistema OXPHOS: producen un exceso

<sup>20</sup> Nucleoides con una proporción TFAM/mtDNA elevada se encuentran muy compactados y, por tanto, bloqueados a la replicación y a la transcripción (Farge et al., 2014). TFAM se comporta como un regulador epigenético: controla el número de moléculas de mtDNA disponibles para activar su replicación o su transcripción (Bonekamp & Larsson, 2018).

<sup>21</sup> Los oocitos tienen 100 000 mitocondrias aproximadamente (Ebert et al., 1988), cuya información es la misma que la del cigoto tras la fecundación y la que se distribuye entre las células hijas en las sucesivas divisiones. El exceso de mitocondrias en los oocitos compensa la eliminación de las mitocondrias paternas, así como el hecho de que no se lleva a cabo ningún evento de replicación del mtDNA hasta que no se implanta el blastocito en el útero materno (Ebert et al., 1988; Gustafsson et al., 2016).

<sup>22</sup> La destrucción del mtDNA paterno también tiene lugar durante la espermatogénesis, etapa en que su eliminación es promovida por POLG (Z. Yu et al., 2017).

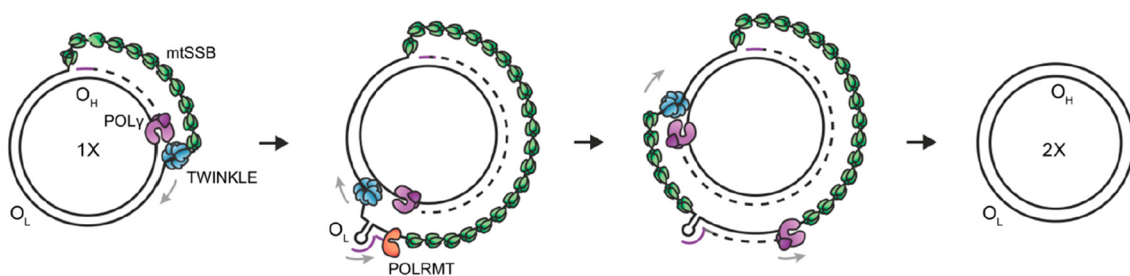
de ROS que, como se ha indicado en el apartado 1.2.3, puede dañar al mtDNA (Madamanchi & Runge, 2007). En consecuencia, la destrucción de las mitocondrias paternas evita que dichas alteraciones sean transmitidas a la descendencia.

El genotipo mitocondrial de cada individuo recibe el nombre de haplotipo y distintos haplotipos que comparten variantes mitocondriales no patológicas, procedentes de un ancestro común, se distribuyen dentro de un mismo haplogrupo. Esto, unido a la herencia materna del mtDNA, le otorga una gran aplicabilidad, ya que permite establecer linajes. Dos ejemplos:

- **Eva mitocondrial:** el estudio de los diferentes haplogrupos ha permitido construir un árbol filogenético en que clasificarlos, establecer la Eva mitocondrial (MRCA), es decir, la mitocondria con el mtDNA más reciente conocido del que derivan el resto de los actuales (Mitchell et al., 2014), así como estudiar las migraciones humanas (J. B. Stewart & Chinnery, 2015).
- **Prueba del mtDNA:** la aplicación de la herencia materna del mtDNA ha tenido un fuerte impacto en la genética forense. Uno de los casos históricos más destacables fue la identificación de la familia del zar Nicolás II de Rusia, asesinada en 1918 a causa de la revolución bolchevique, así como el fin de la famosa leyenda de Anastasia, una de las princesas (Coble et al., 2009).

### 1.3.3 Replicación: modelo de desplazamiento de la hebra

La replicación del mtDNA ocurre de manera independiente al ciclo celular y a la replicación de los genes en el nDNA (Bogenhagen & Clayton, 1977). Existen tres modelos que tratan de explicarla: el modelo de desplazamiento de la hebra (Robberson et al., 1972), primero en ser propuesto, el modelo RITOLS y el modelo acoplado (Gustafsson et al., 2016). El más aceptado es el modelo de desplazamiento de la hebra y el que va a exponerse en el presente apartado. Dicho modelo señala que cada cadena del mtDNA presenta su propio origen de replicación (Figura 1.4) y que la replicación del mtDNA es unidireccional y asimétrica, esto es, que, desde cada origen de replicación, ésta transcurre en una única dirección y que la replicación de ambas cadenas ocurre en sentidos contrarios, respectivamente (Montoya, 2005). Un esquema de este modelo, con su correspondiente explicación, se encuentra en la Figura 1.7.



**Figura 1.7** (Peter & Falkenberg, 2020). Replicación del mtDNA según el modelo de desplazamiento de la hebra. Primero se produce la replicación de la cadena pesada desde  $O_H$ , en que la helicasa TWINKLE comienza a desenrollar al mtDNA, siempre por encima de la DNA polimerasa  $\gamma$  (POLG o POLY)<sup>23</sup>, que, desde dicho punto, va sintetizando la nueva cadena pesada en sentido  $5' \rightarrow 3'$ , tomando como molde la

<sup>23</sup> La holoenzima se compone de la subunidad catalítica POLG (con actividad  $5' \rightarrow 3'$  polimerasa y  $3' \rightarrow 5'$  exonucleasa) y un homodímero constituido por las subunidades accesorias POLG2, que aumentan la afinidad de la enzima por el mtDNA y, por tanto, su procesividad (Rusecka et al., 2018).



ligera. Paralelamente, la hebra parental pesada desplazada es cubierta por moléculas de la proteína mtSSB para impedir que vuelva a hibridarse. Este proceso continúa hasta que se recorren 2/3 aproximadamente del genoma mitocondrial, momento en que el replisoma llega hasta  $O_L$ . A partir de este punto, la replicación de la cadena pesada continúa en el mismo sentido y comienza la replicación de la cadena ligera en sentido contrario, tomando como molde la pesada. En la síntesis de la cadena ligera no es necesaria la acción de TWINKLE, puesto que la hebra ya se encuentra desenrollada, y sólo intervienen POLG y mtSSB<sup>24</sup>. La replicación de ambas cadenas finaliza cuando POLG las recorre por completo y por medio de la acción de la topoisomerasa 3 $\alpha$  (no presente en la imagen), que separa las nuevas hebras y, en consecuencia, permite la segregación fisiológica de los nucleoides por la matriz (Nicholls et al., 2018). Como resultado, con todo este proceso se pasa de tener una copia de mtDNA (1 X) a dos (2 X).

La replicación del mtDNA depende activamente de la maquinaria de la transcripción tanto en  $O_L$  como en  $O_H$ . Cuando el replisoma pasa por  $O_L$  se origina un bucle en forma de tallo, lo que, junto a una secuencia poli(dT) de dicho bucle, permite reclutar a la RNA polimerasa mitocondrial o POLRMT, que funciona como DNA primasa y sintetiza un *primer* de RNA a partir del que puede actuar POLG (Fusté et al., 2010; Peter & Falkenberg, 2020; Tapper & Clayton, 1981; Wong & Clayton, 1985)<sup>25</sup>. Por su parte, para que se pueda iniciar la replicación en  $O_H$  también es necesaria la formación de un *primer* de RNA. Este constituye un *R-loop*<sup>26</sup> (B. Xu & Clayton, 1995, 1996; Xuan et al., 2006); es sintetizado a partir del promotor LSP (Chang & Clayton, 1985) por medio de la acción de TFAM, POLRMT y TFB2M; no debe confundirse con el 7S RNA; la CSBII promueve su terminación<sup>27</sup> (Figuras 1.5 y 1.8). Esto último se debe a que en la CSBII se forma un tipo de estructura secundaria, llamada *G-quadruplex*, que provoca la terminación prematura de la transcripción, así como la estabilización del *R-loop* sintetizado (Wanrooij et al., 2010, 2012). Sin embargo, CSBII y  $O_H$  no se encuentran próximas (Figura 1.5), sino que hay 108 pb de distancia (desde el final de CSBII), por lo que la replicación no puede iniciarse directamente desde  $O_H$  a partir del *R-loop*. Existen dos enzimas, RNasa H1 y MGME1, propuestas para explicar qué sucede:

- **RNasa H1:** la RNasa H1 es una endonucleasa inespecífica que actúa sobre el RNA en híbridos DNA-RNA y que al realizar cortes sobre el *R-loop* en CSBII y CSBIII puede iniciarse la replicación del mtDNA (Figura 1.8)<sup>28</sup>.

<sup>24</sup> mtSSB, además, actúa como un regulador del inicio de la replicación, tanto en  $O_H$  como en  $O_L$ . En  $O_H$  contribuye a la replicación estabilizando el *R-loop* sin procesar (Posse et al., 2019) y en  $O_L$  favorece que POLRMT comience la formación del *primer* para la replicación desde  $O_L$  y no desde cualquier otra posición (M. Jiang et al., 2021).

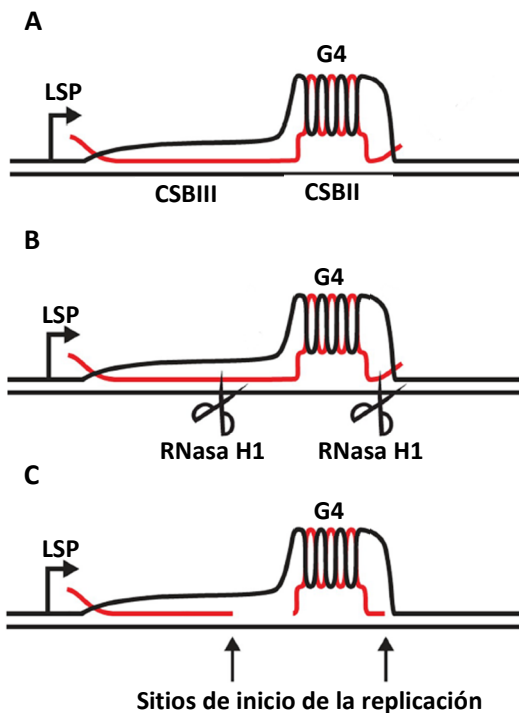
<sup>25</sup> Como se indica posteriormente en el apartado 1.4.2, POLRMT no presenta una alta procesividad por sí misma (Agaronyan et al., 2015; M. Jiang et al., 2021).

<sup>26</sup> Un *R-loop* en realidad no es sólo el RNA sintetizado, sino el bucle formado por un híbrido DNA-RNA y el DNA monocatenario no molde asociado (Silva et al., 2018).

<sup>27</sup> La terminación completa tiene lugar 16-18 nucleótidos *downstream* de la *G-quadruplex* de CSBII, en una región rica en uniones A-U, débiles (Agaronyan et al., 2015; Hillen, Parshin, et al., 2017).

<sup>28</sup> Los autores que proponen este modelo (Posse et al., 2019) llevaron a cabo también el mapeado de los puntos de transición de RNA a DNA en estos bloques de secuencias conservadas para demostrar por completo el inicio de la replicación del mtDNA en las mismas. Eso sí, señalan que, mientras que CSBII es un elemento crucial para que la formación del *primer* sea exitosa, CSBIII juega un papel menor en todo este proceso.

- **MGME1**: es una endo-/exonucleasa que degrada el DNA (sobre todo, ssDNA<sup>29</sup>) en sentido 3'→5'. Requiere extremos libres; no puede degradar sustratos circulares (Kornblum et al., 2013; Szczesny, Hejnowicz, et al., 2013). Su actividad, junto al hecho de que tradicionalmente se han encontrado extremos 5' libres de DNA en O<sub>H</sub> (Nicholls & Minczuk, 2014) y de que mutaciones en MGME1 conducen a un 7S DNA con más pares de bases hacia CSBII (Nicholls et al., 2014), llevan a proponer a esta enzima como la responsable de degradar el fragmento de DNA sintetizado a partir del *R-loop* maduro y previo a O<sub>H</sub>. Esta degradación, junto a la completa del *R-loop* por parte de RNasa H1, se produciría entre el inicio de la replicación en O<sub>H</sub> y su final y contribuiría a que se desarrollara favorablemente la terminación de la replicación (Gustafsson et al., 2016).



**Figura 1.8** (adaptada de (Posse et al., 2019)). Modelo de la formación del *R-loop* procesado. (A) La terminación prematura de la transcripción lleva a la síntesis de un *R-loop* (RNA en rojo y las cadenas del mtDNA en negro) primario, que se estabiliza mediante la estructura *G-quadruplex* (G4) formada en CSBII. (B) Para que pueda ser usado como *primer* para la replicación del mtDNA, el *R-loop* es procesado por la RNasa H1 en CSBII y CSBIII. (C) Los extremos 3' de RNA generados pueden ser aprovechados por POLG para iniciar la replicación de la cadena pesada del mtDNA.

Por otra parte, la replicación de la cadena pesada puede terminar de forma prematura en la región TAS mediante la formación de una *G-quadruplex* de DNA (Røyrvik & Johnston, 2020). El resultado es la síntesis de una secuencia conocida como 7S DNA (bucle de desplazamiento o *D-loop*), nombrada previamente, que se encuentra dentro de la NCR (Figura 1.5) y cuyo extremo 5' también sería procesado por MGME1 (Nicholls et al., 2014). La función del 7S DNA se desconoce, pero se ha propuesto que también podría tratarse de un regulador de la replicación del mtDNA: actuaría como un interruptor entre una replicación completa y una abortiva, según las demandas celulares (Jemt et al., 2015). Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que el 95 % de los eventos de replicación que se inician terminan prematuramente, si bien de media sólo el 10 % de las moléculas de mtDNA presentan 7S DNA<sup>30</sup> (Nicholls & Minczuk, 2014), y porque

<sup>29</sup> Para que MGME1 pueda actuar sobre el fragmento de DNA sintetizado entre CSBIII/CSBII y O<sub>H</sub> es posible que se requiera la acción de una helicasa.

<sup>30</sup> De lo que puede deducirse que, de media, un 10,5 % de las moléculas de mtDNA están replicándose.

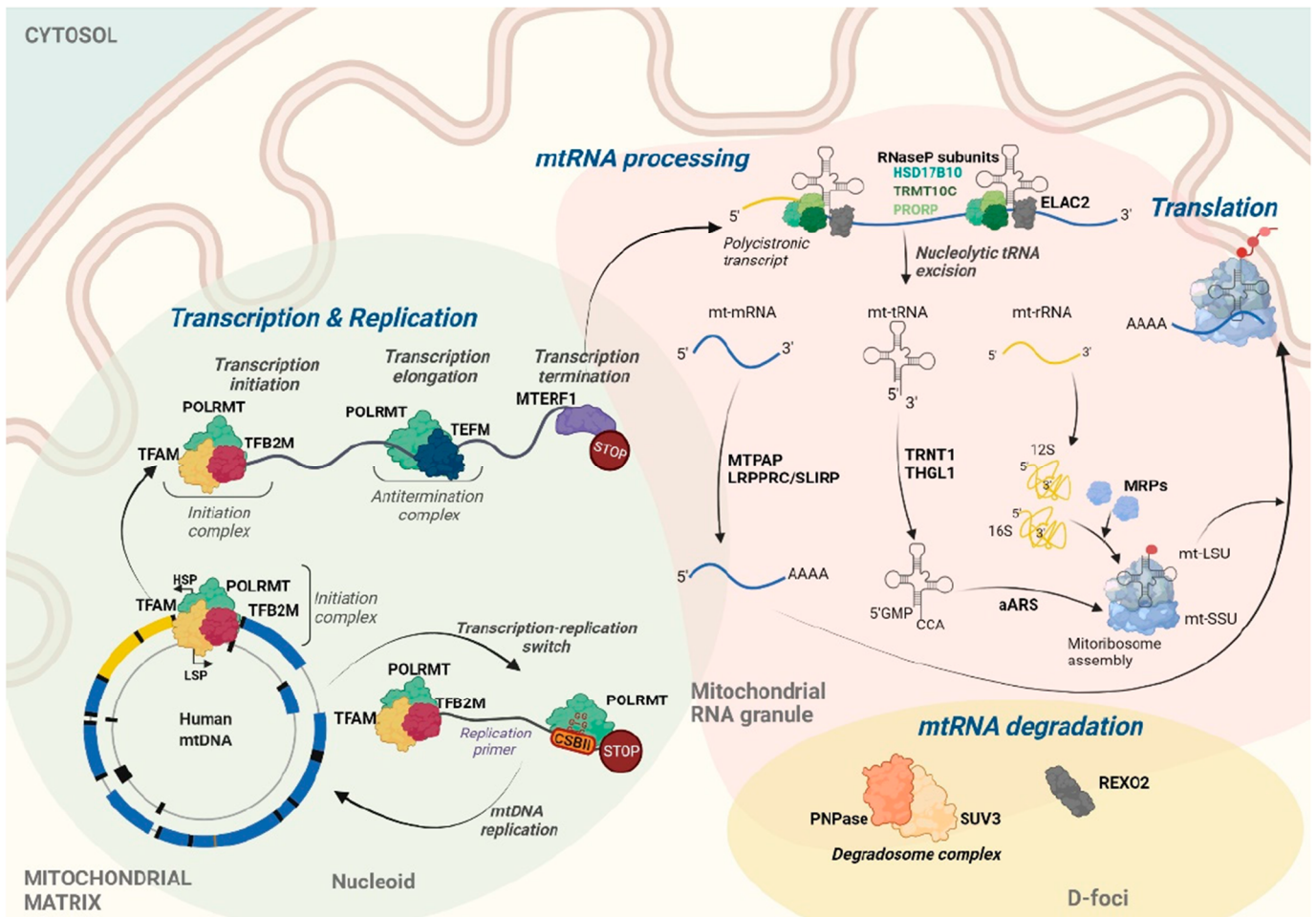
la terminación de la replicación en TAS podría ser reversible mediante la unión de TWINKLE<sup>31</sup> ([Jemt et al., 2015](#)).

Según todo lo expuesto previamente, los principales puntos por los que se regula la iniciación de la replicación son: el grado de compactación de los nucleoides (moléculas de mtDNA disponibles); iniciación de la transcripción en LSP; terminación de la transcripción promovida en CSBII; terminación prematura de la replicación en TAS ([Gustafsson et al., 2016](#)).

---

<sup>31</sup> Las helicasas normalmente actúan sobre estructuras dúplex, pero algunas de ellas son capaces de reconocer las G4 ([Sissi et al., 2011](#)).

### 1.4 Metabolismo del mtRNA

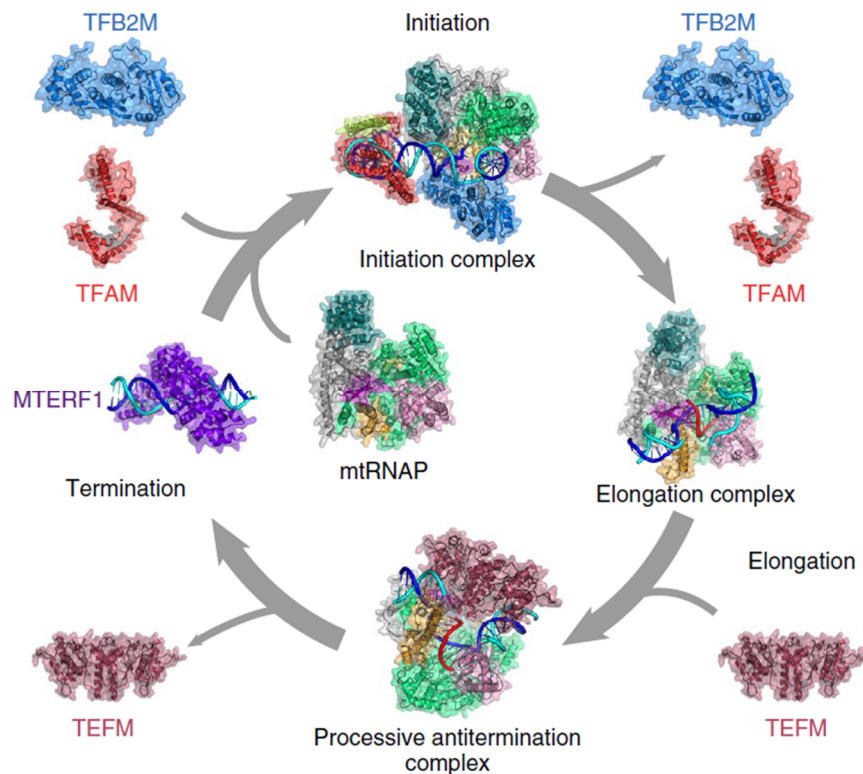


**Figura 1.9** (Jedynak-Slyvka et al., 2021). Esquema general del metabolismo del mtRNA. Los distintos mtRNA son sintetizados a partir de los promotores de la cadena pesada y ligera por medio de la maquinaria de inicio de la transcripción, compuesta por TFAM, TFB2M y POLRMT. En ausencia de TEFM, y a partir del LSP, los transcritos terminan prematuramente en la CSBII y se inicia la replicación mitocondrial. En presencia de TEFM, se promueve la elongación de la transcripción de ambas cadenas, sintetizándose así un policistrón bajo cada promotor, y cuya finalización está mediada por un factor de terminación, como MTERF1. Todos estos procesos tienen lugar en los nucleoides (en verde). Los policistrones generados son procesados posteriormente, siendo el procesamiento canónico el del modelo de puntuación: los tRNA suponen puntos de corte para las endonucleasas mtRNasa P (compuesta por TRMT10C, HSD17B10 y PRORP) en 5' y ELAC2 en 3'. Los transcritos generados son sometidos a una serie de modificaciones para su maduración: los mRNA son poliadenilados por MTPAP y estabilizados por el complejo LRPPRC/SLIRP; entre otras modificaciones, a los tRNA se les añade una secuencia CCA en el extremo 3' mediante la TRNT1 y al tRNA<sup>H</sup> una GMP en su 5' por la acción de la THG1L; los rRNA se metilan (no presente en la imagen) y constituyen, junto a las MRP, los mitorribosomas (formados por las subunidades 39S o mt-LSU y 28S o mt-SSU), que se anclan a la IM por medio de la subunidad 39S y llevan a cabo la traducción, junto a los tRNA y las aARS (entre las que se encuentran las codificadas por *CARS2* y *FARS2*). El procesamiento y las modificaciones post-transcripcionales de los mtRNA tienen lugar en los gránulos de RNA (en rosa). Finalmente, en los D-foci (en amarillo) se encuentra el degradosoma, constituido por la PNPase y SUV3, que es el principal complejo descrito hasta el momento en llevar a cabo la degradación de los mtRNA, y cuyos productos terminan por ser metabolizados completamente por REXO2. Cabe destacar que los D-foci colocalizan tanto con los nucleoides (no presente en la imagen) como con los gránulos de RNA y que estos dos últimos se anclan a la IM (los nucleoides por medio de la NCR del mtDNA) y también colocalizan entre sí. Leer texto para más información.



### 1.4.1 Síntesis de los mtRNA

Como se expone en el apartado 1.3.1, la transcripción del mtDNA se lleva a cabo bajo dos promotores de la cadena pesada (HSP1 y HSP2) y un promotor de la cadena ligera (LSP). La síntesis de los mtRNA a partir de los mismos es bidireccional (Grochowska et al., 2022) y tiene lugar en los nucleoides, en que se encuentran las proteínas que participan en este proceso (Figura 1.9). Éstas van interviniendo de manera secuencial y constituyen un ciclo, tal y como aparece representado y explicado en la Figura 1.10.



**Figura 1.10** (Hillen et al., 2018). Ciclo de la transcripción por el que se produce la síntesis de los mtRNA. La transcripción mitocondrial tiene lugar en tres pasos: iniciación, elongación y terminación. En la iniciación, TFAM se une específicamente a los promotores del mtDNA, 15-40 pb *upstream* de los inicios de la transcripción (Kühl et al., 2016; Ringel et al., 2011) y provoca una curvatura de 180° en el mtDNA (no presente en la imagen), lo que permite el reclutamiento de POLRMT (mtRNAP en la imagen), tanto por su afinidad con TFAM como por el cambio de conformación del mtDNA. El resultado es la formación del pre-complejo de iniciación o pre-IC (no presente en la imagen). A continuación, interviene TFB2M<sup>32</sup>, que interacciona con POLRMT, termina por formar el complejo de iniciación de la transcripción o IC (*initiation complex*) y provoca la apertura de los promotores para que POLRMT pueda comenzar la transcripción<sup>33</sup> (Fukuoh et al., 2009; Hillen, Morozov, et al., 2017). Posteriormente, se produce la salida de TFAM y TFB2M y al complejo de elongación resultante o EC (*elongation complex*; POLRMT con DNA/RNA) se le une TEFM, formando el EC-TEFM, también conocido como complejo de antiterminación procesivo (*processive*

<sup>32</sup> TFB2M estimula la transcripción dos órdenes de magnitud más que TFB1M (Montoya et al., 2006). TFB1M es una metilasa de rRNA (Jacobs & Turnbull, 2005) y, en concreto, del 12S rRNA, que requiere de esta modificación post-transcripcional para su función (Metodieiev et al., 2009).

<sup>33</sup> POLRMT no es capaz de iniciar la transcripción sin TFAM ni TFB2M (Posse et al., 2015), con la excepción de cuando actúa como DNA primasa en la replicación, como se menciona en el apartado 1.3.3.

*antitermination complex*) y encargado de llevar a cabo la elongación de la transcripción<sup>34</sup>. Finalmente, TEFM se suelta y finaliza la transcripción mediante un factor de terminación de la transcripción (MTERF1 en la imagen, que actúa en caso de iniciarse la transcripción en HSP1).

A partir de cada uno de los promotores se genera un transcrito policistrónico que después es procesado: LSP sintetiza un policistrón que engloba al 7S RNA, ND6 y los tRNA<sup>P</sup>, tRNA<sup>E</sup>, tRNA<sup>S</sup>, tRNA<sup>Y</sup>, tRNA<sup>C</sup>, tRNA<sup>N</sup>, tRNA<sup>A</sup> y tRNA<sup>Q</sup>; HSP1 da lugar a un policistrón más corto, que contiene los rRNA 12S y 16S y los tRNA<sup>F</sup> y tRNA<sup>V</sup>; bajo HSP2 se establece el tercer policistrón, cuyo procesamiento da lugar al resto de transcritos, es decir, la mayoría de mRNA y tRNA del mtDNA (Figura 1.4; los policistrones de LSP y HSP2 no aparecen en la imagen)<sup>35</sup>. Entre otros condicionantes, los promotores se ven influidos por los niveles de ATP y de TFAM:

- **ATP:** el incremento en la concentración de ATP activa los tres promotores, pero a partir de cierto punto su comportamiento cambia: más de 1 mM inhibe a HSP1 y más de 2 mM a LSP, mientras que la actividad de HSP2 se mantiene incluso a 5 mM (Enríquez et al., 1996; Zollo et al., 2012). Teniendo en cuenta los componentes sintetizados bajo cada promotor, estos datos sugieren un mecanismo regulatorio por los niveles de ATP entre la transcripción y la traducción mitocondrial (Shokolenko & Alexeyev, 2017).
- **TFAM:** a pesar de actuar como iniciador de la transcripción, los diferentes niveles de TFAM influyen sobre la actividad de los promotores y, por tanto, pueden enmascarar su detección experimental: a menores concentraciones HSP2 > HSP1 >>> LSP; a concentraciones intermedias LSP >> HSP1 >> HSP2; a mayores concentraciones HSP1 >>> LSP >>> HSP2<sup>36</sup> (Lodeiro et al., 2012). En consecuencia, se considera que a niveles bajos de TFAM las mitocondrias ejecutan un programa de mantenimiento, proporcionando subunidades OXPHOS, mientras que a niveles más altos se promueve la biogénesis, proporcionando *primers* para la replicación del mtDNA y rRNA desde LSP y HSP1, respectivamente<sup>37</sup> (Shokolenko & Alexeyev, 2017). Todo ello, junto al hecho de que, en función de su concentración, TFAM deja más o menos accesibles las moléculas de mtDNA (Figura 1.6), afianza a TFAM como una proteína fundamental en la regulación del número de copias del mtDNA y de su expresión génica (Ježek et al., 2019). Cabe destacar que la unión de TFAM al mtDNA se encuentra regulada por fosforilaciones en su dominio HMG1 (presenta dos de estos dominios) y, en concreto, en los residuos S55 y S56. En estado fosforilado<sup>38</sup>, TFAM se suelta del mtDNA por repulsiones electrostáticas y las moléculas de la proteína libres son degradadas por la proteasa

---

<sup>34</sup> Se desconoce cómo se produce exactamente la transición entre el IC y el EC-TEFM, si bien se considera que debe existir un reposicionamiento del mtDNA y que la unión de TEFM y TFB2M a POLRMT es mutuamente excluyente, ya que los sitios de POLRMT con los que interactúa TFB2M son posteriormente ocupados por el propio mtDNA y TEFM (Hillen, Parshin, et al., 2017).

<sup>35</sup> Además de mRNA, tRNA y rRNA, la transcripción del mtDNA da lugar a ncRNA, debido a la complementariedad de las dos hebras que lo constituyen (Pietras et al., 2018b).

<sup>36</sup> Zollo et al. afianzan estas observaciones señalando que, para la activación de HSP2, no sólo influyen los niveles de TFAM, sino también de POLRMT y TFB2M. Obtienen que, en cantidades equimolares de estas tres proteínas, existe activación de HSP2, mientras que a menores concentraciones de TFAM con respecto a las otras dos la expresión desde HSP2 es mayor (Zollo et al., 2012).

<sup>37</sup> Lodeiro et al., autores de este modelo, advierten que la expresión de ND6 y de los tRNA bajo LSP necesita ser lo suficientemente estable para no requerir su transcripción cuando HSP2 es el principal promotor activo (Lodeiro et al., 2012).

<sup>38</sup> La fosforilación de TFAM se produce dentro de la mitocondria por medio de la PKA (Lu et al., 2013).

mitocondrial Lon, mientras que las moléculas de TFAM unidas al mtDNA son resistentes a esta proteólisis (Lu et al., 2013).

Por otra parte, MTERF1 fue la primera proteína identificada como terminadora de la transcripción mitocondrial (Kruse et al., 1989) y la única hasta el momento. Concretamente, actúa como un monómero (Fernandez-Silva et al., 1997) y se encarga de la terminación de la transcripción iniciada en el promotor HSP1, para lo que presenta un sitio de unión al mtDNA dentro del tRNA<sup>L</sup>. Además, bajo este promotor se genera la mayor cantidad de transcritos en porcentaje con respecto al total (Mercer et al., 2011), pudiendo llegar a transcribirse 100 veces más que HSP2 (Zollo et al., 2012). Este hecho, junto a que MTERF1 también interacciona con un sitio *upstream* de HSP1, llevó a establecer un modelo en el que se propone que el factor se une a la vez con sus dos puntos de anclaje al mtDNA, enfrentándolos entre sí y provocando un doblamiento del material genético. Esto permite establecer una transcripción cíclica bajo el promotor HSP1 y generar así una mayor producción de la maquinaria necesaria para la síntesis de los mitorribosomas<sup>39</sup> (Martin et al., 2005; Montoya et al., 2006).

Además de MTERF1, se han descrito otras tres proteínas mitocondriales homólogas de la misma familia (Linder et al., 2005), pero, como se adelantaba en el párrafo anterior, ninguna asociada con la terminación de la transcripción: MTERF2 actúa como un regulador del inicio de la transcripción (Wenz et al., 2009); MTERF3 es un represor de la transcripción mitocondrial<sup>40</sup> (Park et al., 2007); MTERF4 participa en el ensamblaje de los mitorribosomas<sup>41</sup> (Metodieff et al., 2014). Finalmente, otras proteínas que cabe mencionar relacionadas con la síntesis de los mtRNA son MRPL12 y MTRES1. Ambas se ha descrito que interactúan con POLRMT en diferentes situaciones: moléculas de MRPL12 libres (esto es, no asociadas a los mitorribosomas) actúan como activadores de la transcripción (Surovtseva et al., 2011), mientras que MTRES1 promueve el aumento de la transcripción mitocondrial bajo condiciones de estrés (Kotrys et al., 2019).

#### 1.4.2 TEFM

El factor de elongación de la transcripción mitocondrial o TEFM es una proteína codificada por el gen nuclear *TEFM* (17q11.2; transcrito primario con 1 306 nucleótidos y 4 exones), formada por 360 aminoácidos (Figura 1.11), localizada en la matriz mitocondrial ((Minczuk et al., 2011); concretamente, en los nucleoides, tal y como ha indicado en el apartado 1.3.1 y como puede verse en la Figura 1.9), activa en forma de homodímero<sup>42</sup> y que, como su nombre indica, permite la elongación de la transcripción mitocondrial, resultando esencial para que se sintetice la longitud completa de los mtRNA de ambas cadenas (S. Jiang et al., 2019;

<sup>39</sup> Este proceso también se encuentra regulado por la fosforilación: MTERF1 fosforilada provoca la terminación de la transcripción bajo HSP1 (Prieto-Martín et al., 2004).

<sup>40</sup> Se encuentra sobreexpresado en gliomas (Zi et al., 2019) y en carcinoma de mama (W.-S. Wang et al., 2020).

<sup>41</sup> Concretamente, forma un complejo con la m<sup>5</sup>C metiltransferasa NSUN4 que permite el ensamblaje de la subunidad 39S con la 28S. Precisamente, la pérdida de MTERF4 lleva a un defecto en el ensamblaje de los ribosomas y una reducción drástica de la traducción (Cámara et al., 2011).

<sup>42</sup> El C-terminal de TEFM presenta una hélice  $\alpha_{10}$  (residuos 244-266) que, mediante interacciones hidrofóbicas, se asocia con la hélice  $\alpha_{10}$  de otro monómero de la proteína (Hillen, Parshin, et al., 2017).

Minczuk et al., 2011; Posse et al., 2015). Esta función la consigue llevar a cabo por medio de distintas vías, todas ellas relacionadas entre sí:

- Procesividad: es el número de nucleótidos que es capaz de añadir una polimerasa antes de soltarse del material genético. TEFM incrementa la procesividad de POLRMT, lo que consigue estableciendo distintas interacciones con el complejo de elongación. En primer lugar, el reclutamiento de TEFM encierra al DNA *downstream* entre POLRMT y la propia TEFM en una estructura conocida como abrazadera/pinza deslizante de DNA (*sliding clamp*), que se caracteriza por aumentar la procesividad de las polimerasas<sup>43</sup>. Para ello, resultan fundamentales las interacciones de TEFM con el DNA (que, al menos, lleva a cabo mediante su inter-dominio enlazante<sup>44</sup>) y con POLRMT (el C-terminal de TEFM establece enlaces con los dominios N-terminal y C-terminal (catalítico) de POLRMT). Además, TEFM también es capaz de interactuar con el RNA sintetizado, siendo el inter-dominio enlazante y el C-terminal de la proteína los principales implicados (Gustafsson et al., 2016; Hillen et al., 2018; Hillen, Parshin, et al., 2017; Minczuk et al., 2011; Posse et al., 2015; Ringel et al., 2011; Rusecka et al., 2018). Finalmente, TEFM incrementa la habilidad de POLRMT de sortear estructuras compactas (como los *cluster* de tRNA; Figura 1.4), de continuar con la síntesis de RNA cuando ésta introduce un nucleótido que da lugar a un apareamiento de bases incorrecto<sup>45</sup> y de no pararse si transcribe un mtDNA dañado por, por ejemplo, el estrés oxidativo<sup>46</sup> (Agaronyan et al., 2015; Posse et al., 2015; Sultana et al., 2017).
- Pausas de POLRMT: un mecanismo fundamental de regulación de la transcripción son las pausas que realizan la mayoría de las RNA polimerasas, incluida la RNA polimerasa II en el núcleo (Kwak & Lis, 2013). Por tanto, durante la transcripción se pueden encontrar momentos sin pausas, pausas cortas (menos de 4 segundos<sup>47</sup>) y pausas largas (más de 4 segundos). TEFM disminuye la frecuencia y el tiempo de duración de las pausas largas que realiza POLRMT, provocando que, en tiempo global, la RNA polimerasa mitocondrial no sólo aumente su procesividad, sino también la velocidad de la elongación de la transcripción (H. Yu et al., 2018).
- Mecanismo anti-terminatorio: como se adelantaba en el apartado 1.3.3, al iniciarse la transcripción desde LSP ésta puede terminar prematuramente en CSBII, lo que se debe a la formación de una estructura *G-quadruplex*. Estas estructuras, también llamadas G4,

---

<sup>43</sup> POLRMT comparte una alta homología de secuencia y estructural con la T7 RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Hillen et al., 2018; Jedynak-Slyvka et al., 2021). Sin embargo, esta última presenta una mayor procesividad *per se*, ya que establece más interacciones con el DNA. TEFM contribuye a solventar esta diferencia entre ambas polimerasas (Agaronyan et al., 2015; Sultana et al., 2017). El hecho de que POLRMT no sea auto-suficiente puede ser, además, para que haya una mayor regulación de su actividad.

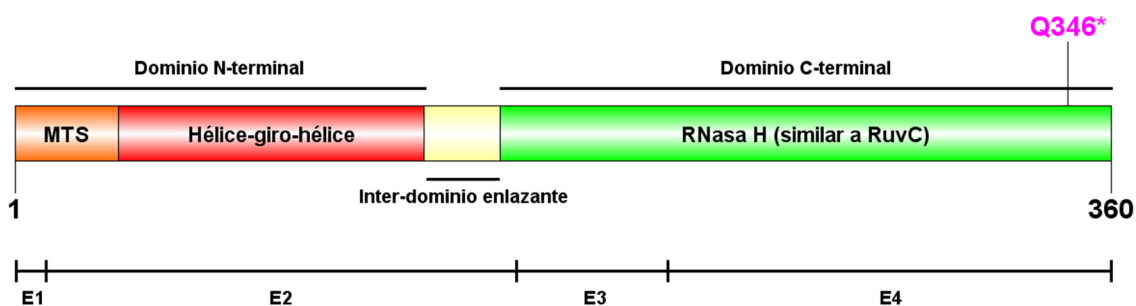
<sup>44</sup> Las hélice-giro-hélice en tándem que TEFM presenta en su N-terminal se han descrito en proteínas de unión a DNA. Sin embargo, se ha obtenido que dicho dominio es dispensable en las actividades de TEFM, al menos *in vitro* (Hillen et al., 2018; Hillen, Parshin, et al., 2017).

<sup>45</sup> POLRMT es una polimerasa de alta fidelidad/precisión, pero puede cometer errores (tasa de error promedio  $2 \cdot 10^{-5}$ ). TEFM no influye sobre la mayor o menor introducción de dichos errores, sino a incrementar la capacidad de *baipás* mutagénico de la polimerasa (Sultana et al., 2017).

<sup>46</sup> Uno de los principales productos de la oxidación del DNA es la 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (derivado oxidado de la deoxiguanosina), cuya concentración es una medida del estrés oxidativo. TEFM permite a POLRMT poder continuar con la transcripción y no detenerse ante este nucleósido dañado (Sultana et al., 2017).

<sup>47</sup> Experimentalmente no se pueden detectar pausas más cortas de 1 segundo (H. Yu et al., 2018).

se encuentran tanto en el mtDNA como en el nDNA y pueden producirse a partir de secuencias de DNA, RNA o híbridos de ambos<sup>48</sup> que sean ricas en guaninas y que éstas se plieguen de forma no canónica. Esto último se debe a que no se unen entre sí por enlaces Watson-Crick, sino mediante enlaces Hoogsteen, que también son puentes de hidrógeno, pero se producen entre distintos átomos de las bases nitrogenadas y, por tanto, éstas adquieren otras rotaciones y una estructura final más cerrada con capas de G-tétradas<sup>49</sup> (Falabella et al., 2019; Hillen, Parshin, et al., 2017; Lyonais et al., 2017; Sissi et al., 2011). En concreto, en el caso de CSBII, mientras se produce la transcripción de la cadena ligera, el RNA sintetizado forma esta estructura con el DNA molde (Jedynak-Slyvka et al., 2021; Røyrvik & Johnston, 2020; Wanrooij et al., 2012; H. Yu et al., 2018), promoviendo la parada prematura de la transcripción y, en consecuencia, la formación del *R-loop* primario que servirá como *primer* para la replicación (Figura 1.8). Esta parada tiene lugar debido a los choques entre la G4 con la horquilla intercalante (*intercalating hairpin*; del N-terminal) y el bucle de especificidad (*specificity loop*; del C-terminal) de POLRMT (Hillen, Parshin, et al., 2017). En caso de estar presente, TEFM interacciona con ambos motivos de la RNA polimerasa, de manera que este factor de elongación genera un efecto alostérico e impide que POLRMT y la G4 de CSBII entren en contacto y pueda continuar la transcripción (Hillen, Parshin, et al., 2017; Posse et al., 2015)<sup>50</sup>. Esta propiedad coincide con la habilidad, ya comentada, que TEFM le confiere a POLRMT de poder avanzar a través de estructuras compactas y es lo que ha llevado a proponer a TEFM como una molécula fundamental en la transición entre la replicación y la transcripción mitocondrial, una proteína anti-terminadora (Agaronyan et al., 2015).



**Figura 1.11** (basada en (Hillen, Parshin, et al., 2017)). Estructura secundaria de TEFM y mutaciones que afectan a la proteína. TEFM se encuentra dividida por tres dominios, identificados en base a predicciones basadas en homología de secuencias: N-terminal, que presenta un péptido señal de localización mitocondrial (MTS en naranja; residuos 1-35) y dos hélice-giro-hélice en tándem (en rojo; residuos 35-

<sup>48</sup> En concreto, las G4 pueden formarse a partir de 1 (intramolecular), 2 (bimolecular) o 4 (tetramolecular) cadenas de ácidos nucleicos (Lyonais et al., 2017).

<sup>49</sup> Las G4 se caracterizan por ser, además, un tipo de aptámero, esto es, una secuencia de ácido nucleico capaz de plegarse para ser reconocida por una molécula diana, siendo TFAM un ejemplo (Lyonais et al., 2017; Sissi et al., 2011). En este sentido, son estructuras clave en la activación o desactivación de determinadas rutas fisiológicas: en la replicación, la estabilidad genómica y la regulación de la transcripción del nDNA, entre otras (Lyonais et al., 2017); en el mtDNA, se ha propuesto que participan en la replicación, en la procesividad de la transcripción y, en consecuencia, en la respiración celular (Falabella et al., 2019).

<sup>50</sup> Además de su efecto alostérico (o en lugar de), también se ha propuesto que TEFM podría impedir la formación de la G4 en CSBII, debido a su interacción con el RNA naciente (Hillen, Parshin, et al., 2017; H. Yu et al., 2018).



135); inter-dominio enlazante, que carece de una estructura secundaria definida (en amarillo; residuos 136-159); C-terminal, que se caracteriza por adquirir un plegamiento similar a la superfamilia RNasa H<sup>51</sup> y, en concreto, a la enzima RuvC<sup>52</sup> (en verde; residuos 160-360). Además, por el momento no se han publicado mutaciones en TEFM que causen enfermedad, siendo la variante p.Q346\* que aparece en la imagen la del paciente estudiado en esta tesis doctoral. La longitud de los 4 exones (E1-E4) aparecen representada a escala 1:1. Figura elaborada con el *software* DOG 2.0 (Ren et al., 2009).

### 1.4.3 Procesamiento, maduración y degradación de los mtRNA

La regulación de la expresión del mtDNA es compleja y tiene diferentes niveles de control, algunos de ellos ya mencionados: mantenimiento del mtDNA, replicación del mtDNA<sup>53</sup>, la propia transcripción del mtDNA, el procesamiento de los transcritos primarios y su maduración, la estabilidad y degradación de los mtRNA, la coordinación con la traducción, la propia traducción en los mitorribosomas y la regulación de la inserción de las proteínas sintetizadas en la membrana mitocondrial interna, junto al resto de subunidades del sistema OXPHOS (Gustafsson et al., 2016).

Entre los nombrados en el párrafo anterior, el procesamiento, la maduración y la degradación de los mtRNA suponen puntos de regulación muy importantes, no ya sólo para intervenir en los niveles de los transcritos, sino también para eliminar RNA malformados o potencialmente tóxicos (Borowski et al., 2013). Estos procesos tienen lugar en unas estructuras llamadas gránulos de RNA (Figura 1.9), que son fluidos, dinámicos, no membranosos, ricos en RNA y, por el momento, están constituidos por más de 50 proteínas<sup>54</sup> (la cantidad total descubierta se encuentra en continuo aumento), entre las que cabe destacar: DDX28, DHX30, ELAC2, FASTK, FASTKD1, FASTKD2, FASTKD5, GRSF1<sup>55</sup>, MRPP1 (TRMT10C), MRPP2 (HSD17B10), MRPP3 (PRORP), LRPPRC, MRPL12, MTERF3, MTPAP, PNPT1, SUV3<sup>56</sup> (SUV3L1), TFB1M y TRUB2 (Jourdain et al., 2016; Xavier & Martinou, 2021). Además, la formación de los gránulos de RNA está estimulada por los transcritos primarios (Jourdain et al., 2013) y su localización depende de la fusión y fisión mitocondrial, ya que se encuentran asociados con la membrana interna (Rey et al., 2020). Esto, junto a que los gránulos de RNA se encuentran próximos a los nucleoides

---

<sup>51</sup> Esta superfamilia constituye un grupo que abarca a numerosas enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Debe su nombre a la RNasa H de *E. coli*, la primera en ser descubierta, y cuyo plegamiento del dominio catalítico es compartido por todas estas proteínas. Entre ellas se encuentran las resolvasas HJ, endonucleasas especializadas en resolver las uniones de tipo Holliday que se originan durante la recombinación genética. Las resolvasa RuvC de *E. coli* es una de ellas (Majorek et al., 2014; Wyatt & West, 2014).

<sup>52</sup> A pesar de su estructura similar a RuvC, TEFM se considera una pseudo-resolvasa, ya, aunque tiene capacidad de unión a los ácidos nucleicos, no presenta actividad catalítica (Minczuk et al., 2011). Para llevar a cabo su función, las resolvasas requieren coordinarse con iones divalentes catiónicos en su centro activo, pero, en el caso de TEFM, sus residuos homólogos forman puentes salinos con residuos próximos cargados positivamente, neutralizando así sus cargas negativas e impidiendo su interacción con los iones (Hillen, Parshin, et al., 2017).

<sup>53</sup> El número de copias del mtDNA, que varía entre células y condiciones fisiológicas, influye en la expresión global de un determinado gen (Szczesny, Wojcik, et al., 2013).

<sup>54</sup> La mayoría no son estrictas de los gránulos de RNA, sino que pueden encontrarse fuera de los mismos (Xavier & Martinou, 2021).

<sup>55</sup> Primera proteína, junto al complejo mtRNasa P (MRRP1-3), en ser localizada en estas estructuras (Antonicka et al., 2013; Jourdain et al., 2013).

<sup>56</sup> La PNPasa (PNPT1) y SUV3 (SUV3L1) también se encuentran en los D-foci (Figura 1.9).

(algunos incluso colocalizan con ellos, aunque menos del 10 % (Jourdain et al., 2013)) y a que la maquinaria de la traducción también se encuentra próxima a la membrana interna (la subunidad 39S de los mitorribosomas está anclada a dicha membrana) lleva a proponer a los gránulos de RNA como un puente entre los nucleoides y la traducción mitocondrial; una plataforma espaciotemporal que proporciona el procesamiento de los mtRNA, su maduración, el ensamblaje de los mitorribosomas y el inicio de la traducción (Jourdain et al., 2016).

El procesamiento de los policistrones sintetizados ocurre paralelamente a su síntesis (Amalric et al., 1978) y puede suceder de dos maneras: canónica y no canónica. El procesamiento canónico es el mayoritario y responde al modelo de puntuación (Ojala, Montoya, et al., 1981), según el que los tRNA suponen puntos de cortes endonucleótidos precisos a partir de los que se liberan ellos mismos y los transcritos presentes entre ellos (Figura 1.4). Las enzimas implicadas en esta función son: el complejo mtRNasa P<sup>57</sup>, compuesto por las subunidades proteicas MRPP1, MRPP2 y MRPP3, que actúa primero y corta en el extremo 5' de los tRNA; ELAC2 interviene después sobre el extremo 3' de los tRNA (Jedynak-Slyvka et al., 2021; S. Jiang et al., 2019; Jourdain et al., 2013). Por su parte, el procesamiento no canónico es el que tiene lugar en aquellos ORF que no se encuentran flanqueados por tRNA y que, por tanto, suponen una excepción al modelo de puntuación. Estos son: RNA14-COIII (entre ambos no hay separación), ND5-CYB (entre ambos hay separación, pero no es un tRNA, sino una secuencia complementaria a ND6) y ncRNA-ND6<sup>58</sup> (en el extremo 3' de ND6 no hay un tRNA) (Figura 1.4). Este tipo de procesamiento apenas se conoce, si bien se ha descrito que GRSF1<sup>59</sup> participa en el mismo (Jourdain et al., 2013), así como proteínas de la familia FASTK. Esta familia está formada por la propia FASTK y cinco homólogos de ella: FASTDK1, FASTKD2, FASTKD3, FASTKD4 y FASTKD5. Todas poseen el dominio RAP, que es con el que se ha sugerido que interactúan con el RNA, participan en etapas diferentes de la expresión génica, presentan dianas distintas y no todas se localizan en los gránulos de RNA (Jedynak-Slyvka et al., 2021). FASTKD4 y FASTKD5, especialmente esta última, son las que se han encontrado relacionadas con el procesamiento no canónico (Antonicka & Shoubridge, 2015; Ohkubo et al., 2021).

Una vez procesados, los transcritos generados (pre-mRNA, pre-rRNA, pre-tRNA y ncRNA) son sometidos a una serie de modificaciones para su maduración. Entre otras, la maduración de los rRNA incluye su metilación y la de los tRNA la adición de un triplete CCA en su extremo 3' (Pietras et al., 2018b). En el caso de los mRNA, la principal modificación que experimentan es la poliadenilación (Ojala, Montoya, et al., 1981), si bien también pueden metilarse o pseudouridilarse<sup>60</sup>. La enzima que lleva a cabo la adición de adeninas en el extremo 3' de los mRNA es la poli(A) polimerasa mitocondrial o MTPAP (Tomecki et al., 2004), mientras que la deadenilación es llevada a cabo por la PNPasa (Chujo et al., 2012; Nagaike et al., 2005).

---

<sup>57</sup> Al contrario que el complejo RNasa P nuclear, la mtRNasa P carece de ribozima (Holzmann et al., 2008).

<sup>58</sup> ATP8/ATP6 (RNA 14) y ND4L/ND4 (RNA 7) se consideran transcritos bicistrónicos con dos ORF solapados (Temperley et al., 2010). Por su parte, el extremo 5' de COI también sería uno de los candidatos a experimentar el procesamiento no canónico, pero se ha propuesto que, al ser complementario a un tRNA, también adquiere una estructura secundaria similar y, por tanto, se procesa por la mtRNasa P (Mercer et al., 2011; Sanchez et al., 2011).

<sup>59</sup> También se ha propuesto su participación en el procesamiento canónico, junto a la mtRNasa P (Jourdain et al., 2013).

<sup>60</sup> La metilación (m<sup>1</sup>A) previene la síntesis de proteínas, mientras que el papel de la pseudouridilación (conversión de uridina en pseudouridina) se desconoce (Jedynak-Slyvka et al., 2021).

La poliadenilación y su función en los mRNA cambia entre organismos: los mRNA mitocondriales de las levaduras no se poliadenilan; en procariotas y en las mitocondrias de las plantas la poliadenilación funciona como señal de degradación; en los núcleos de eucariotas impulsa su estabilización (Szczesny, Wojcik, et al., 2013; Toompuu et al., 2018; D. D.-H. Wang et al., 2014). En el caso de las mitocondrias humanas, la poliadenilación permite, por un lado, sintetizar los codones de terminación de la mayoría de los mRNA, ya que 7 de los 13 terminan en U o UA y así pasan a ser UAA (Ojala, Montoya, et al., 1981; Temperley et al., 2010; D. D.-H. Wang et al., 2014), mientras que, por otro, no se comprende del todo su papel sobre la estabilidad de los transcritos (D'Souza & Minczuk, 2018; Rorbach & Minczuk, 2012). Esto último se debe principalmente a que los mRNA mitocondriales, pese a que se consideren semejantes entre sí, presentan características particulares. Entre ellas, destaca el hecho de que la extensión de su cola poliadenilada es diferente entre ellos, e incluso para un mismo mRNA cambia entre líneas celulares y tejidos (Honarmand & Shoubridge, 2020; Temperley et al., 2010)<sup>61</sup>. Además, pese a que los RNA codificados por una misma hebra de mtDNA se sintetizan con la misma frecuencia, los mRNA presentan una estabilidad<sup>62</sup> (Nagao et al., 2008; Piechota et al., 2006) y niveles (Chujo et al., 2012) distintos entre sí, lo que se debe, entre otros factores, a su procesamiento y degradación (Jedynak-Slyvka et al., 2021; Szczesny, Wojcik, et al., 2013). A pesar de toda esta heterogeneidad, se considera que, en general, la adición de adeninas en su extremo 3' estabiliza a los mRNA mitocondriales con sentido, mientras que se ha sugerido que promueve la degradación de los ncRNA mitocondriales<sup>63</sup> (Chujo et al., 2012; Jedynak-Slyvka et al., 2021; Nagaike et al., 2005; Pajak et al., 2019).

Finalmente, la degradación de los transcritos es realizada por un complejo conocido como degradosoma, constituido por la PNPasa y la helicasa SUV3 (D. D.-H. Wang et al., 2009).

#### 1.4.4 PNPT1/PNPasa

La polinucleótido fosforilasa o PNPasa humana (conocida originalmente como hPNPasa<sup>old-35</sup> (Leszczyniecka et al., 2002)) es una proteína codificada por el gen nuclear *PNPT1* (polinucleótido nucleotidiltransferasa 1 mitocondrial; 2p16.1; transcrito primario con 4 549 nucleótidos y 28 exones), formada por 783 aminoácidos (Figura 1.12), muy conservada evolutivamente (dos Santos et al., 2018; G. Wang et al., 2012) y expresada en todos los tejidos (Falchi et al., 2022; G. Wang et al., 2012). La primera PNPasa descubierta fue la de la bacteria *Azotobacter vinelandii* por Marianne Grunberg-Manago, bajo la dirección de Severo Ochoa (Grunberg-Manago et al., 1955). Además, fue la primera enzima identificada capaz de sintetizar RNA *in vitro*, lo que se utilizó para descifrar el código genético y tuvo como consecuencia que Severo Ochoa ganase el Premio de Fisiología o Medicina en 1959 (dos Santos et al., 2018). Sin embargo, actualmente se encuentra ampliamente reconocido que la principal función de la

---

<sup>61</sup> Por ejemplo, el mRNA de ND5 presenta 0-8 adeninas en la línea Hep G2 (Temperley et al., 2010), mientras que en las células HEK293 tiene una media de 40 nucleótidos (Temperley et al., 2010), la misma que en el hígado (Honarmand & Shoubridge, 2020).

<sup>62</sup> Determinada por su nivel estacionario y vida media.

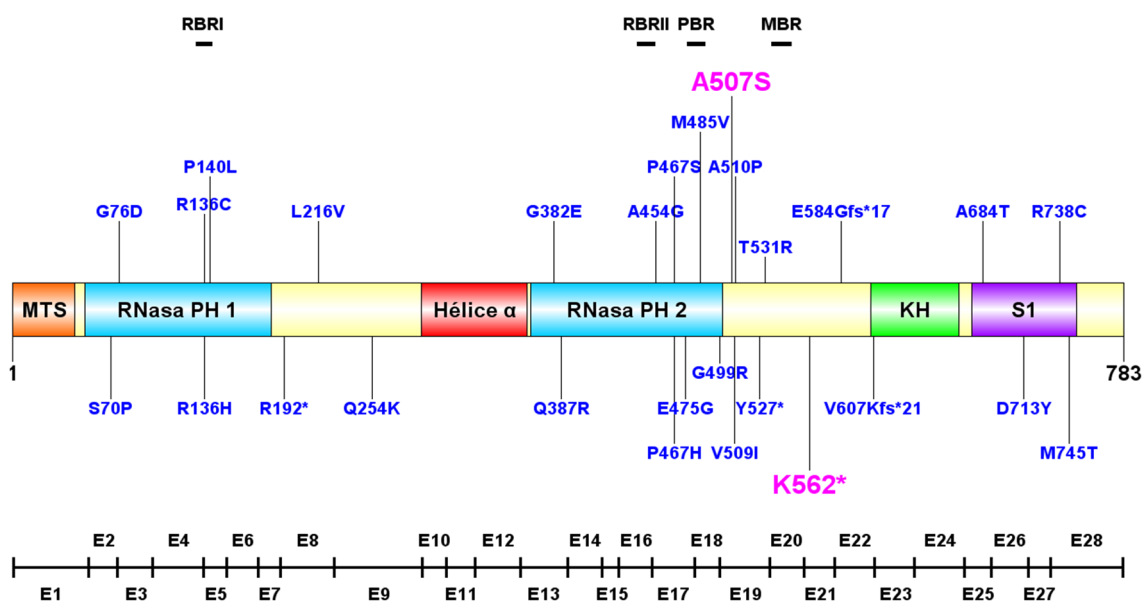
<sup>63</sup> Otro ejemplo en que supone una señal de degradación en las mitocondrias humanas: si los tRNA presentan una estructura anormal (tRNA<sup>L</sup> con la mutación patológica m.A3243G) o una disfuncionalidad (si se someten a células humanas a dosis más altas de EtBr de las necesarias para inhibir la transcripción), se produce una poliadenilación anormal de los mismos e interviene el degradosoma (Toompuu et al., 2018).



PNPasa en las células es la opuesta, esto es, degradar RNA<sup>64</sup>, lo que consigue por medio de su actividad 3'→5'-exorribonucleasa: añade al extremo 3' del RNA un grupo fosfato (Pi), que realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster y da lugar, por un lado, a la formación de un ribonucleósido 5'-difosfato y, por otro, a la cadena del RNA diana con un ribonucleótido menos tras cada reacción (Cameron et al., 2018).

#### 1.4.4.1 Estructura

La PNPasa funcional se organiza en un homotrímero<sup>65</sup> que se ensambla en una estructura en forma de anillo, similar a la de los exosomas (tanto de humanos como de arqueas), lo que sugiere un vínculo evolutivo desde el punto de vista estructural y funcional entre ambos complejos proteicos (Lin et al., 2012). Además, la actividad de la PNPasa se encuentra inhibida parcialmente por, al menos, una molécula de citrato (potencialmente dos). Ésta puede unirse a residuos del centro activo (incluidos los aminoácidos necesarios para la coordinación de los iones metálicos<sup>66</sup>) que se encuentran conservados evolutivamente en la PNPasa de procariontes, exosoma de arqueas y la PNPasa humana, lo que insinúa, en primer lugar, una conexión entre la degradación de los mtRNA y el metabolismo celular y, en segundo lugar, que este mecanismo de inhibición se emplea universalmente (Stone et al., 2017). Para más información sobre la estructura secundaria y terciaria de la PNPasa ver las Figuras 1.12 y 1.13.



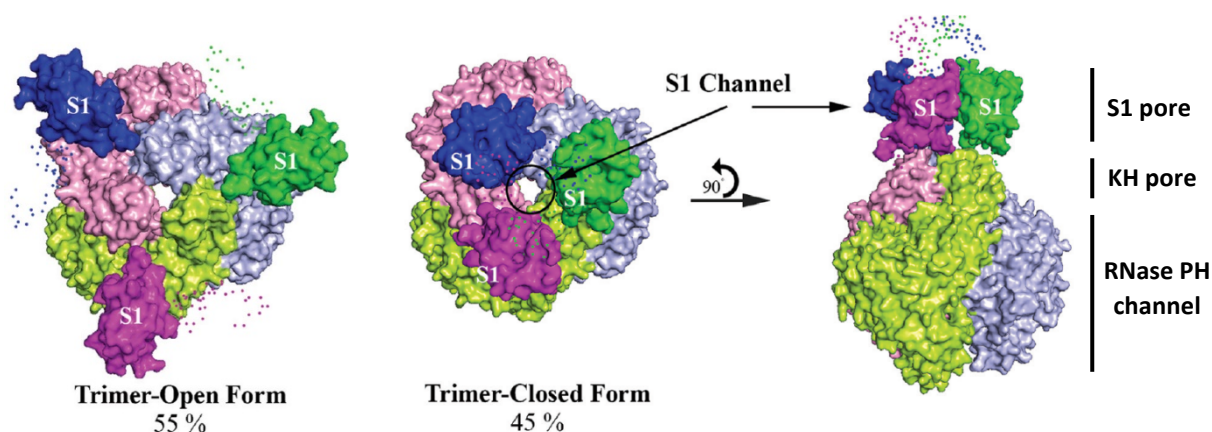
**Figura 1.12** (basada en (Sarkar et al., 2005)). Estructura secundaria de la PNPasa y mutaciones que afectan a la proteína. La PNPasa contiene diferentes dominios en su estructura secundaria: señal de localización mitocondrial (MTS en naranja; residuos 1-45); RNasa PH 1 y RNasa PH 2, también llamados Core 1 y Core 2 (en azul; residuos 52-183 y 366-501, respectivamente) separados por una hélice  $\alpha$  (en rojo; residuos 289-363); KH (en verde; residuos 605-667) y S1 (en morado; residuos 676-750), ambos dominios de unión a RNA (Golzarroshan et al., 2018; Lin et al., 2012). El centro activo está constituido por residuos de los

<sup>64</sup> Incluido RNA dañado por estrés oxidativo (Wu & Li, 2008).

<sup>65</sup> Las mutaciones p.Q387R (Vedrenne et al., 2012) y p.E475G (von Ameln et al., 2012) fueron las primeras descritas de la PNPasa humana y afectan a residuos implicados en la trimerización. Como resultado, se origina una proteína dimérmica no funcional (Golzarroshan et al., 2018).

<sup>66</sup> Para poder desempeñar su función, la PNPasa requiere de un cofactor metálico divalente:  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (Cameron et al., 2018).

dominios RNasa PH y presenta cuatro motivos: regiones de unión a RNA I y II (RBRI y RBRII; residuos 131-139 y 442-452, respectivamente); sitio de unión del grupo fosfato (PBR; residuos 477-487); punto de interacción con el ion metálico divalente (MBR; residuos 537-548<sup>67</sup>) (Stone et al., 2017). Las distintas mutaciones patológicas publicadas aparecen en azul (Grochowska et al., 2022; J. S. Lee et al., 2020), entre las que se incluye la p.A507S, mientras que en rosa se muestran las variantes que tiene el paciente analizado en la presente tesis doctoral. La longitud de los 28 exones (E1-E28) aparecen representada a escala 1:1. Figura elaborada con el software DOG 2.0 (Ren et al., 2009).



**Figura 1.13** (adaptada de (Golzarroshan et al., 2018)). Estructura y conformaciones que adopta el homotrímero de la PNPasa. Cada uno de los monómeros aparece representado en un color diferente. Los dominios RNasa PH, junto a la hélice  $\alpha$  situada entre ellas (Figura 1.12) constituyen un canal central, un anillo hexamérico, en que se encuentra el centro activo del complejo proteico (*RNase PH channel*). Por su parte, los dominios KH y S1 también forman poros (*KH pore* y *S1 pore*, respectivamente) y, como se indica en la Figura 1.12, son capaces de interactuar con moléculas de RNA. En concreto, los dominios KH se unen a ssRNA mediante los motivos conservados GXXG (internalizados en el poro; ausentes en exosomas), mientras que los S1 a dsRNA o RNA con una cierta estructura secundaria (bucle en forma de tallo). Mediante SAXS<sup>68</sup> se obtiene que los dominios S1 son flexibles y capaces de presentarse en una conformación cerrada o abierta (*Trimer-Closed Form* y *Trimer-Open Form*), según se encuentren interactuando con RNA o no, respectivamente: los S1 abiertos capturan RNA con cierta complejidad estructural, tras lo que experimentan un cambio conformacional y pasan a una formación cerrada y porosa. Cabe destacar que, a pesar de que el homotrímero es capaz de unirse a RNA con estructuras secundarias, no puede degradarlas, ya que el canal no tiene la anchura suficiente y el centro activo sólo acomoda ssRNA. Además, la PNPasa es incapaz de metabolizar RNA menores de 4-5 nucleótidos, ya que carecen de la longitud adecuada en su extremo 3' para que éste pueda atravesar el complejo y llegar hasta el centro activo (Falchi et al., 2022; Golzarroshan et al., 2018; Jeandard et al., 2019; Lin et al., 2012).

#### 1.4.4.2 Localización

La PNPasa se localiza principalmente en las mitocondrias, si bien también puede encontrarse en el citosol en determinadas condiciones (Cameron et al., 2018; Falchi et al., 2022; Sarkar & Fisher, 2006). En concreto, durante la diferenciación terminal y la senescencia se produce una cascada de señalización inducida por interferones de tipo I, como el IFN- $\beta$ , que deriva en que se produzca una mayor expresión de *PNPT1* y, como consecuencia, un arresto del

<sup>67</sup> Stone et al. consideran que MBR se encuentra dentro del dominio RNasa PH 2 (Stone et al., 2017).

<sup>68</sup> Técnica que, al igual que la cristalografía de rayos X, se basa en la dispersión de rayos X, pero que no requiere de la formación de cristales. Se realiza principalmente en los sincrotrones, ya que estos permiten generar rayos X duros. Ofrece una resolución menor que la cristalografía de rayos X y suele utilizarse como complemento de la misma.

ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>. Esto se debe a que la PNPasa citosólica degrada, por un lado, al mRNA de *c-myc*<sup>69</sup> (específicamente<sup>70</sup>), que se traduciría en un factor de transcripción que promueve la proliferación celular mediante el paso de la fase G<sub>1</sub> a la S<sup>71</sup> (Sarkar et al., 2003, 2006) y, por otro, a diversos miRNA, especialmente a miR-221, cuya diana es el inhibidor del ciclo celular p27<sup>Kip1</sup> (Das et al., 2010). Además, durante la apoptosis (vía intrínseca) se produce la salida de la PNPasa mitocondrial al citoplasma, donde comienza y promueve la degradación de RNA poliadenilados y otros transcritos cuyos extremos 3' no se encuentren protegidos por estructuras secundarias (Falchi et al., 2022; Liu et al., 2018).

En cuanto a la localización mitocondrial de la PNPasa, a lo largo de los años se ha publicado información contradictoria: hay autores que consideran que la PNPasa se localiza en el IMS (Chen et al., 2006), otros en la matriz mitocondrial (Rhee et al., 2013) y también están los que proponen su ubicación en ambos compartimentos submitocondriales (Szczesny, Wojcik, et al., 2013), que es lo más aceptado actualmente (Cameron et al., 2018; Falchi et al., 2022; Grochowska et al., 2022). La principal función atribuida a la PNPasa en el IMS ha sido el importe de los RNA citosólicos a la matriz mitocondrial, especialmente del 5S rRNA, la ribozima de la RNasa P (RNA H1) y el RNA 7-2, también llamado MRP RNA (G. Wang et al., 2010). Sin embargo, la presencia de estos RNA en la matriz mitocondrial es cuestionable por diversos motivos (Gammage et al., 2018):

- RNA citosólicos, en general: el mtDNA posee la información genética necesaria para poder traducir las 13 subunidades del sistema OXPHOS que codifica. A esto se le suma el hecho de que muchas proteínas de localización mitocondrial se traducen en polisomas unidos a la OM (Montoya, 2005), por lo que existe un cúmulo de mRNA procedentes del núcleo muy próximos a las mitocondrias y susceptibles de captarse en los experimentos.
- 5S rRNA: considerado inicialmente para constituir los mitorribosomas, junto a los rRNA 12S y 16S y las MRP. Se ha demostrado que es el tRNA<sup>V</sup> (o el tRNA<sup>F</sup>, en caso de que los niveles del tRNA<sup>V</sup> sean reducidos) el que ocupa su lugar (Amunts et al., 2015; Rorbach et al., 2016), lo que coincide con que los rRNA 12S y 16S y los tRNA<sup>F</sup> y tRNA<sup>V</sup> se expresen bajo un mismo promotor (HSP1), como se ha indicado en el apartado 1.4.1.
- RNA H1: propuesto para formar parte de la mtRNasa P, debido a su presencia en el complejo RNasa P nuclear. Sin embargo, la mtRNasa es completamente funcional sólo con sus tres subunidades proteicas MRPP1-3 (Holzmann et al., 2008).
- RNA 7-2: RNA del complejo RNasa MRP. Este complejo se encuentra relacionado con la RNasa P nuclear, fue originalmente descrito como mitocondrial e implicado en la formación del *primer* para la replicación del mtDNA, pero que posteriormente se ha visto que se localiza en los nucleolos (Jacobson et al., 1995; Kiss & Filipowicz, 1992), que su función es la de procesar los pre-rRNA (Goldfarb & Cech, 2017) y que otras proteínas son las se encargan de sintetizar el *primer* (mencionadas en el apartado 1.3.3).

<sup>69</sup> Pertenece a la familia de los genes *Myc*, compuesta también por *l-myc* y *n-myc*.

<sup>70</sup> No degrada otros transcritos como los mRNA de la *GAPDH* o de *c-jun*. Se desconoce por qué (Sarkar et al., 2003).

<sup>71</sup> La primera vez que se identificó a la PNPasa humana fue precisamente en el contexto de la senescencia y la diferenciación terminal (Leszczyniecka et al., 2002).

Debido a todo lo anterior, así como a la sugerencia de que tal vez la PNPasa en el IMS sólo actúa como almacenamiento (Slomovic & Schuster, 2008)<sup>72</sup>, está tomando cada vez más fuerza otro papel de la PNPasa en el IMS: actuar como última línea de defensa para evitar la salida de los dsRNA al citoplasma (Dhir et al., 2018; Grochowska et al., 2022). Dicha función se explica con mayor detalle en el apartado siguiente 1.4.4.3.

Finalmente, la PNPasa situada en la matriz puede actuar por sí sola o formar parte del degradosoma.

### 1.4.4.3 Degradosoma

En la matriz mitocondrial, la PNPasa es capaz de degradar ssRNA y de interactuar con dsRNA, pero no de degradar estos últimos, tal y como aparece indicado en el pie de la Figura 1.13. Por su parte, la helicasa SUV3 (codificada por el gen *SUPV3L1*), dependiente de ATP, se localiza en la matriz mitocondrial (Minczuk et al., 2002) y es capaz de desenrollar moléculas de dsDNA, dsRNA e híbridos DNA/RNA (Shu et al., 2004), siendo su acción sobre los dsRNA su función más caracterizada (Jain et al., 2022). La PNPasa homotrímica es capaz de interactuar con la SUV3 homodimérica<sup>73</sup> mediante sus dominios S1 (Jain et al., 2022), constituyendo un complejo heteropentamérico de 330 kDa que recibe el nombre de degradosoma o mtEXO (D. D.-H. Wang et al., 2009, 2014). Gracias a esta asociación, la PNPasa también puede metabolizar RNA con una estructura más compleja, ya que éstos son desenrollados previamente por SUV3. Además, el degradosoma se caracteriza por presentar su propia localización dentro de la matriz mitocondrial, que recibe el nombre de D-foci<sup>74</sup> (Borowski et al., 2013; Figura 1.9) y colocaliza tanto con los gránulos de RNA como con los nucleoides (Pietras et al., 2018b). Esto coincide con el papel del degradosoma de regular los niveles de los RNA presentes en los gránulos, así como el del cúmulo de los *R-loop*<sup>75</sup> (Silva et al., 2018), respectivamente.

El degradosoma no actúa exclusivamente por sí sólo, sino que también puede asociarse con otras proteínas, causando una estrecha relación entre la estabilidad de los mRNA, su poliadenilación y la degradación de los ncRNA (Pajak et al., 2019). Dos proteínas con las que se ha descrito que puede interactuar son GRSF1 y la poli(A) polimerasa mitocondrial. GRSF1 se trata de una proteína con alta afinidad por los RNA ricos en guaninas (Qian & Wilusz, 1994) y que se une preferentemente a los transcritos de la cadena ligera<sup>76</sup> (Antonicka et al., 2013). Además, como se ha comentado en el apartado 1.4.2, las secuencias con alto contenido en guaninas

---

<sup>72</sup> Los autores proponen que tal vez simplemente permanece allí hasta que es liberada durante la apoptosis.

<sup>73</sup> SUV3 monomérica es activa, pero menos que la dimérica y no es capaz de interactuar con la PNPasa (Jain et al., 2022).

<sup>74</sup> El término D-foci viene de lugar que contiene degradosomas (Borowski et al., 2013).

<sup>75</sup> Además del *R-loop* que actúa como *primer* para la replicación, se pueden formar otros *R-loop* a lo largo del mtDNA durante la transcripción, en caso de que la hebra de RNA que se está sintetizando vuelva a unirse al DNA. Si estos *R-loop* no son eliminados pueden provocar que la propia maquinaria de la transcripción del mtDNA se atasque, así como el replisoma, es decir, generar una inestabilidad genómica que puede causar enfermedades. El degradosoma influye sobre los niveles de los *R-loop*, lo que se ha propuesto que puede realizar mediante la degradación de los RNA antes de que vuelvan a hibridarse o eliminándolos una vez formados (desenrollándolos mediante SUV3) y complementando así, en este último caso, a la RNasa H1 (Silva et al., 2018).

<sup>76</sup> Dado que la cadena pesada presenta un mayor contenido en guaninas, los transcritos de la cadena ligera serán los que tengan más cantidad de estas bases nitrogenadas.

pueden plegarse en las *G-quadruplex*, lo que coincide con que se predigan numerosas G4 en los transcritos de la cadena ligera (Falabella et al., 2019) y que GRSF1 sea capaz de reconocerlas y de actuar sobre las mismas. En particular, lo que hace GRSF1 es derretir a las *G-quadruplex*, generando estructuras secundarias menos complejas que pueden ser reconocidas y procesadas posteriormente por el degradosoma (Figura 1.14). Los ncRNA, ya mencionados en apartados anteriores, son sobre los que más influye este proceso debido a su naturaleza: son RNA antisentido (complementarios a los codificantes), producidos, sobre todo, al transcribirse la cadena ligera del mtDNA<sup>77</sup> ((Pietras et al., 2018b); puede apreciarse en la Figura 1.4) y que, en situación fisiológica, son degradados rápidamente (Borowski et al., 2013; Dhir et al., 2018; Grochowska et al., 2022; Pietras et al., 2018a).

Por su parte, la interacción de la poli(A) polimerasa mitocondrial con el degradosoma permite la regulación de la extensión de las colas poliadeniladas en función de las demandas energéticas, concretamente, según la ratio Pi/ATP: a baja ratio (más ATP) el complejo promueve la longitud de las colas poliadeniladas, mientras que conforme la ratio sea más alta (más Pi) se promueve el corte de dichas colas, liberándose ADP. En este proceso, SUV3 actúa como elemento conector entre ambas proteínas y, en el caso de la MTPAP, favorece su actividad, ya que la helicasa actúa como un dominio robusto de unión a ssRNA para la polimerasa<sup>78</sup> (Clemente et al., 2015; D. D.-H. Wang et al., 2009, 2014)<sup>79</sup>. Además, está el hecho de que la proteína LRPPRC constituye un complejo proteico junto a SLIRP, que estabiliza a los mRNA, promueve su poliadenilación e impide su degradación por el degradosoma, actuando como una barrera física (Chujo et al., 2012; Gohil et al., 2010; Jacobs & Turnbull, 2005; Pajak et al., 2019; Ruzzenente et al., 2012). Sin embargo, no ocurre esto con los ncRNA, de los que se ha sugerido que no son reconocidos por LRPPRC (Siira et al., 2017). Todo ello, junto a que se ha propuesto que los ncRNA pueden llegar a oligoadenilarse en su extremo 3'<sup>80</sup>, ha llevado a elaborar el siguiente modelo para tratar de explicar el metabolismo de la poliadenilación mitocondrial (Pajak et al., 2019; D. D.-H. Wang et al., 2014):

- **mRNA**: primero se produce una oligoadenilación de los mRNA por parte de MTPAP, después se estabilizan por LRPPRC y, finalmente, se produce la poliadenilación, mediada también por MTPAP e impulsada por SUV3. En caso de que la ratio Pi/ATP sea alta se promueve la deadenilación por la PNPasa y la posterior degradación de los transcritos.
- **ncRNA**: en primer lugar, se lleva a cabo una oligoadenilación de los ncRNA mediante MTPAP (como para los mRNA), pero, dado que no son reconocidos por el complejo LRPPRC/SLIRP, en situación fisiológica son degradados rápidamente por el degradosoma, junto a GRSF1.

<sup>77</sup> Aproximadamente, el 90 % y 9 % de los transcritos de la cadena ligera y de la pesada son ncRNA, respectivamente (Pietras et al., 2018b).

<sup>78</sup> SUV3 es capaz de esto porque habitualmente interactúa con una región de cadena simple, adyacente al dúplex, antes de desenrollar el ácido nucleico diana (Jain et al., 2022).

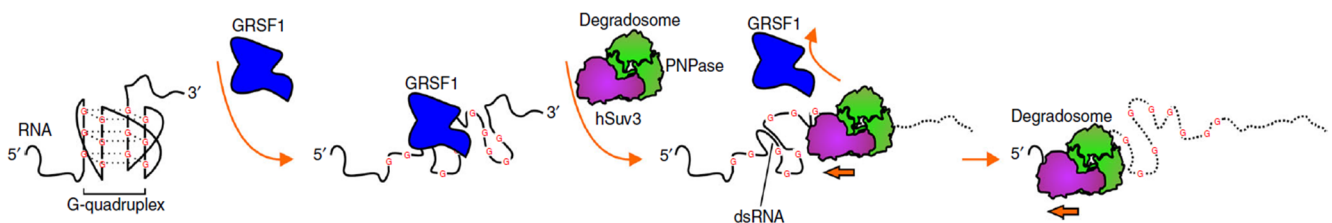
<sup>79</sup> Teniendo en cuenta la actividad de cada enzima, las conclusiones a las que, en particular, llegan Wang et al. son las esperables: MTPAP utiliza ATP como sustrato, de modo que a mayores niveles de ATP se promueve la poliadenilación, mientras que la PNPasa emplea Pi como sustrato, luego a mayor cantidad del mismo se favorece la deadenilación.

<sup>80</sup> El ncRNA de COI presenta de media 5 adeninas en su extremo 3' (Pajak et al., 2019).



En relación con lo anterior, la función más reciente propuesta para el degradosoma, y que también ha sido analizada en pacientes con mutaciones en *PNPT1*, es la de regular los niveles de los dsRNA para prevenir la activación de una respuesta inmune innata: en caso existir pérdida de la PNPasa o de SUV3, se ha descrito que se produce un cúmulo masivo de dsRNA en la mitocondria<sup>81</sup>. Esto se debe, por un lado, a que los ncRNA de la matriz no se degradan rápidamente y, por tanto, interactúan con sus RNA complementarios (aumentando así los niveles de dsRNA); por otro, el degradosoma alterado, que degrada los dsRNA en condiciones fisiológicas, no es capaz de regular los niveles de los mismos. Además, sólo en caso de haber una carencia de la PNPasa se produce la salida de estos dsRNA mitocondriales al citoplasma (se estima que vía BAK/BAX), en que actúan como alarminas y estimulan una respuesta de IFN de tipo I<sup>82</sup>. Por todo ello, actualmente la principal función propuesta para la PNPasa en el IMS es la de actuar como una última barrera de protección frente a la salida de los dsRNA al citoplasma, ya sea como mero almacenamiento (uniéndose a ellos por sus dominios S1), o degradándolos, junto a una helicasa por el momento desconocida (Bamborschke et al., 2021; Dhir et al., 2018; Grochowska et al., 2022; Jedynak-Slyvka et al., 2021; Pennisi et al., 2022; Rius et al., 2019).

Para finalizar, dado que la PNPasa no es capaz de degradar RNA con menos de 4-5 nucleótidos (información expuesta con anterioridad en el pie de la Figura 1.13) debe intervenir, al menos, otra enzima para terminar de metabolizarlos. Esta proteína es REXO2 (Figura 1.9) que presenta actividad 3'→5'-exonucleasa y está implicada en la degradación de mtRNA cortos<sup>83</sup>, tanto los producidos por el degradosoma como los generados durante el procesamiento de los mtRNA. Con su acción contribuye, entre otros, a mantener bajos los niveles de los RNA antisentido y de los dsRNA, así como a regular la transcripción mitocondrial<sup>84</sup> (Nicholls et al., 2019; Szewczyk et al., 2020; Xavier & Martinou, 2021). Como resultado de su actividad, se generan monorribonucleótidos que pueden volver a utilizarse para iniciar la replicación o la transcripción mitocondrial.



**Figura 1.14** (recortada de Pietras2018b). Degradación de estructuras *G-quadruplex* por GRSF1 y el degradosoma. GRSF1 reconoce a las G4 y las derrite, dejando unas estructuras menos complejas (dsRNA). Posteriormente, SUV3 favorece la disociación de GRSF1 del RNA y, junto a la PNPasa, lleva a cabo la degradación de dicho transcrito. Al ser necesaria SUV3 para que GRSF1 deje de estar unida al RNA, no es

<sup>81</sup> Incluidos de gran tamaño: entre 1-6 kb (Dhir et al., 2018).

<sup>82</sup> En consecuencia, y dada la información ofrecida a lo largo de la sección *Introducción*, se puede considerar que existe una estrecha relación entre la PNPasa y los IFN de tipo I: por, un lado, estos IFN pueden inducir una mayor expresión de *PNPT1* para secuestrar el ciclo celular, mientras que, por otro, el déficit de la PNPasa puede desencadenar una respuesta de IFN de tipo I.

<sup>83</sup> Conforme la cadena de ribonucleótidos es menor, REXO2 presenta una mayor actividad, actuando especialmente sobre los dinucleótidos. Esto sugiere que ella misma es capaz de regularse o que existe otra RNasa, por el momento desconocida, entre el degradosoma y REXO2 (Nicholls et al., 2019).

<sup>84</sup> Los dinucleótidos pueden utilizarse como *primers* para iniciar la transcripción de forma inespecífica, es decir, con independencia de los promotores, lo que deriva en una desregulación de la transcripción mitocondrial (Nicholls et al., 2019).

posible la asociación de GRSF1 exclusivamente con la PNPasa, ya que la primera supondría un obstáculo para la segunda.

## 1.5 Enfermedades mitocondriales

### 1.5.1 Características generales<sup>85</sup>

Las enfermedades mitocondriales son un conjunto de desórdenes metabólicos y genéticos en que se ve comprometida la funcionalidad de las mitocondrias, incluyendo la actividad del sistema OXPHOS, y cuya etiología puede residir tanto en mutaciones<sup>86</sup> en el mtDNA como en el nDNA<sup>87</sup> (Calvo & Mootha, 2010; Parikh et al., 2019). Además, son enfermedades hereditarias, pueden transmitirse por cualquier vía (por herencia autosómica recesiva, autosómica dominante, ligada al cromosoma X, materna y esporádica o *de novo* (Bellusci et al., 2021; Schon et al., 2020)), constituyen el grupo más genéticamente diverso de todos los errores congénitos del metabolismo y, dentro de este grupo, se encuentran entre las enfermedades más comunes y, a la vez, más complejas<sup>88</sup> (Kohda et al., 2016; Lightowlers et al., 2015; Smeitink et al., 2001).

La prevalencia de las enfermedades mitocondriales varía según la población y el espacio temporal estudiados (Gorman et al., 2016; Rusecka et al., 2018). Sin embargo, en su conjunto, se tratan de enfermedades raras porque en todos los casos su frecuencia es menor a 1:2 000 habitantes, que es la definición legal establecida por la Comisión Europea<sup>89</sup>. De hecho, por separado, la gran mayoría de cada una de las enfermedades mitocondriales son consideradas ultra-raras, es decir, presentan una frecuencia menor de 1:50 000 habitantes (Murayama et al., 2019). Además, son enfermedades que afectan tanto a niños como a adultos (mayores de 16 años), si bien su prevalencia entre ambos grupos es diferente (Lightowlers et al., 2015; Thompson et al., 2020). En España, las enfermedades mitocondriales son más frecuentes entre los niños (Bellusci et al., 2021), que padecen con mayor asiduidad mutaciones en el nDNA,

---

<sup>85</sup> La investigación de las patologías mitocondriales se inició a raíz de la identificación de deleciones del mtDNA en pacientes con miopatías (Holt et al., 1988).

<sup>86</sup> Lo recomendable es hablar de “variante” como término general (Richards et al., 2015), si bien a lo largo de la presente memoria a veces se emplea dicho término y el de “mutación” como sinónimos. En el mtDNA, los cambios inocuos reciben el nombre de polimorfismos y marcan los diferentes haplogrupos, mientras que las alteraciones patológicas se denominan mutaciones. En cambio, en el nDNA las variantes se clasifican en polimorfismos o mutaciones según su incidencia en la población (mutación si su frecuencia es inferior al 1 % y polimorfismo si es superior al 1 %), por lo que una mutación no necesariamente tiene por qué ser patológica.

<sup>87</sup> También puede haber una combinación de variantes en ambos genomas, especialmente, al existir mutaciones primarias en genes nucleares implicados en el metabolismo del mtDNA (Schon et al., 2020).

<sup>88</sup> La mayoría de estos errores innatos del metabolismo tienen fácil detección, ya que suelen estar asociados a la alteración de uno o varios metabolitos específicos. En cambio, en las enfermedades mitocondriales pueden encontrarse una gran variedad de metabolitos afectados (Esterhuizen et al., 2017).

<sup>89</sup> A su vez, la definición de enfermedad rara también cambia entre poblaciones. En Japón se considera enfermedad rara a aquella que afecta a menos de 50 000 personas, mientras que en EEUU a menos de 200 000 personas.

mientras que los adultos en el mtDNA. Esto último, coincide con otros estudios poblacionales (Gorman et al., 2015; Kohda et al., 2016).

En cuanto a su complejidad, las enfermedades mitocondriales se caracterizan por ser muy heterogéneas, tanto genéticamente, como ya se ha indicado, como clínicamente. Desde el punto de vista clínico, el fenotipo difiere entre los pacientes y suele involucrar a múltiples órganos y sistemas. A pesar de esta variabilidad, los órganos más afectados suelen ser los que requieren una mayor demanda energética, como el cerebro, el músculo esquelético y el corazón. Además, los efectos de las enfermedades mitocondriales pueden clasificarse en neurológicos y no neurológicos, así como en función de los órganos involucrados, pudiendo experimentar los pacientes algunas de las siguientes manifestaciones clínicas (Gorman et al., 2016; Murayama et al., 2019; Rusecka et al., 2018):

- Neurológicos:
  1. Cerebro: accidente cerebrovascular relacionado con convulsiones/accidente cerebrovascular metabólico, epilepsia, ataxia, migrañas, demencia, parkinsonismo, retraso en el desarrollo y desorden de ánimo o psiquiátrico.
  2. Oído: pérdida auditiva neurosensorial.
  3. Vista: ptosis, oftalmoplejía externa progresiva, atrofia óptica y retinitis pigmentosa.
  4. Músculo esquelético: miopatía e intolerancia al ejercicio.
- No neurológicos:
  1. Pulmones: fallo respiratorio.
  2. Corazón: cardiomiopatía.
  3. Hígado: fallo hepático.
  4. Riñón: síndrome de Fanconi, acidosis tubular renal, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, fallo renal e insuficiencia adrenal.
  5. Páncreas: diabetes mellitus y pancreatitis.
  6. Intestino: pseudobstrucción intestinal, dismotilidad gastrointestinal, atrofia vellositaria crónica y fracaso para prosperar.
  7. Órganos reproductores: insuficiencia ovárica primaria e infertilidad masculina.
  8. Huesos: cifoescoliosis, estatura corta e insuficiencia de la médula ósea.

Finalmente, desde el punto de vista genético, existen múltiples factores que contribuyen a la heterogeneidad de las enfermedades mitocondriales, además de su doble origen genómico:

- Pleiotropía: una misma mutación o mutaciones diferentes en un mismo gen puede dar lugar a fenotipos distintos. Un ejemplo de mutación es la m.3243A>G del mtDNA (puede causar MELAS, MIDD o PEO) (Nesbitt et al., 2013) y de gen es *PNPT1*, junto a las múltiples mutaciones descritas en él (Grochowska et al., 2022).
- Heterogeneidad de locus: mutaciones en distintos genes pueden dar lugar a una misma enfermedad mitocondrial. Un ejemplo es la enfermedad de Leigh, la más común entre las enfermedades mitocondriales (Craven et al., 2017; Fang et al., 2017; Schon et al., 2020; Smeitink et al., 2001), que puede estar causada por 75 genes (tanto del mtDNA como del nDNA), entre los que también se encuentra *PNPT1* (Dhir et al., 2018; J. S. Lee et al., 2020; Matilainen et al., 2017; Pennisi et al., 2022).



- **Toxicidad:** hay mutaciones que permanecen latentes hasta que se manifiestan por un agente externo, como un fármaco. Un ejemplo es la mutación m.1555A>G, que causa ototoxicidad ante la administración de aminoglucósidos<sup>90</sup> (Pacheu-Grau et al., 2010).
- **Homoplasma, heteroplasma y efecto umbral:** en caso de que todas las copias de mtDNA sean iguales, se habla de homoplasma. Sin embargo, lo habitual es que el mtDNA presente variantes entre las mitocondrias de una célula, tejido o individuo (e incluso dentro de una misma mitocondria), lo que recibe el nombre de heteroplasma. Eso sí, las enfermedades mitocondriales cuya etiología resida en mutaciones en el mtDNA, no se manifiestan sólo porque exista heteroplasma; hay un determinado efecto umbral, es decir, debe haber un mínimo de copias mutadas del mtDNA a partir del que aparece la enfermedad. Este umbral depende de cada tejido, individuo e incluso de la mutación, pero, en general, suele ser un 60-80 % de copias de mtDNA mutadas<sup>91</sup> (López-Pérez & Montoya, 2012; Rusecka et al., 2018; Schon et al., 2020; Zeviani & Viscomi, 2022).
- **Haplogrupo:** según su haplogrupo, un individuo puede ser más susceptible de padecer una enfermedad mitocondrial, como ocurre en la LHON (Hudson et al., 2007; Wei et al., 2017), así como otras patologías (Gallardo et al., 2012).
- **Segregación mitótica:** cuando una célula se divide, las mitocondrias presentes se reparten al azar entre las dos células hijas. Este hecho resulta de especial relevancia durante el desarrollo embrionario, ya que se parte de un cigoto con el mismo grado de heteroplasma que el del oocito maduro<sup>92</sup>, pero, en las sucesivas divisiones, la segregación mitótica puede generar que haya un tejido con un mayor porcentaje de heteroplasma que otro y, según el efecto umbral de dicho tejido, llevar a que se manifieste una enfermedad mitocondrial, como se ha comentado previamente<sup>93</sup> (Craven et al., 2017; Gustafsson et al., 2016).
- **Tasa de mutación:** el mtDNA muta hasta 10 veces más que el nDNA (Brown et al., 1979), lo que, entre otros factores, se debe a que sus sistemas de reparación no son suficientes para contrarrestar el daño oxidativo que experimenta por parte de las ROS (Craven et al., 2017; Tuppen et al., 2010).

### 1.5.2 Clasificación: etiología genética

El proteoma mitocondrial, o mitoproteoma, es el conjunto de proteínas localizadas en las mitocondrias y que desempeñan una determinada función en las mismas. Está constituido por 1 136 proteínas (Rath et al., 2021), de las que 13 son las codificadas por el mtDNA y el resto lo están por el nDNA. Potencialmente, fallos en cualquiera de todas estas proteínas podrían

<sup>90</sup> La mutación afecta al gen *MT-RNR1*, que codifica para el rRNA mitocondrial 12S: genera un cambio estructural en dicho rRNA que lo hace más susceptible a la acción de los antibióticos.

<sup>91</sup> La LHON es un ejemplo de excepción a esta regla, ya que el 90 % de los pacientes con esta enfermedad sólo la desarrollan en caso de tener en homoplasma una de las tres mutaciones siguientes: m.3460G>A, m.11778G>A o m.14484T>C (Craven et al., 2017; Lightowlers et al., 2015).

<sup>92</sup> Entre los oocitos maduros también puede existir un grado de heteroplasma distinto debido a la segregación mitótica que experimentan a partir de una célula germinal primordial. Este efecto se define como cuello de botella (Gorman et al., 2016).

<sup>93</sup> A este cambio de proporción entre las copias de mtDNA sanas y mutadas contribuye la propia replicación del mtDNA, ya que éste se renueva/duplica de forma independiente al ciclo celular, e incluso lo hace en células que no se dividen (J. B. Stewart & Chinnery, 2015).

derivar en una disfuncionalidad mitocondrial, pero, por el momento, sólo se han identificado como responsables de patologías mitocondriales entre 300 y 400 genes (se encuentran en continuo aumento), entre los que se incluyen genes nucleares del mitoproteoma y 35-37 genes del mtDNA<sup>94</sup> (Craven et al., 2017; Frazier et al., 2019; Rahman, 2020; Thompson et al., 2020).

Existen diferentes formas en que pueden agruparse los genes causantes de las enfermedades mitocondriales. Dos de ellas: si están codificados por el mtDNA o el nDNA (Thompson et al., 2020); en función de su relación con el sistema OXPHOS (Frazier et al., 2019). En esta segunda clasificación, los genes se separan en dos grupos, divididos a su vez en varias categorías:

- Implicados directamente en la biogénesis del sistema OXPHOS (mtDNA y nDNA):
  1. Síntesis de complejos del sistema OXPHOS, factores de ensamblaje y transportadores de electrones.
  2. Mantenimiento del mtDNA, incluida la homeostasis de los nucleótidos.
  3. Expresión del mtDNA, que incluye la síntesis, el procesamiento y la modificación de los mtRNA; biogénesis de los ribosomas mitocondriales; traducción.
- Impacto indirecto en el sistema OXPHOS y/o cumplen otras funciones (nDNA):
  4. Biogénesis de cofactores enzimáticos (incluidos los grupos ferrosulfurados).
  5. Homeostasis y control de la calidad mitocondrial, que abarcan el importe de proteínas a las mitocondrias, modificación lipídica, morfología mitocondrial (fusión, fisión y organización de las crestas mitocondriales), control de calidad de proteínas mitocondriales anormales y mecanismos de apoptosis y autofagia.
  6. Metabolismo energético relacionado con el sistema OXPHOS, en que se incluye el ciclo de Krebs, el metabolismo del piruvato y el transporte de metabolitos.

Por su parte, las mutaciones que causan enfermedades mitocondriales pueden clasificarse, a su vez, en tres tipos (Craven et al., 2017):

- Mutaciones puntuales en genes que codifican para proteínas.
- Mutaciones puntuales en genes involucrados en la síntesis de proteínas: codificantes para tRNA o rRNA.
- Reordenamientos del mtDNA, incluyendo deleciones e inserciones.

Todos los genes de los pacientes estudiados en la presente tesis doctoral están codificados por el nDNA, presentan variantes puntuales y se explican con mayor detenimiento en el apartado 2.1. De estos genes, *CARS2*, *FARS2*, *PNPT1* y *POLRMT* están relacionados directamente con el sistema OXPHOS y, en particular, se encuentran en la tercera categoría (Lightowers et al., 2015; Oláhová et al., 2021). Por su parte, la función exacta de *FBXL4* se desconoce, si bien participa en la homeostasis mitocondrial y, por tanto, se agruparía en la quinta categoría (Gorman et al., 2016; Lightowers et al., 2015). Finalmente, *TEFM* se encontraría

---

<sup>94</sup> Se han reportado mutaciones patológicas en los 37 genes del mtDNA. Sin embargo, en la literatura hay autores que no incluyen al gen *MT-COIII* y/o al gen *MT-RNR2* como responsables de enfermedades mitocondriales; consideran que no existe evidencia de su patogenicidad lo suficientemente validada (Lott et al., 2013). Por ejemplo, Frazier et al. no incluyen ni a *MT-COIII* ni a *MT-RNR2*; Craven et al. no consideran a *MT-RNR2*; Thompson et al. hablan de 36-37 genes del mtDNA; Rahman cuenta los 37 genes.

en la tercera categoría, pero no se han descrito mutaciones en el mismo y, por tanto, tampoco se ha asociado con ninguna enfermedad mitocondrial.

### 1.5.3 Diagnóstico: NGS y comprobación funcional

La gran heterogeneidad de las enfermedades mitocondriales y sus similitudes fenotípicas con otras enfermedades<sup>95</sup> dificultan elaborar un diagnóstico de los pacientes, hasta el punto de poder tardar años y no llegar a una respuesta concluyente (Grier et al., 2018). Tradicionalmente, en pacientes con un fenotipo clínico que sugiere una enfermedad mitocondrial se han realizado, entre otros, test bioquímicos específicos<sup>96</sup>, neuroimágenes, ensayos histológicos (detección de fibras rojo rasgadas) y diagnósticos genéticos (Fang et al., 2017; Murayama et al., 2019). En estos últimos ensayos destaca la aparición de las NGS, técnicas de secuenciación masiva que se han utilizado en el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales desde 2009 (Fang et al., 2017). Su implementación y uso progresivo ha incrementado significativamente la capacidad de diagnóstico genético de estas enfermedades frente a la secuenciación de Sanger tradicional (Parikh et al., 2019; Wortmann et al., 2015), hasta el punto de que, de los 300-400 genes asociados con enfermedades mitocondriales, aproximadamente la mitad ha sido gracias a las NGS<sup>97</sup>, todos ellos del nDNA (Thompson et al., 2020). Dicho de otro modo, estas técnicas han sido y están siendo vitales en la identificación de genes que codifican para el mitoproteoma y que al experimentar mutaciones patológicas conducen a una enfermedad mitocondrial de origen nuclear (Bellusci et al., 2021; Lightowlers et al., 2015; Schon et al., 2020).

Existen diferentes tipos de NGS que pueden aplicarse en el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales: paneles de genes, WES, WGS y otros análisis ómicos, como la RNA-seq (Frazier et al., 2019). Todas ellas se caracterizan porque pueden llevarse a cabo individualmente (sólo del paciente), en trío (se secuencian tanto al paciente como a sus progenitores) e incluso en cuarteto (en caso de tener un hermano e incluirse) y sucesivos (Wortmann et al., 2015). En concreto, los paneles permiten analizar mutaciones en un conjunto determinado de genes, la WES en todo el exoma<sup>98</sup> y la WGS en el genoma completo de un individuo (Schon et al., 2020). Por ello, los paneles suelen emplearse como herramienta de cribado y, en caso de no detectar ninguna variante, se realiza una WES para, finalmente, si sigue sin identificarse una alteración<sup>99</sup>, una WGS (Thompson et al., 2020). Además, en el caso de las WES, los resultados obtenidos pueden analizarse elaborando paneles virtuales, esto es, seleccionando conjuntos de todos los genes secuenciados (Craven et al., 2017; Wortmann et al., 2015).

<sup>95</sup> Por ejemplo, las enfermedades mitocondriales pueden causar diabetes, pero sólo un 0,02 % de los individuos jóvenes con diabetes presentes en el registro alemán/austriaco tienen una enfermedad mitocondrial (Reinauer et al., 2016).

<sup>96</sup> Ejemplos: análisis de lactato, piruvato y aminoácidos en suero y plasma; análisis de ácidos orgánicos en orina; ensayos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones y del consumo de oxígeno en biopsias de músculo esquelético.

<sup>97</sup> Entre estos genes, se encuentran todos los de los pacientes de la presente tesis doctoral.

<sup>98</sup> En particular, con la WES no sólo se secuencian todos los exones, sino también las uniones exón-intrón, las 5' y 3'-UTR y RNA no codificantes (Schon et al., 2020).

<sup>99</sup> Esto puede suceder dado que el exoma sólo representa un 1 % del genoma completo (Danhauser et al., 2011).

A pesar de su gran ventaja, no siempre es necesario aplicar las NGS, especialmente en aquellos casos en que exista una relación fenotipo-genotipo descrita y clara, como en la LHON (Schon et al., 2020). De hecho, la secuenciación del mtDNA, que permite excluir o confirmar que la causa primaria de una determinada enfermedad mitocondrial sean mutaciones en dicho DNA, sigue llevándose a cabo por el método de Sanger, aunque cada vez se están aplicando más las NGS también para el genoma mitocondrial (Craven et al., 2017). Por otra parte, las NGS están limitadas, ya que por sí mismas no informan de si una variante detectada es o no patológica y, por tanto, pueden derivar en un diagnóstico incorrecto (Lek et al., 2016). Por ello, para confirmar la patogenicidad o la ausencia de la misma de una determinada variante, es necesario realizar ensayos funcionales que permitan mejorar la relación fenotipo-genotipo<sup>100</sup> (Frazier et al., 2019; Richards et al., 2015; Schon et al., 2020; Wortmann et al., 2015). Existe una gran cantidad de este tipo de experimentos que pueden realizarse, entre los que se encuentran el crecimiento de células en diferentes medios (glucosa/galactosa), la valoración del número de copias del mtDNA, la expresión del mtDNA, la síntesis de proteínas mitocondriales, SDS-PAGE (para analizar niveles de proteínas y de subunidades del sistema OXPHOS), BN-PAGE (para estudiar el ensamblaje de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS), la medida de la actividad de complejos del sistema OXPHOS por espectrofotometría y la capacidad de consumo de oxígeno (Bujan et al., 2022; Thompson et al., 2020). Acompañando a estos ensayos, puede llevarse a cabo la sobreexpresión del gen sano en un modelo con la variante de estudio, es decir, realizar la complementación de la deficiencia genética para restaurar el fenotipo original<sup>101</sup>. En caso de ser posible realizarla, esta técnica está considerada el *gold-standard* para confirmar la patogenicidad de una mutación (Bayona-Bafaluy et al., 2020; Danhauser et al., 2011; Lightowlers et al., 2015; Thompson et al., 2020).

Tras exponer toda la información anterior, un posible esquema general y básico para diagnosticar una enfermedad mitocondrial sería el que sigue (Thompson et al., 2020)<sup>102</sup>:

1. Evaluación del cuadro clínico: el paciente puede presentar cualquiera de los signos y síntomas descritos en el apartado 1.5.1.
2. Screening: el cribado puede llevarse a cabo mediante la secuenciación del mtDNA y/o paneles de genes, entre otros.
3. WES/WGS: según la literatura de la variante detectada, se sigue por una u otra vía.
  - a. Fin del diagnóstico: si la variante en el gen afectado se encuentra descrita con anterioridad como patológica.
  - b. Ensayos funcionales (ver punto 4): deben validarse las nuevas variantes no relacionadas previamente con ninguna patología, tanto si el gen afectado se encuentra identificado como causante de enfermedad mitocondrial como si no, así como si se trata de un gen de función conocida o desconocida.
  - c. Aplicación de otras ómicas: en caso de no detectar ninguna variante clara.
4. Ensayos funcionales: pueden llevarse a cabo tanto en tejidos (por ejemplo, biopsias de músculo esquelético) como en células (el cultivo de fibroblastos primarios es el método

---

<sup>100</sup> El binomio conformado por el diagnóstico genético y los ensayos funcionales permite diagnosticar las enfermedades y, a su vez, mejorar el conocimiento de la biología mitocondrial (Thompson et al., 2020).

<sup>101</sup> También puede llevarse a cabo la sobreexpresión del gen mutado en un modelo sano.

<sup>102</sup> Se trata de un esquema adaptado y resumido de la fuente citada. Es preciso tener en cuenta que tanto su orden como los pasos a realizar dependen de cada caso (Wortmann et al., 2015).

más habitual)<sup>103</sup>. Además, pueden requerirse ensayos adicionales en modelos animales, como *C. elegans*, *Drosophila*, el pez cebra y el ratón (Tynismaa & Suomalainen, 2009), que constituyen una poderosa herramienta para estudiar nuevos genes asociados a enfermedades: pueden usarse para evaluar aspectos como la especificidad de tejido, la progresión de la enfermedad y mecanismos asociados con la disfuncionalidad mitocondrial.

Finalmente, para favorecer el diagnóstico de estas enfermedades se estableció un MDC (Criterio de Diagnóstico Mitocondrial) que clasifica las enfermedades mitocondriales en improbables, posibles, probables y definitivas (Morava et al., 2006). Sin embargo, este sistema, basado en el fenotipo, se comenzó a poner en entredicho con la aparición de las NGS, ya que se empezaron a manifestar muchas fenocopias de enfermedades mitocondriales, esto es, enfermedades con un fenotipo similar a las mitocondriales, pero con una etiología distinta. Por ello, actualmente se prefiere usar el término diagnóstico incierto (en lugar de enfermedad mitocondrial improbable, posible o probable), en caso de que una enfermedad mitocondrial no pueda ser confirmada genéticamente, ya que, de no hacerlo, supondría un asesoramiento genético incorrecto para los pacientes y las familias (Parikh et al., 2019). Por su parte, el ACMG y la AMP (ACMG/AMP) desarrollaron una guía para ayudar a la interpretación de las variantes encontradas en las secuencias analizadas por las NGS (Richards et al., 2015)<sup>104</sup>. La guía se basa en si las variantes cumplen o no una serie de criterios de patogenicidad o de benignidad, clasificándolas así en 5 categorías: patógenas, probablemente patógenas (90-99 % de que sean patógenas), de significado incierto, probablemente benignas (90-99 % de que sean benignas) y benignas.

#### 1.5.4 Tratamientos

Existen tres campos principales en la investigación de los tratamientos para las enfermedades mitocondriales: aproximación farmacológica, estrategias reproductivas y terapia génica (Pitceathly et al., 2021). En el caso de la aproximación farmacológica, hay determinadas enfermedades mitocondriales que cuentan con un tratamiento farmacológico específico y son, sobre todo, aquellas relacionadas con defectos en el metabolismo de cofactores y en el transporte de los mismos (Distelmaier et al., 2017). Sin embargo, salvo estas excepciones, para el resto de enfermedades mitocondriales no hay un tratamiento farmacológico curativo, sino que es eminentemente sintomático y con el que se busca mejorar la función de la cadena

---

<sup>103</sup> Para las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el mtDNA, es frecuente utilizar cíbridos transmitocondriales como modelo de estudio. Estas células se generan a partir de la fusión con PEG de una célula receptora que carece de mtDNA ( $\rho^0$ ; generada mediante tratamiento con EtBr y mantenida en cultivo con medio suplementado con glucosa, piruvato y uridina) y una célula con el mtDNA mutado, pero sin nDNA (citoplasto, que puede ser natural o generado mediante enucleación). El resultado es la obtención de una célula que sigue poseyendo las mitocondrias con el mtDNA afectado, pero bajo un núcleo diferente al original (Montoya, 2005; Pacheu-Grau et al., 2010; Wilkins et al., 2014).

<sup>104</sup> Esta guía fue revisada para las variantes del mtDNA por las características únicas de éste (McCormick et al., 2020).

respiratoria. Algunos ejemplos son: seguir un tipo de dieta<sup>105</sup>, usar antioxidantes<sup>106</sup> y/o estimular la biogénesis mitocondrial (Pitceathly et al., 2021).

Por su parte, ante la falta de tratamientos curativos, las estrategias reproductivas se alzan como las mejores candidatas para prevenir la aparición de las enfermedades mitocondriales en la descendencia<sup>107</sup>. Hay diferentes tipos (Craven et al., 2017; Lightowlers et al., 2015):

- Donación de oocitos (mtDNA): se fertiliza *in vitro* el oocito de una mujer donante con esperma del padre biológico.
- Donación de mitocondrias (mtDNA): esta técnica, también conocida como transferencia mitocondrial o técnica de 3 padres, puede llevarse a cabo de distintas maneras. En esencia, consiste en implantar el núcleo obtenido de un oocito de la madre biológica en un oocito enucleado de una madre donante para, posteriormente, fertilizarlo *in vitro* con el esperma del padre biológico. Se forma así un cigoto con información genética de 3 padres: el nDNA procedente de los padres biológicos y el mtDNA de la madre donante.
- Diagnóstico preimplatacional (mtDNA y nDNA): tras llevar a cabo una fertilización *in vitro*, se realiza un diagnóstico genético a partir de 1-2 blastómeros de embriones de día 3 o un grupo de células del trofodermo de embriones de día 5. Se seleccionan aquellos embriones que carezcan de la mutación o tengan un menor grado de heteroplasmia.
- Diagnóstico prenatal (mtDNA y nDNA): se produce una fecundación natural del oocito de la madre biológica por parte del esperma del padre biológico y se realiza una biopsia a las 10-12 semanas de gestación de las vellosidades coriónicas y una amniocentesis a las 15-22 semanas para establecer un diagnóstico<sup>108</sup>.

Finalmente, en el caso de la terapia génica, existen distintas aproximaciones desarrolladas, siendo las más prometedoras el uso de nucleasas específicas y la edición génica (Craven et al., 2017; Pitceathly et al., 2021):

- Nucleasas específicas: en este grupo se incluyen tanto a las nucleasas de dedos de zinc (Gammage et al., 2014) como a las mitoTALEN (Bacman et al., 2013, 2018), ambas modificadas genéticamente para reconocer la mutación de interés y para estar dirigidas a las mitocondrias. Así, la estrategia con estas nucleasas se basa en cortar las copias de mtDNA mutado, lo que linealiza estas moléculas y lleva a su rápida degradación por parte de proteínas que participan en la replicación del mtDNA: TWINKLE, POLG (con su actividad 3'→5'-exonucleasa) y MGME1 (Peeva et al., 2018). Finalmente, el mtDNA es repoblado mediante la replicación de las copias sanas (Craven et al., 2017). Precisamente, que necesiten de la división del mtDNA supone un hándicap para esta terapia, ya que tanto en los oocitos como en las etapas tempranas del desarrollo

---

<sup>105</sup> Para pacientes con deficiencia en el CI, una dieta rica en lípidos puede promover la producción de FADH<sub>2</sub> y, por tanto, que comience la fosforilación oxidativa a través del CII (Murayama et al., 2019).

<sup>106</sup> Se buscan reducir los niveles de ROS para así disminuir su efecto perjudicial sobre la integridad de las membranas, el daño al mtDNA y la activación de la apoptosis.

<sup>107</sup> A pesar de sus ventajas, las estrategias reproductivas no están exentas de problemas, ya que dependen de las implicaciones éticas y la legislación vigente en cada país (Craven et al., 2018; Murayama et al., 2019).

<sup>108</sup> En el caso del nDNA el diagnóstico es directo, es decir, se tiene o no se tiene la mutación, mientras que en el caso del mtDNA se debe calcular el nivel de heteroplasmia.

embrionario no hay replicación del mtDNA. Además, en casos de alta heteroplasmia mutacional los embriones dejan de ser viables por la depleción causada en el número de copias en el mtDNA tras usar estas nucleasas ([Mok et al., 2020](#)).

- Edición génica: en el caso de las mutaciones en el nDNA, el sistema más esperanzador es CRISPR/Cas9 ([Doudna, 2020](#)). Sin embargo, éste no puede aplicarse como tal al mtDNA, ya que requiere de una guía de RNA (sgRNA) y no está claro que exista un importe de RNA citoplasmático a la mitocondria ([Gammage et al., 2018](#)). Por ello, nuevas estrategias basadas en CRISPR, pero con otras proteínas y sin necesidad del sgRNA están emergiendo para editar el mtDNA ([Cho et al., 2022](#); [Mok et al., 2020](#)).





## **ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

---



## 2.1 Antecedentes

A lo largo de la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el estudio de diversos pacientes con variantes en genes nucleares codificantes para proteínas de localización mitocondrial. En particular, se han analizado pacientes con variantes en la polinucleótido fosforilasa (PNPasa, codificada por *PNPT1*), el factor de elongación de la transcripción mitocondrial (*TEFM*), la RNA polimerasa mitocondrial (*POLRMT*), la proteína 4 con caja-F y repeticiones ricas en leucina (*FBXL4*), la cisteinil-tRNA sintetasa mitocondrial (*CARS2*) y la fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial (*FARS2*). Todos los genes codificantes para estas proteínas han sido descritos previamente como causantes de patologías mitocondriales (Lightowlers et al., 2015; Oláhová et al., 2021), a excepción de *TEFM*. De todos ellos, de los que se llevó a cabo una investigación más exhaustiva fueron los pacientes con variantes en *PNPT1* y *TEFM* y cuyos resultados y discusión constituyen la principal aportación científica recogida en la presente memoria (se encuentra entre los apartados 4.1-5.2). En el presente apartado se exponen las principales manifestaciones clínicas de todos los pacientes, se introduce el trabajo llevado a cabo para los que presentan variantes en *PNPT1* y *TEFM* y se indican de manera sintetizada los resultados para los que tienen variantes en *POLRMT*, *FBXL4*, *CARS2* y *FARS2*.

En primer lugar, el paciente de *PNPT1* padece una clínica que lleva a sospechar de una enfermedad mitocondrial: encefalopatía de origen no filiado, epilepsia secundaria en forma de espasmos, episodios aislados de crisis generalizada y síndrome hipotónico, entre otros. El Hospital Universitario 12 de Octubre llevó a cabo un estudio de la actividad de los complejos OXPHOS y de la CS en homogenado de tejido muscular, obteniendo una mayor actividad de esta última (421,8 nmol/(min\*mg)) con respecto a los valores de referencia (105-350 nmol/(min\*mg)). Por su parte, en el Hospital Universitario de Salamanca se analizó el mtDNA, no detectándose ninguna delección, mutación puntual ni depleción del mismo, y se solicitó una WES en cuarteto al IIER, incluyendo al paciente, el padre, la madre y un hermano. Como resultado, se obtuvo que el paciente presenta en heterocigosis compuesta<sup>109</sup> las variantes c.1519G>T (p.A507S), procedente de la madre, y c.1684A>T (p.K562\*), del padre<sup>110</sup>, y, por tanto, ambas de herencia autosómica recesiva. La primera de ellas aparece descrita como patológica en diversas publicaciones (citadas en (Grochowska et al., 2022)), mientras que la segunda se trata de una nueva variante, ausente tanto en publicaciones como en la base de datos gnomAD. La presencia de ambas variantes llevó a diagnosticar al paciente con COXPD13, si bien con la precaución de que *PNPT1* es un ejemplo de la pleiotropía de las enfermedades mitocondriales. En este sentido, la primera vez que se diagnosticaron mutaciones en *PNPT1* fue en el año 2012 ((Vedrenne et al., 2012; von Ameln et al., 2012)) y, desde entonces, p.A507S<sup>111</sup> se ha encontrado en un 19 % de los pacientes (es la mutación más frecuente), de los que un 83 % están diagnosticados, al menos, con COXP13, que, a su vez, es la enfermedad más común causada por mutaciones en *PNPT1*<sup>112</sup>. Finalmente, cabe destacar que el grupo de investigación Biogénesis y patología mitocondrial recibió fibroblastos del paciente con objeto de ampliar el estudio

<sup>109</sup> La mayoría de las mutaciones publicadas en *PNPT1* se encuentran en heterocigosis compuesta.

<sup>110</sup> El hermano no posee ninguna de las dos variantes.

<sup>111</sup> Fue publicada en un paciente por primera vez por (Slavotinek et al., 2015).

<sup>112</sup> Todos estos datos ofrecidos se han calculado a partir de la información disponible en (Grochowska et al., 2022; J. S. Lee et al., 2020).

funcional y confirmar la patología de las variantes detectadas, procesos desarrollados durante la presente tesis doctoral.

Por su parte, el paciente de *TEFM* padece episodios recurrentes de hipotermia (32-34 °C), acompañados de cefaleas, malestar/dolor abdominal (al inicio del cuadro), sudoración fría y palidez cutánea, entre otros síntomas. Además, los signos más característicos que experimenta al analizar su LCR son una caída del HVA (131 nmol/l; valores de referencia 158-596 nmol/l) y, sobre todo, del 5-HIAA (26 nmol/l; valores de referencia 87-366 nmol/l), productos de la degradación de la dopamina y de la serotonina, respectivamente (de la Fuente et al., 2017). Sus síntomas mejoran al administrarle 5-hidroxitriptófano, precursor de la síntesis de serotonina y cuya generación es la etapa limitante del proceso<sup>113</sup> (Hasegawa & Nakamura, 2010; J. Xu et al., 2019), lo que nos sugiere, junto a los episodios de hipotermia y la menor concentración de 5-HIAA detectada, que los niveles de serotonina se encuentran comprometidos en el paciente. La hipotermia consideramos que contribuye a esta conclusión porque, a pesar de que la serotonina sintetizada por las neuronas serotoninérgicas supone menos del 1 %<sup>114</sup> (Szeitz & Bandiera, 2018), ésta juega un papel fundamental en la termorregulación (Hodges et al., 2008; Ray et al., 2011)<sup>115</sup>, de manera que un nivel menor de dicho neurotransmisor podría justificar la hipotermia del paciente. Por otra parte, el hospital Sant Joan de Déu analizó su exoma y obtuvo que presenta en *TEFM* la variante *de novo* c.1036C>T (p.Q346\*), es decir, ausente tanto en el padre como en la madre. Con la información disponible en la literatura y la ofrecida con anterioridad, consideramos que la enfermedad que padece el paciente podría ser la hipotermia periódica espontánea, también conocida como síndrome de Shapiro, que puede ser congénita o adquirida y, dentro de las congénitas, cursar con lesiones estructurales<sup>116</sup> o sin las mismas (Blondin, 2014; Masruha et al., 2011; Vereas et al., 2017). La etiología de esta enfermedad, en general, es desconocida, lo que abre las puertas a que, al menos en el caso de nuestro paciente, podría tratarse de una patología mitocondrial. Así, para poder llevar a cabo un diagnóstico del paciente y confirmar si el origen genético de su cuadro clínico se corresponde con la variante detectada en *TEFM*, se recibieron fibroblastos del mismo y con ellos se trabajó en diferentes ensayos.

En el caso del paciente con posible alteración en *POLRMT*, presenta un cuadro clínico que también podría deberse a una enfermedad mitocondrial: encefalopatía epiléptica, atrofia cortical y leucoencefalopatía progresiva con hiperlactorraquia, entre otras. Por ello, la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela llevó a cabo un estudio con un panel de 301 genes<sup>117</sup> asociados a enfermedades mitocondriales con objeto de tratar de identificar la etiología

---

<sup>113</sup> El 5-hidroxitriptófano se sintetiza a partir de triptófano por la enzima TPH, de la que hay dos isoformas codificadas por dos genes diferentes: TPH2 que actúa en el cerebro y TPH1 que participa en la periferia (Hasegawa & Nakamura, 2010; J. Xu et al., 2019). Además, dentro del cerebro, la mayor síntesis de serotonina se produce en el núcleo dorsal del rafe, núcleo de neuronas serotoninérgicas, que coincide con ser en el que se detectan más niveles del mRNA de *TPH2* (Zill et al., 2007).

<sup>114</sup> El 90-95 % de la serotonina se encuentra localizada en el tracto gastrointestinal, en concreto, en las células enterocromafines, y se utiliza para modular las contracciones peristálticas y los movimientos intestinales (Szeitz & Bandiera, 2018).

<sup>115</sup> Otros trabajos que estudian la relación entre la serotonina y la termorregulación y que cabe mencionar son los llevados a cabo por (Hedlund et al., 2004; Ishiwata, 2014; Talaei et al., 2011).

<sup>116</sup> Shapiro, Williams y Plum describieron la hipotermia periódica espontánea por primera vez en dos pacientes con agenesia de cuerpo calloso (Shapiro et al., 1969).

<sup>117</sup> En concreto, una secuenciación simultánea de las regiones codificantes de los mismos, incluyendo exones y zonas de unión exón-intrón.

genética de la enfermedad, obteniendo 11 genes con variantes en heterocigosis, no explicativas por sí mismas del fenotipo del paciente, y la variante c.3596T>C (p.L1199S) de cambio de sentido en homocigosis en *POLRMT* y no publicada con anterioridad. Tras este análisis, el grupo de investigación *Biogénesis y patología mitocondrial*, en que se ha desarrollado la presente tesis doctoral, recibió fibroblastos del paciente y llevamos a cabo diferentes experimentos para analizar su patología genética. Los primeros ensayos revelaron que el paciente presenta una menor producción de ATP mitocondrial y capacidad de consumo de oxígeno, pero no parece manifestar problemas en sus niveles de transcritos mitocondriales ni en el número de copias del mtDNA. Estos dos últimos resultados coinciden con que la variante no se prediga como patológica por ninguno de los predictores utilizados (MutationTaster, PMut y Polyphen-2 por nosotros; CONDEL y la puntuación GERP por la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela) y, por tanto, con que la etiología genética no resida en la variante de *POLRMT*. Finalmente, se analizó la secuencia del mtDNA del paciente, obteniendo que pertenece al haplogrupo H3 y que no presenta ninguna mutación. Como consecuencia de todo lo anterior, se aconsejó llevar a cabo una WES para tratar de averiguar las variantes responsables de la enfermedad del paciente.

En cuarto lugar, se analizaron dos pacientes no relacionados entre sí con hiperlactacidemia, hipotonía generalizada y mutaciones en *FBXL4*: un paciente con la delección c.851delC (p.P284Lfs\*7) en homocigosis, detectada en el hospital Sant Joan de Déu, y el otro paciente con la mutación intrónica c.858+5G>C y la mutación de cambio de sentido c.1510T>C (p.C504R) en heterocigosis compuesta, encontradas en el Hospital Universitario Reina Sofía. Como se expone previamente, el trabajo con estos pacientes dio lugar a una publicación ([Emperador et al., 2020](#)), en que, sobre todo, se contribuyó a confirmar la presencia de la mutación c.858+5G>C, la predicción de la patología de las variantes (con especial relevancia la de c.858+5G>C, mediante *Human Splicing Finder* y su búsqueda bibliográfica: está publicada previamente como patológica en heterocigosis compuesta por ([Pronicka et al., 2016](#))) y los niveles proteicos de las isoformas LC3B-I y LC3B-II para valorar la autofagia en los fibroblastos. Con estas contribuciones y el resto de experimentos se llegó a la conclusión de que las variantes de ambos pacientes, no descritas con anterioridad (excepto la c.858+5G>C, como se ha indicado) son patológicas y el defecto metabólico primario que causan es una disfuncionalidad de la fosforilación oxidativa

Por último, los pacientes de *CARS2* y *FARS2* experimentan un fenotipo clínico que sugiere que padecen una enfermedad mitocondrial. En concreto, la paciente de *CARS2* presenta epilepsia mioclónica progresiva, polimioclonías (y sospecha de crisis parciales complejas), retraso psicomotor global con deterioro progresivo y atrofia cortico-subcortical evolutiva, entre otras. A nivel genético, el Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER) realizó una WES en trío de la paciente, el padre y la madre y detectó que la paciente porta dos variantes en heterocigosis compuesta en *CARS2*: c.1588C>T (p.R530C), procedente del padre, y c.224+5G>A, heredada de la madre. Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *CARS2* causan COXPD27, de modo que el IIER sugirió el diagnóstico de la paciente con esta enfermedad. A continuación, recibimos fibroblastos de la paciente y se llevaron a cabo diferentes experimentos para evaluar el diagnóstico: se confirmó la presencia de ambas variantes por secuenciación de Sanger a partir de DNA de las células; se predijo la patología de ambas variantes mediante predictores y la visualización de una estructura cristalizada de la proteína homóloga en *E. coli*;

se estudió el efecto de la variante c.224+5>G, obteniéndose que causa una retención del primer intrón; se analizaron diferentes proteínas por *Western blot*, destacando una caída en los niveles de CARS2 y alteración de las subunidades OXPHOS; se evaluó la capacidad de consumo de oxígeno, siendo menor en el paciente. Por su parte, el paciente de *FARS2* padece hipotonía, ataxia, paraparesia espástica, un cuerpo calloso corto, hiperlactacidemia e hiperalaninemia, entre otros síntomas y signos. Para detectar la etiología genética, la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela estudió mediante un panel 181 genes<sup>118</sup> asociados a defectos en la fosforilación oxidativa en el paciente. Se encontraron 4 genes con variantes en heterocigosis y dos variantes en heterocigosis compuesta en el gen *FARS2*: la variante de cambio de sentido c.1256G>A (p.R419H) y una posible delección del exón 3. Las variantes fueron confirmadas por el hospital Sant Joan de Déu, en el que, además, se valoraron en el padre, la madre y la hermana del paciente: la variante c.1256G>A procede del padre, mientras que la delección del exón 3 es heredada de la madre<sup>119</sup>. Debido a su origen genético, podría ser que el paciente padezca una COXPD14. Para confirmar este diagnóstico, recibimos fibroblastos del paciente y se realizaron diferentes ensayos: se confirmó la presencia de la variante c.1256G>A y de la delección del exón 3 por secuenciación de Sanger y partiendo de RNA total de las células; se secuenció su mtDNA, obteniendo que el paciente pertenece al haplogrupo K1a y sin encontrar ninguna mutación (tampoco se detectaron delecciones ni deplecciones del mtDNA); se predijo la patología de la variante c.1256G>A mediante el uso de predictores y valorando su efecto sobre la estructura de fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial; se estimó el efecto de la delección del exón 3 sobre la proteína resultante; se analizaron diferentes proteínas por *Western blot*, destacando una caída en los niveles de *FARS2* y de las subunidades OXPHOS estudiadas; se llevó a cabo un ensayo de complementación y se evaluó la capacidad de consumo de oxígeno, siendo menor en el paciente y mayor tanto en el control como en el paciente con sobreexpresión de *FARS2*, recuperándose así la funcionalidad del sistema OXPHOS; se encontró que el alelo paterno del paciente transcribe la isoforma 2 de la proteína con mayor frecuencia que los fibroblastos control utilizados. Finalmente, destacar que todos estos ensayos llevados a cabo con los fibroblastos de ambos pacientes se encuentran recogidos en el anexo 8.12.

---

<sup>118</sup> En concreto, una secuenciación simultánea de las regiones codificantes de los mismos, incluyendo exones y zonas de unión exón-intrón.

<sup>119</sup> La hermana también es portadora de la variante c.1256G>A, pero no de la delección del exón 3.

## 2.2 Objetivos

Tanto para el paciente con variantes en *PNPT1* como para el que presenta una variante *de novo* en *TEFM* se establecieron **los objetivos generales** siguientes:

- A. Estudio de la patología de las variantes en fibroblastos de los pacientes para confirmar la etiología genética de las enfermedades y el carácter de disfuncionalidad mitocondrial de estas últimas.
- B. Mediante el uso de distintos modelos celulares, investigación del papel en las mitocondrias de las proteínas codificadas por los genes alterados y la importancia de su regulación en el metabolismo mitocondrial.

Por su parte, los **objetivos específicos** para cada uno de los pacientes han sido:

### PNPasa:

1. Confirmar la presencia de las variantes p.A507S y p.K562 en heterocigosis compuesta en *PNPT1* en los fibroblastos del paciente.
2. Analizar *in silico* el carácter patológico de las variantes.
3. Cuantificar los niveles del transcrito y proteína de *PNPT1*.
4. Valorar la replicación mitocondrial mediante la medida de los niveles de las copias del mtDNA y de dichas moléculas con 7S DNA.
5. Estudiar la transcripción mitocondrial, tanto por medio de los niveles de distintos mtRNA como por mitotranscriptómica.
6. Cuantificar y comparar los niveles de diversas proteínas de localización mitocondrial en situación basal y ante un estrés con geneticina.
7. Evaluar la fosforilación oxidativa con diferentes ensayos: crecimiento celular en medio con glucosa o galactosa; síntesis de proteínas mitocondriales; actividad específica del CIV y la CS; capacidad de consumo de oxígeno; niveles de ATP mitocondrial.
8. Realizar un ensayo de complementación para determinar si sobreexpresar *PNPT1* revierte el fenotipo patológico.
9. Valorar la regulación de los componentes del degradosoma: PNPasa y SUV3.
10. Estudiar la localización intramitocondrial de la PNPasa.

### TEFM:

1. Confirmar la presencia de la variante *de novo* p.Q346\* en heterocigosis en *TEFM* en los fibroblastos del paciente y secuenciar su mtDNA.
2. Analizar *in silico* el carácter patológico de la variante.
3. Cuantificar los niveles del transcrito y proteína de *TEFM*.
4. Valorar la replicación mitocondrial mediante la medida de los niveles de las copias del mtDNA y de dichas moléculas con 7S DNA.

5. Estudiar la transcripción mitocondrial, tanto por medio de los niveles de distintos mtRNA como por mitotranscriptómica.
6. Cuantificar los niveles de diversas proteínas de localización mitocondrial.
7. Evaluar la fosforilación oxidativa con diferentes ensayos: crecimiento celular en medio con glucosa, galactosa o EtBr; síntesis de proteínas mitocondriales; depleción del mtDNA, mtRNA y su cinética de repoblación; capacidad de consumo de oxígeno; niveles de ATP mitocondrial.
8. Realizar un ensayo de complementación para determinar si sobreexpresar *TEFM* revierte el fenotipo patológico.
9. Analizar el efecto de la funcionalidad del sistema OXPHOS sobre los niveles de serotonina.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### 3.1 Cultivos eucariotas

#### 3.1.1 Células utilizadas

En el presente trabajo se usaron fibroblastos primarios, inmortalizados y diversas líneas celulares establecidas, todas ellas recogidas en la [Tabla 3.1](#).

**Tabla 3.1.** Fibroblastos<sup>120</sup> y líneas celulares empleadas

Células	Modelo celular	Origen
C1	Fibroblastos primarios derivados de individuo sano de 1 mes	Sant Joan de Déu
C1 <sub>i</sub>	C1 inmortalizados	-
C1 <sub>i</sub> -TEFM	C1 <sub>i</sub> que sobreexpresa <i>TEFM</i>	-
C1 <sub>i</sub> -TEFM+POLRMT	C1 <sub>i</sub> que sobreexpresa <i>TEFM</i> y <i>POLRMT</i>	-
C3	Fibroblastos primarios derivados de individuo sano de 3 años	Sant Joan de Déu
C3 <sub>i</sub>	C3 inmortalizados	-
C3 <sub>i</sub> -PNPT1	C3 <sub>i</sub> que sobreexpresa <i>PNPT1</i>	-
C15	Fibroblastos primarios derivados de un individuo sano de 15 años	Sant Joan de Déu
C15-TEFM	C15 que sobreexpresa <i>TEFM</i>	-
C15-TEFM <sup>mut</sup>	C15 que sobreexpresa <i>TEFM</i> con la mutación c.1036C>T	-
P1	Fibroblastos primarios derivados de un paciente de 3 años con mutaciones en heterocigosis compuesta en <i>PNPT1</i> : c.1519G>T y c.1684A>T	Hospital Universitario de Salamanca
P1 <sub>i</sub>	P1 inmortalizados	-
P1 <sub>i</sub> -PNPT1	P1 <sub>i</sub> que sobreexpresa <i>PNPT1</i>	-
P2	Fibroblastos primarios derivados de un paciente de 14 años con una mutación en heterocigosis en <i>TEFM</i> : c.1036C>T	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
P2-TEFM	P2 que sobreexpresa <i>TEFM</i>	-
SH-SY5Y	Línea de neuroblastoma obtenida a partir de una biopsia de médula ósea de una niña de 4 años	ATCCR® CRL-2266™
SH-SY5Y-TEFM	SH-SY5Y que sobreexpresa <i>TEFM</i>	-
SH-SY5Y-TEFM <sup>mut</sup>	SH-SY5Y que sobreexpresa <i>TEFM</i> con la mutación c.1036C>T	-
SH-SY5Y-POLG	SH-SY5Y que sobreexpresa <i>POLG</i>	-
SH-SY5Y-POLG <sup>mut</sup>	SH-SY5Y que sobreexpresa <i>POLG</i> con la mutación c.2864A>G	-
HEK293T	Línea de células embrionarias de riñón humano	Instituto Aragónes de Ciencias de la Salud

<sup>120</sup> En la mayoría de los experimentos los fibroblastos control que se utilizaron fueron los próximos a la edad de extracción de los fibroblastos de los pacientes.

### 3.1.2 Equipos y materiales empleados

El trabajo con células se realizó en un cuarto específico para su manipulación, equipado con campanas de flujo laminar, modelo *Biological Safety Cabinet Class II* de Nuair, para mantener las muestras en condiciones de esterilidad; con un microscopio invertido para observar el estado de las células; un incubador de Nuair para mantener las células a 37 °C, en ambiente húmedo y al 5 % en CO<sub>2</sub>; una centrífuga Hermle Z2300 utilizada para Falcon de 15 ml y una centrífuga de sobremesa MiniSpin® para eppendorfs de 1,5 ml.

De manera rutinaria, la superficie de trabajo de las campanas de flujo laminar y el material utilizado para la manipulación celular fueron esterilizados con luz UV y etanol al 70 %. El material de vidrio, usado en la manipulación de las células, fue esterilizado previamente a 120 °C en un autoclave Autester 437-G de Selecta durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Los medios y reactivos empleados para cultivar, lavar, tripsinizar y centrifugar las células se precalentaron a 37 °C en un baño de agua y tras su uso fueron succionados mediante una bomba de vacío, así como tratados con lejía al 33 %. Al finalizar la sesión de trabajo, todo el material en contacto con las células fue desechado en los contenedores apropiados para ser procesado posteriormente por empresas especializadas.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 60, 96 y 146 mm de diámetro (22,1, 60,1 y 147,8 cm<sup>2</sup>, respectivamente) para su mantenimiento habitual, en frascos de 25 y 75 cm<sup>2</sup> para su transporte y en placas de 6, 12 y 96 pocillos para evaluar diferentes dosis de fármacos y realizar curvas de crecimiento. Todo este material fue adquirido de TTP, mientras que los Falcon de 15 ml y 50 ml y los filtros de 0,22 µm y 0,45 µm empleados eran de ThermoFisher Scientific y Millex®, respectivamente.

### 3.1.3 Mantenimiento de las células y recogida de pellets

Todas las células empleadas fueron adherentes y, por tanto, crecieron en monocapa (Tabla 3.1). Además, salvo que se indique lo contrario, todos los medios de cultivo utilizados en los diferentes ensayos se suplementaron al 10 % SFB para favorecer el crecimiento celular<sup>121</sup>.

El medio de cultivo utilizado con mayor frecuencia fue el DMEM de Gibco® con alta glucosa (con glucosa 4,5 g/l, piruvato de sodio 0,11 g/l y L-Glutamina 0,584 g/l, entre otros). Para ensayos funcionales también se utilizó el medio DMEM con glucosa fisiológica y GlutaMAX™ (con glucosa 1 g/l y piruvato de sodio 0,11 g/l, entre otros), tratando así de que las células estuvieran en unas condiciones más próximas a su entorno *in vivo*<sup>122</sup> (Ast & Mootha, 2019; Cantor, 2019). En curvas de crecimiento se trabajó, además, con medio DMEM sin glucosa ni piruvato (con L-glutamina 0,584 g/l), al que se le añadieron galactosa y piruvato filtrados a una concentración final de 0,9 g/l y 0,11 g/l, respectivamente; en la síntesis de proteínas mitocondriales se utilizó medio DMEM sin metionina ni cisteína. Finalmente, en algunos estudios en que se quiso someter a las células a una situación de estrés, el medio de trabajo se suplementó con 100 µg/ml de geneticina (Kuschal et al., 2013), un aminoglucósido que inhibe la

---

<sup>121</sup> Para las células con peor crecimiento se añadió, además, uridina a una concentración final de 50 µg/ml.

<sup>122</sup> El uso de este medio aparece debidamente indicado en los apartados pertinentes de esta memoria.

síntesis de proteínas, tanto de células procariotas como de eucariotas (Bar-Nun et al., 1983; Prokhorova et al., 2017; Wilson, 2009).

Cuando las células alcanzaron un 80-90 % de confluencia se procedió a su subcultivo. Para ello, el medio fue retirado por succión, las células se lavaron 1-2 veces con PBS, consiguiendo así retirar las antitripsinas del SFB, y se tripsinizaron, esto es, se añadió la solución de tripsina, preparada previamente (mezcla de PBS al 0,05 % en tripsina y al 0,02 % en EDTA). La tripsina se dejó actuar a 37 °C durante 5-10 minutos, tiempo en el que se consiguieron romper las interacciones proteicas que mantenían unidas a las células entre sí y a la superficie de la placa. Finalmente, se comprobó si las células se habían despegado mediante su observación al microscopio invertido y se añadió medio DMEM para parar la acción de la tripsina.

Las células levantadas fueron sembradas de nuevo en caso de querer mantenerlas o se pasaron a tubos Falcon de 15 ml. Éstos se centrifugaron 5 minutos a 1 500 rpm, se lavaron los pellets con PBS, se pasaron a tubos eppendorfs que fueron centrifugados 5 minutos a 5 000 rpm y, finalmente, los pellets obtenidos se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

#### **3.1.4 Congelación y descongelación celular**

Las células a congelar se dejaron crecer hasta alcanzar un 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. Cada pellet celular obtenido se resuspendió en 675 µl de medio DMEM (al 30 % de SFB) frío y se introdujo en un criotubo de TPP con 75 µl de DMSO (solvente orgánico que actúa como agente criopreservante), añadidos previamente. Estos criotubos fueron almacenados a -80 °C en un soporte de congelación Mr. Frosty™ (con 250 ml de isopropanol), que favorece una congelación paulatina y uniforme porque experimenta un descenso de aproximadamente 1 °C/min. Después de, al menos, 24 horas, los criotubos fueron almacenados en cajas convencionales a -80 °C hasta su uso posterior o trasladados a un contenedor con nitrógeno líquido (-196 °C).

Por su parte, la descongelación de los criotubos almacenados se realizó con la mayor rapidez posible por ser el DMSO tóxico a temperatura ambiente. A las células congeladas se les fue añadiendo medio DMEM precalentado y se fueron recogiendo en distintos tubos Falcon de 15 ml (uno por criotubo) con 4 ml de medio. Posteriormente, se centrifugaron 5 minutos a 1 500 rpm, se aspiró el medio con DMSO (eliminando así este último) y los pellets fueron resuspendidos y recogidos en nuevo medio DMEM para, finalmente, sembrarlos en una placa.

#### **3.1.5 Contaje y viabilidad celular**

El contaje de células se realizó mediante el equipo de contaje automático de células *Countess II FL Automated Cell Counter* de ThermoFisher Scientific. Este equipo está diseñado para el contaje de células (rango entre  $1 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^7$  células/ml) y permite la evaluación de su viabilidad con azul tripán, colorante que tiñe las células muertas de azul, pero no las vivas, ya que no es capaz de atravesar la membrana estructurada de estas últimas.

Para realizar los contajes, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio DMEM y de la suspensión resultante se recogieron 30 µl, a los que se les añadió el mismo volumen de azul tripán (todo ello por duplicado). Posteriormente, se cogieron 10 µl de esta

solución, se llenó el interior de una de las cámaras desechables *Countess™ cell counting chamber slides* de ThermoFisher Scientific y estas cámaras se introdujeron en el contador automático, obteniendo la cantidad de células totales y de viables en células/ml.

### 3.1.6 Evaluación de contaminación con *Mycoplasma*

Cada cierto tiempo se llevó a cabo un análisis por PCR para determinar la presencia o ausencia de micoplasmas en los cultivos celulares empleados. Para ello se empleó tanto el kit comercial *Mycoplasma Gel Detection* de Biotools, siguiendo las instrucciones del fabricante, como una PCR con *primers* diseñados en el laboratorio (Tablas 3.2, 3.3 y 3.4). En ambos casos, se recogieron 500-1 000  $\mu$ l de medio de cultivo que hubiera estado en contacto con las células entre 48-72 horas y que, además, éstas estuvieran a un 80-90 % de confluencia (ambas medidas con objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo). Posteriormente, las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en un termobloque (*Mixing Block MB-102* de BIOER), se realizó un pulso durante 10-30 segundos para separar los restos celulares y se utilizaron los sobrenadantes en la PCR de detección.

**Tabla 3.2.** Reactivos para la PCR de micoplasmas


Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón (con MgCl <sub>2</sub> )	10 X	5	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 $\mu$ M
<i>Taq</i> polimerasa	2 U/ $\mu$ l	1	0,04 U/ $\mu$ l
N370SD	10 $\mu$ M	2,5	0,5 $\mu$ M
N370SR	10 $\mu$ M	2,5	0,5 $\mu$ M
Muestra	-	2	-
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	36	-
Volumen final		50	

**Tabla 3.3.** *Primers* para la PCR de micoplasmas

Primer	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)
N370SD	GCCTTTGCCTTACCCTCGA	60
N370SR	ACGAAAGTTACGCACCCA	

**Tabla 3.4.** Programa de la PCR de micoplasmas

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	300	94
2. Desnaturalización	60	94
3. Hibridación	60	60
4. Extensión	90	72
5. Final de la extensión	300	72
	$\infty$	4


**30 ciclos**

### 3.1.7 Ensayo de complementación

El ensayo de complementación genética se basa en la sobreexpresión de un gen wt con objeto de revertir el fenotipo patológico, afianzando así la hipótesis de que la etiología de un determinado cuadro clínico sean las mutaciones presentes en dicho gen. Para realizarlo, se generaron partículas virales con el gen wt, se transdujeron las células de interés con dichas partículas, se mantuvo en selección con antibiótico y se confirmó la sobreexpresión del gen de interés mediante ensayos de qPCR y/o *Western blot*.

Para sintetizar partículas virales, primero se clonó el gen wt en un vector lentiviral, tal y como se detalla en el apartado 3.2.16, y fue necesaria la expansión de los vectores empaquetadores pMD2.G y psPAX2<sup>123</sup>, ambos de Addgene (el protocolo de expansión aparece en el apartado 3.2.7). Tras tener estos dos últimos vectores purificados, se llevó a cabo una mezcla de 10 µg de los mismos, de los que 3,5 µg fueron del vector pMD2.G y 6,5 µg del vector psPAX2. A continuación, se sembró un pocillo de una placa de 6 pocillos con  $4,5 \cdot 10^6$  células HEK293T en 2 ml de medio DMEM con alta glucosa. A las 24 horas, se cambió el medio y se añadió la mezcla con la que transfectar las células, preparada paralelamente: 9 µl de *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent*<sup>124</sup> (Roche), 1,5 µg del vector lentiviral, 1,5 µg de la mezcla de plásmidos empaquetadores y hasta 200 µl de medio DMEM con alta glucosa (sin SFB). Tras 12-24 horas, se cambió de nuevo el medio del pocillo y se dejó que las células HEK293T generasen partículas virales con el gen de interés hasta el día siguiente. Finalmente, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante con las partículas virales. Éste se pasó por un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y se distribuyó entre varios criotubos, que se almacenaron a 4 °C, en caso de ser utilizados en esa misma sesión de trabajo, o a - 80 °C, para usos posteriores.

La transducción de las células se llevó a cabo al tener dos placas de 96 mm crecidas al 70-80 % de confluencia. Primero, se cambió su medio de cultivo por 5 ml de medio DMEM con alta glucosa y polibreno<sup>125</sup> (a una concentración final de 5 µg/ml), se incubaron a 37 °C durante 15 minutos y se añadió en una de las placas la cantidad escogida (en µl<sup>126</sup>) de las partículas virales recogidas con anterioridad; la otra placa quedó como control del ensayo. Transcurridas 24 horas, se cambió el medio a ambas placas por medio DMEM con alta glucosa y el antibiótico de selección<sup>127</sup>: geneticina (G418) o puomicina (ambos de Gibco®), según se encontrase el gen de interés clonado en el vector lentiviral pWPXLd modificado con resistencia a neomicina o a

---

<sup>123</sup> Sus mapas genéticos se encuentran en el anexo 8.1.

<sup>124</sup> Mezcla de lípidos y otros componentes suministrados en etanol al 80 %. Permite la transfección por lipofección.

<sup>125</sup> Polímero catiónico que incrementa la eficiencia de la transducción con retrovirus para células en cultivo de mamíferos.

<sup>126</sup> Como mínimo, se llevó a cabo la sobreexpresión de genes de interés con la transducción de 3 µl de las partículas virales obtenidas y, en caso de no ser suficiente para conseguirla, se fue incrementando el volumen hasta, como máximo, 200 µl. La cantidad de partículas virales no fue titulada.

<sup>127</sup> La concentración de selección de cada antibiótico dependió de las células de trabajo. Para las SH-SY5Y se empleó geneticina a 400 µg/ml, mientras que para los fibroblastos tanto geneticina a 500 µg/ml como puomicina a 0,25 µg/ml (inmortalizados) o 0,4 µg/ml (primarios). La concentración de puomicina se puso a punto de la forma en que aparece en el anexo 8.2

puromicina. Las células se mantuvieron en selección durante 10 días o hasta que las células control se murieran completamente, cambiando el medio cada 1-2 días.

Tras finalizar la selección con antibiótico, se cambió el medio de la placa con las células transducidas por DMEM con alta glucosa y se crecieron hasta tener la suficiente cantidad para recoger pellets y comprobar la sobreexpresión del gen wt, bien mediante el análisis de los transcritos por qPCR o de los niveles de proteína por *Western blot* (y, en todos los casos, en comparación con las mismas células sin transducir).

### 3.1.8 Inmortalización de cultivos primarios

Los cultivos primarios presentan un crecimiento menor que los inmortalizados o tumorales, tanto en cuanto al número de duplicaciones antes de entrar en la senescencia (límite de Hayflick) como con respecto al tiempo de duplicación. Para un mejor estudio de algunos de los fibroblastos fue necesaria su inmortalización. El método empleado se basó en la sobreexpresión del TAg del SV40, un oncogen que, debido a sus múltiples efectos sobre el ciclo celular, es capaz de inmortalizar las células sin necesidad de otros oncogenes (Salmon et al., 2000). En concreto, lo que se hizo fue transducir los fibroblastos de interés con partículas virales obtenidas en base a lo descrito en el apartado anterior, con algunas diferencias: utilizar el vector comercial pLOX-Ttag-iresTK (Addgene; contiene el gen codificante para TAg) en lugar del pWPXLd modificado; no usar una placa control; añadir 2 ml de medio con polibreno, en lugar de 5 ml; transducir con 50-100  $\mu$ l de partículas virales y, tras 3 horas (y no 24 horas), cambiar el medio de cultivo por DMEM con alta glucosa y sin polibreno. Además, tampoco se llevó a cabo una selección con antibiótico, sino que las células se sometieron a una selección natural: en caso de haber tenido éxito, las células inmortalizadas fueron creciendo más rápido que las primarias y, por tanto, colonizando el cultivo.

La inmortalización del cultivo primario se confirmó tanto mediante su observación directa al microscopio invertido (cambios en el tiempo de duplicación de las células y en su morfología - aumento del número de células en suspensión y células pegadas más redondeadas) durante, al menos, 10 días en cultivo (tras varios pases e incluso tras congelar y descongelar el cultivo), como por PCR. De esta última, cabe destacar que se llevó a cabo con *primers* diseñados para amplificar un fragmento de 231 pb del gen codificante para el TAg del SV40 (Tabla 3.5, Tabla 3.6 y Tabla 3.7), obteniendo así una banda a dicha altura en los fibroblastos inmortalizados, pero ausente en los primarios o en las que el ensayo no resultó exitoso.



**Tabla 3.5.** Reactivos para amplificar TAg del SV40

Reactivo	Concentración I (dU)	Volumen (μl)	Concentración II (dU)
Tampón (con MgCl <sub>2</sub> )	10 X	5	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 μM
Taq polimerasa	5 U/μl	0,5	0,05 U/μl
SV40 Ttag F	10 μM	1	0,2 μM
SV40 Ttag R	10 μM	1	0,2 μM
DNA molde	-	χ <sup>128</sup>	-
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	Hasta 50	-
Volumen final		50	

**Tabla 3.6.** Primers para la PCR del TAg

Primer	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)
SV40 Ttag F	AATTTGCCCTTGGACAGGCT	58
SV40 Ttag R	GGTGACTATTCCAGGGGAAATA	

**Tabla 3.7.** Programa de la PCR para amplificar TAg

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	300	94
2. Desnaturalización	10	94
3. Hibridación	20	58
4. Extensión	30	72
5. Final de la extensión	300	72
	∞	4

30 ciclos

### 3.1.9 Curvas de crecimiento: tiempo de duplicación

La velocidad a la que crece un cultivo celular permite establecer una primera aproximación de si las mutaciones presentes en dichas células, así como el medio y/o el fármaco utilizado, ejercen un efecto o no sobre la misma.

Para llevar a cabo este estudio, se sembraron 1 000 células/pocillo de cada modelo celular y condición de interés, por cuadruplicado biológico y en placas de 96 pocillos. Además, cada pocillo se llenó con un volumen de 250 μl de medio para así no ser necesario cambiarlo durante el desarrollo del experimento (3-4 días). Los medios utilizados para las curvas de crecimiento fueron, fundamentalmente, DMEM con alta glucosa y DMEM sin glucosa al que se le añadía galactosa filtrada (con un filtro de 0,2 μm). El uso de la galactosa como principal fuente energética requiere de más etapas metabólicas que la glucosa<sup>129</sup>, lo que se ha demostrado que, en diferentes modelos celulares (incluidos los fibroblastos), provoca un fenotipo más oxidativo

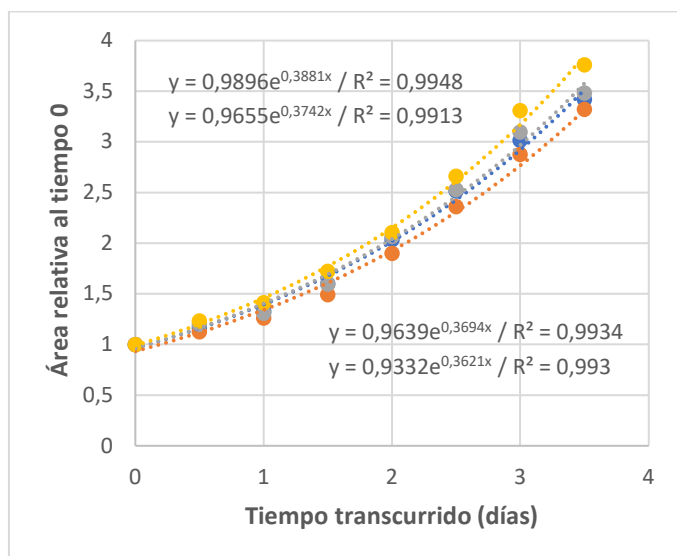
<sup>128</sup> 10 ng de DNA plasmídico; 150 ng de DNA genómico.

<sup>129</sup> Mediante la ruta de Leloir, un proceso de varias reacciones enzimáticas, la galactosa puede ser metabolizada a glucosa 1-fosfato; adicionalmente, la fosfoglucomutasa puede convertir la glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato, forma en que la galactosa original puede ser catabolizada en la glucólisis.

para mantener los niveles requeridos de ATP. Esta mayor dependencia del sistema OXPPOS permite poner de manifiesto con más facilidad defectos del mismo que puedan ocurrir en células con mutaciones en genes mitocondriales (Aguer et al., 2011).

Además, para generar un mayor estrés en las células y ralentizar más su crecimiento, también se puso a punto el uso de inhibidores de la replicación y la transcripción, en concreto, EtBr y actinomicina D (Bayona-Bafaluy et al., 2003; J. D. Stewart et al., 2011). Tras obtener resultados cualitativos por observación al microscopio invertido, se escogió el EtBr por ser más selectivo que la actinomicina D (actúa sólo sobre la replicación y la transcripción mitocondrial) y menos agresivo. En concreto, las células que se sometieron a este tratamiento se sembraron en 250 µl de volumen final de medio DMEM con alta glucosa y 0,05 µg/ml de EtBr (dosis establecida en base a la puesta a puesto recogida en el anexo 8.3).

Una vez sembradas las células en los medios de interés, el ensayo se llevó a cabo en un Incucyte®, equipo desarrollado por Sartorius AG que, en palabras de la propia empresa, “es una plataforma cuantitativa en tiempo real de imágenes y análisis de células vivas que permite la visualización y cuantificación del comportamiento celular a lo largo del tiempo, mediante la recopilación y el análisis automático de imágenes durante todo el día dentro de una incubadora de laboratorio estándar”. En particular, el Incucyte® se programó para que adquiriera imágenes cada 12 horas y lo que se analizó de éstas fue el área ocupada por las células dentro de cada pocillo, de manera que conforme avanzó el ensayo dicha superficie fue cada vez mayor. Las áreas obtenidas para cada pocillo se relativizaron con respecto a su tiempo 0, se representaron gráficamente con respecto al tiempo y se ajustaron a una curva exponencial del tipo  $y = A \times e^{Bx}$ , donde B es la pendiente y A la ordenada en el origen (Figura 3.1). Finalmente, se compararon las pendientes entre las réplicas biológicas y con respecto al resto de células y condiciones de estudio, detectando así diferencias (en caso de haberlas) en el tiempo de duplicación entre los distintos grupos de datos.



**Figura 3.1.** Curvas de crecimiento de fibroblastos control de 3 años. Gráfica de ejemplo en que se muestra la representación de los datos obtenidos con el Incucyte® para obtener las pendientes con las que luego establecer los resultados finales. Cada una de las curvas se corresponde con el crecimiento de un pocillo, teniendo así un tamaño muestral de n = 4.

## 3.2 Cultivos bacterianos

### 3.2.1 Bacterias, medios y placas utilizadas

El trabajo con bacterias se llevó a cabo en una zona del laboratorio habilitada para trabajar en condiciones de esterilidad: se limpió con etanol al 70 % antes y después de la sesión de trabajo, todo el material utilizado fue autoclavado previamente y se dispuso de un mechero Bunsen en torno al que se trabajaba.

Las bacterias utilizadas fueron células competentes de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , en concreto, las *MAX Efficiency*<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> de Invitrogen<sup>™</sup>. Según el ensayo o paso a realizar, las bacterias se crecieron en medio líquido LB, en medio líquido SOC y en placas LB-agar con ampicilina o kanamicina:

- **Medio LB:** se preparó disolviendo 5 g de peptona, 2,5 g de extracto de levadura y 2,5 g de NaCl cada 500 ml de H<sub>2</sub>O miliQ en una botella PYREX<sup>®</sup>, con posterior esterilización en autoclave y almacenamiento a 4 °C hasta su uso.
- **Medio SOC:** se empleó el que venía con las DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> de Invitrogen<sup>™</sup>, que se caracteriza por ser un medio más rico en nutrientes que el LB: 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.
- **Placas LB-agar:** se elaboró de forma similar al medio líquido LB, con las siguientes diferencias: se añadieron, además, 7,5 g de agar cada 500 ml de LB; se autoclavó el medio LB-agar en un Erlenmeyer, después se dejó a temperatura ambiente para que se enfriase y se le añadió el antibiótico ampicilina o kanamicina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml o 50  $\mu$ g/ml, respectivamente; de la solución preparada se vertieron 25 ml aprox. en sendas placas de Petri de 10 cm de diámetro y se dejó que se terminasen de enfriar y solidificar; finalmente, se invirtieron, se sellaron con Parafilm<sup>®</sup> de Bemis<sup>™</sup> para evitar contaminaciones y se almacenaron a 4 °C.

### 3.2.2 Clonaje de productos de PCR y transformación de bacterias

Para internalizar un determinado gen o fragmento del mismo (amplificado previamente por PCR) en las bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>, lo que se hizo fue clonar previamente estos productos de PCR en un vector de almacenamiento. En concreto, se utilizaron tanto el vector pCR<sup>™</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> como el vector pCR<sup>™</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup> (ambos de Invitrogen<sup>™</sup>), según se necesitasen utilizar placas LB-agar con kanamicina o ampicilina, respectivamente<sup>130</sup>. Ambos vectores presentan extremos romos, en los que tienen unidas a dos topoisomerasas I de *Vaccinia* virus, que se separan al clonarse un determinado inserto. Por tanto, este sistema cuenta con la ventaja de no requerir ninguna enzima de restricción ni ligasa para introducir los productos amplificados.

El clonaje de los productos de PCR se realizó siguiendo las indicaciones del kit *Zero Blunt*<sup>®</sup> *TOPO*<sup>®</sup> *PCR Cloning* (Tabla 3.8), tras lo que se dio un pulso, se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se llevó a cabo una transformación por choque térmico para introducir

---

<sup>130</sup> pCR<sup>™</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> contiene un gen de resistencia a kanamicina; pCR<sup>™</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup> presenta tanto un gen de resistencia a kanamicina como a ampicilina, pero fue utilizado sólo en aquellos casos en que se requirió un vector de resistencia a ampicilina (mapa genético de estos vectores en el anexo 8.1).

los vectores con los insertos clonados en las bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para ello, en primer lugar, se descongelaron en hielo tantas alícuotas, preparadas previamente, de 25  $\mu$ l de las bacterias competentes (almacenadas a -80  $^{\circ}$ C) como placas fueran a sembrarse y a cada una se le añadieron 2  $\mu$ l de la mezcla de clonaje. A continuación, se incubaron a 4  $^{\circ}$ C durante 30 minutos y se realizó el choque término para la transformación, poniendo las muestras en un termobloque 45 segundos a 42  $^{\circ}$ C (sin agitación). Después los viales se transfirieron a un baño de hielo en el que se incubaron 2 minutos para, posteriormente, añadirle a cada vial 250  $\mu$ l de medio SOC e incubarlos durante 60 minutos a 37  $^{\circ}$ C y con 250 rpm de agitación, a fin de favorecer el cierre de las membranas tras el choque térmico y la oxigenación apropiada para el crecimiento celular. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar (con ampicilina o kanamicina, según el vector empleado) con ayuda de un asa de vidrio, esterilizada con etanol al 70 %, y se dejaron crecer en una estufa toda la noche a 37  $^{\circ}$ C.

**Tabla 3.8.** Reactivos para el clonaje de los productos de PCR

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Producto de PCR	4
Solución de sal <sup>131</sup>	1
pCR™-Blunt II-TOPO®	1
Volumen final	6

### 3.2.3 Eficiencia de transformación

La eficiencia de transformación se define como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas al transformar 1  $\mu$ g de plásmido en un volumen conocido de células competentes. No obstante, la cantidad de plásmido que se suele utilizar es menor.

La eficiencia de transformación se empleó como control de calidad de las DH5 $\alpha$ ™ recibidas de Invitrogen™. Para ello, siguiendo las indicaciones del fabricante y adaptando las cantidades y volúmenes, lo que se hizo fue transformar 25  $\mu$ l de bacterias con 1,25  $\mu$ l del plásmido pUC19 (12,5 pg) mediante choque térmico; se les añadieron 225  $\mu$ l de medio SOC; se crecieron 60 minutos a 37  $^{\circ}$ C y con 250 rpm de agitación; se cogieron 10  $\mu$ l de la mezcla y se les añadieron 990  $\mu$ l de medio SOC, es decir, se practicó una dilución 1:100 de la muestra (factor de dilución 10<sup>2</sup>); se sembraron 100  $\mu$ l de la dilución obtenida en una placa Petri de 10 cm de diámetro con LB-agar y ampicilina; se dejaron crecer en una estufa toda la noche a 37; finalmente, a la mañana siguiente se contó el número de UFC obtenidas y se calculó la eficiencia de transformación, según la fórmula siguiente:

$$\frac{UFC}{\mu g} = \frac{UFC\ obtenidas}{pg\ de\ pUC19} \times \frac{10^6\ pg}{\mu g} \times \frac{\mu l\ crecidos\ en\ agitación}{\mu l\ sembrados} \times factor\ de\ dilución$$

<sup>131</sup> La solución de sal impide que, una vez clonado el inserto, las topoisomerasas pudieran revertir la reacción de integración, manteniéndose así el DNA introducido.

La cantidad de plásmido pUC19 que se utilizó equivalía a condiciones no saturantes, de modo que se dio por válida la eficiencia de transformación (y, por tanto, la calidad de las DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> recibidas) en caso de obtener más de 10<sup>9</sup> UFC/ $\mu$ g de pUC19.

### 3.2.4 Selección de colonias por PCR de colonia

Los vectores pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> y pCR<sup>TM</sup>4Blunt-TOPO<sup>®</sup> utilizados no necesitan de ningún reactivo adicional para seleccionar aquellas colonias transformadas correctamente, esto es, con el inserto clonado en el vector. Esto se debe a que, en caso de introducirse el vector sin inserto, no sería circular y sería degradado por nucleasas bacterianas, mientras que, si el vector consiguiera cerrarse sin un inserto, cuenta con el gen *ccdB*, letal en *E. coli* y que, por tanto, causaría la muerte de la bacteria en cuestión. De esta manera, únicamente aquellas bacterias que hayan incorporado el vector con un producto de PCR clonado (que interrumpe la expresión del gen fusionado *lacZ $\alpha$ -ccdB*) serán las que sobrevivan a la selección positiva dada por el antibiótico de resistencia. Sin embargo, el producto de PCR clonado puede ser inespecífico o tener errores cometidos por la DNA polimerasa, motivo por el que es fundamental seleccionar aquellas colonias que contengan el inserto de interés y secuenciar éste posteriormente (se presenta más información al respecto en los apartados 3.2.5 y 3.3.11).

Para analizar la presencia de insertos de interés en los vectores lo habitual fue escoger al azar 5-10 colonias bacterianas de cada placa, recogerlas con un palillo estéril e inocularlas en 50  $\mu$ l de medio LB, generando así un cultivo líquido. A continuación, se estimuló el crecimiento bacteriano disponiendo las muestras en un termobloque a 37 °C, con 500 rpm de agitación y durante 30 minutos, tiempo tras el que 25  $\mu$ l de cada muestra se transfirieron a nuevos eppendorf y se guardaron a 4 °C. Con los 25  $\mu$ l restantes se llevó a cabo una ruptura de las células por incubación en un termobloque durante 5 minutos a 98 °C, después se centrifugaron 13 300 rpm otros 5 minutos para separar los vectores (entre otras moléculas) del resto de componentes celulares y con 5  $\mu$ l del sobrenadante se realizó una PCR de colonia con la *Taq* polimerasa (Tablas 3.12 y 3.14). Por último, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa y se identificaron las colonias positivas para los insertos de interés mediante el tamaño de los amplificadores obtenidos.

### 3.2.5 Aislamiento de los vectores bacterianos

Los 25  $\mu$ l de los cultivos líquidos positivos para la PCR de colonia (guardados a 4 °C) se llevaron a crecimiento para aumentar el número de copias del vector presente en cada una de las muestras. Para ello, se dispusieron en sendos tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de LB y una concentración final de 100  $\mu$ g/ml de ampicilina o 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, según la resistencia del vector utilizado<sup>132</sup>. Una vez preparadas todas las suspensiones celulares, se dejaron crecer toda la noche a 37 °C y 250 rpm de agitación para, al día siguiente, extraer el vector de las mismas, siguiendo las instrucciones del kit *NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid EasyPure* de Macherey-Nagel<sup>TM</sup>. Finalmente, el material genético purificado se disolvió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Gibco<sup>®</sup> y se cuantificaron por espectrofotometría mediante el espectofotómetro NanoVue<sup>TM</sup>.

---

<sup>132</sup> La adición del antibiótico de interés al medio LB se realizó para mantener la necesidad del vector por parte de las *E. coli* DH5 $\alpha$  para sobrevivir y así evitar la pérdida del mismo.

### 3.2.6 Clonaje de insertos en vector lentiviral

Como se ha indicado con anterioridad, el clonaje habitual de los productos de PCR se realizó en los vectores pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™4Blunt-TOPO®. Sin embargo, en caso de querer realizar un ensayo de complementación se llevó a cabo el paso adicional de extraer los insertos<sup>133</sup> de dichos vectores y clonarlos en un vector de expresión, en concreto, el vector lentiviral pWPXLd<sup>134</sup> (Addgene).

En primer lugar, se llevó a cabo la digestión del vector de almacenamiento purificado en que estuviera clonado el inserto de interés y del vector pWPXLd con las enzimas de restricción *Bam*HI-HF® (*Bam*HI de alta fidelidad) y *Pme*I<sup>135</sup>, ambas de New England Biolabs. Esta reacción se llevó a cabo en sendos eppendorfs de 1,5 ml para ambos vectores; se mezclaron 1 000 ng de cada vector con 1 µl de *Bam*HI (20 UI/µl), 2 µl de *Pme*I (10 UI/µl), 5 µl del tampón de reacción CutSmart® de New England Biolabs y H<sub>2</sub>O Gibco® hasta 50 µl; la reacción de digestión tuvo lugar a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos en un termobloque. Además, transcurrida 1 hora de la digestión del vector pWPXLd, se llevó a cabo la adición a su mezcla de reacción de 1 µl de la CIAP™ (1U/µl; Invitrogen™), una fosfatasa alcalina que desfosforila los extremos 5' del DNA y, por tanto, previene la autoligación del vector.

Los resultados de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v), cargando los 50 µl de cada mezcla de reacción entre dos pocillos, y en el que se añadieron tanto el marcador *Low DNA Mass Ladder* como el *High DNA Mass Ladder* (ambos de Invitrogen™) para el seguimiento del inserto y del vector lentiviral, respectivamente. A continuación, se observaron las bandas de interés mediante un transiluminador UV, se recortaron con bisturís estériles y se purificó el inserto y el vector de la agarosa recortada mediante el *DNA Gel Extraction Kit* de Norgen Biotek, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el inserto y el vector extraídos se cuantificaron por dos vías: mediante un espectrofotómetro NanoVue™ y con un gel de agarosa al 2 % (p/v), comparando ambos resultados entre sí. Para el gel de agarosa, lo que se hizo fue cargar 4 µl de los dos marcadores ya mencionados (preparados previamente en proporción 1:1 con el tampón de carga BlueJuice™ de Invitrogen™), por un lado, y 2 µl de cada muestra con 2 µl del tampón de carga por muestra. La cuantificación fue estimada por comparación de la intensidad de las bandas de las muestras con respecto a las bandas de los marcadores.

Una vez obtenido y cuantificado el inserto de interés, por un lado, y el vector pWPXLd digerido, por otro, se llevó a cabo el cálculo de la cantidad (en ng) del inserto necesaria para su clonación en el vector. Esto se realizó mediante la herramienta web NEBioCalculator<sup>®136</sup>,

---

<sup>133</sup> Secuenciados previamente por secuenciación de Sanger, de la manera en que aparece indicada en el apartado 3.3.11.

<sup>134</sup> En concreto, el vector con el que se trabajó fue el pWPXLd modificado para tener resistencia a neomicina (y, por tanto, también a geneticina) o a puomicina. El mapa genético de dicho vector se encuentra disponible en el anexo 8.1.

<sup>135</sup> Para aquellos genes en cuya secuencia corta *Bam*HI sólo se utilizó la enzima *Pme*I. Además, la adición de estos sitios de cortes a los insertos se llevó a cabo mediante el diseño adecuado de *primers* (siguiendo los pasos indicados en el apartado 3.3.6) y PCR posterior. Por su parte, el vector pWPXLd cuenta *per se* con sitios reconocibles para ambas enzimas.

<sup>136</sup> Se basa en:  $Masa\ del\ inserto\ (ng) = Ratio\ molar \times masa\ del\ vector\ (ng) \times ratio\ longitud.$

considerando la masa del vector 50 ng y estimando una ratio molar 3:1 (6:1 en caso de sólo utilizar una enzima de digestión) entre el inserto y el vector, respectivamente. Conocida la cantidad del inserto, se llevó a cabo la reacción de ligación con la misma, 50 ng del vector, 2 µl del tampón de la T4 DNA ligasa, 1 µl de la T4 DNA ligasa (de New England Biolabs) y H<sub>2</sub>O Gibco® hasta un volumen final de 20 µl; la reacción se dejó a 16 °C durante toda la noche en un termobloque. Posteriormente, se transformaron bacterias DH5α™ con 2 µl de la mezcla de ligación, se crecieron en placas de LB-agar con ampicilina, se seleccionaron las colonias positivas por PCR de colonia, se purificaron los vectores de las mismas (con el kit *NucleoSpin® Pasmid Transfection-grade* de Macherey-Nagel™, siguiendo sus indicaciones) y se confirmó la correcta clonación del inserto mediante secuenciación de Sanger, enviando las muestras a la empresa Secugen S.L. Para conocer la secuencia completa de los insertos se usaron, generalmente, tres *primers*: uno *reverse* del gen, uno interno y el primer *forward* pWPI (5'-GGGTACAGTGCAGGGGAAAG-3') que hibrida con el vector pWPXLd. Los vectores positivos se guardaron a -20 °C hasta la generación de partículas virales para el ensayo de complementación.

### 3.2.7 Almacenamiento en gliceroles y expansión de un vector

Al purificar un vector con el inserto de interés, éste se almacenó a -20 °C hasta que fuera requerido su uso. Sin embargo, para una mejor conservación a largo plazo, a veces también se guardaron las bacterias transformadas con dicho vector de interés. Para ello, volvió a recogerse con un palillo estéril la misma colonia de la que se hubo obtenido el vector; se creció en 6 ml de medio LB, con el antibiótico al que era resistente el vector, a 37 °C, 250 rpm y 24 horas; se recogieron 800 µl de la muestra en un criotubo, a la que se añadieron también 200 µl de glicerol al 75 % y se mezclaron por inversión; finalmente, se almacenaron las bacterias a -80 °C.

Para volver a utilizar un vector ya purificado, se tomaron distintos caminos:

- **Vector purificado:** si quedaba suficiente volumen, se utilizó directamente la solución con el vector para el ensayo correspondiente; si quedaba poco volumen, entonces se expandió el vector de interés: se utilizó 1 µl de la solución con el vector para transformar nuevas bacterias, sembrar 25 µl de las mismas y, posteriormente, aislarlo.
- **Bacterias en glicerol:** sin llegar a descongelar el criotubo, se sembraron las bacterias por agotamiento y se purificó el vector de interés de las colonias que crecieran.

## 3.3 Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

### 3.3.1 Extracción de RNA total

La extracción del RNA total se llevó a cabo a partir de pellets celulares obtenidos de placas de 96 mm y se realizó en condiciones de esterilidad, tanto por el material utilizado como por trabajar bajo campana de flujo laminar. De esta manera se evitó inhalar los reactivos tóxicos utilizados, así como la contaminación del material extraído y su posible degradación con RNasas.

Cada uno de los pellets celulares obtenidos se resuspendió con 500 µl de TRIzol® (Invitrogen™), solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidinio que lisa las células y disuelve sus componentes, manteniendo la integridad del RNA y separándolo del resto. A

continuación, las mezclas se agitaron fuertemente durante 5 minutos, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de cloroformo para generar una bifase de extracción, se volvieron a agitar vigorosamente durante 3 minutos, se dejaron incubar otros 3 minutos a temperatura y se centrifugaron durante 15 minutos a 12 000 rcf y 4 °C. Una vez obtenida la bifase, se recogió todo el volumen disponible de la fase acuosa y se precipitó el RNA total añadiendo 250 µl de isopropanol frío. A continuación, se incubaron las muestras 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron 10 minutos a 12 000 rcf, 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Después los pellets se lavaron con 500 µl de etanol al 75 %, se mezclaron por inversión, se centrifugaron 5 minutos a 7 500 rcf, 4 °C y se descartó el sobrenadante.

Los pellets de RNA obtenidos se dejaron secar al aire y temperatura ambiente (protegidos), tras lo que se añadieron distintos volúmenes de H<sub>2</sub>O Gibco® (60-75 µl) a cada muestra en función de la cantidad de pellet obtenida, con objeto de alcanzar una concentración similar de RNA total extraído en todas ellas. Finalmente, se incubaron los pellets en el termobloque de BIOER a 55 °C, con 450 rpm de agitación y 10 minutos para favorecer la disolución del RNA y se terminó por guardar a -80 °C hasta su uso posterior.

### 3.3.2 Eliminación de DNA en muestras de RNA total con DNasa I

Para analizar y cuantificar transcritos mitocondriales (codificados por el mtDNA), sobre todo, se llevó a cabo un tratamiento del RNA total extraído con DNasa I, endonucleasa que degrada tanto DNA monocatenario como bicatenario. Esta reacción se realizó con objeto de asegurar una mayor pureza de RNA en las muestras de RNA total y evitar así amplificadores inespecíficos como resultado de la hibridación de los *primers* con moléculas de DNA en lugar de con los transcritos de interés. Este paso extra de pureza al tratamiento con TRIzol® resultó especialmente relevante para los transcritos mitocondriales, por carecer el mtDNA de intrones y haber de media más de 1 000 copias de mtDNA por célula (López-Pérez & Montoya, 2012).

La eliminación del DNA se llevó a cabo por medio del kit TURBO DNA-free™ de Invitrogen™, siguiendo las indicaciones del fabricante. En síntesis, se cuantificaron las muestras de RNA total mediante espectrofotometría, como se indica en el apartado 3.3.4, y se diluyeron con H<sub>2</sub>O Gibco®, de manera que estuvieron a 200 ng/µl en 50 µl. A continuación, se añadieron 5 µl del 10 X TURBO *DNase Buffer* y 1 µl de la TURBO DNasa a cada una de las muestras, se mezclaron bien y se incubaron 30 minutos a 37 °C en el termobloque de BIOER para que tuviera lugar la reacción de degradación del DNA. Tras el tiempo de incubación, la reacción fue inactivada añadiendo 5 µl de *DNase Inactivation Reagent* a cada muestra e incubando la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente, homogeneizándola en ese tiempo 2-3 veces mediante golpes con el dedo. Finalmente, las muestras se centrifugaron 1 minuto y 30 segundos a 10 000 rcf (separando así el inactivador del resto de componentes) y se transfirió su sobrenadante a tubos nuevos.

Un ejemplo de la importancia de este tratamiento para eliminar el DNA puede encontrarse en el anexo 8.4.

### 3.3.3 Extracción de DNA total

La extracción del DNA total se realizó mediante el método de fenol-cloroformo a partir de los pellets celulares obtenidos de placas de 96 mm. Además, también se realizó en



condiciones de esterilidad, de la misma manera a la descrita en el apartado 3.3.1. En primer lugar, cada pellet se resuspendió en 250  $\mu$ l de tampón TE pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), 1,25  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) para degradar las proteínas presentes, 25  $\mu$ l de RNasa A (10 mg/ml) para degradar el RNA y 5  $\mu$ l de SDS al 25% para disgregar las membranas celulares. La mezcla se incubó a 37 °C en un termobloque durante toda la noche y al día siguiente se llevaron a cabo dos extracciones: en cada una se añadieron 375  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron las muestras vigorosamente durante 5 minutos y se centrifugaron a 13 300 rpm durante 5 minutos. Tras cada extracción, se recogió la fase acuosa (superior) en un nuevo tubo.

Posteriormente, la fase acuosa de cada muestra se sometió a una tercera extracción con 250  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó con fuerza durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 13 300 rpm durante 5 minutos y se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo. A continuación, el DNA se precipitó añadiendo 50  $\mu$ l de acetato de amonio 7,5 M y 250  $\mu$ l de isopropanol frío, mezclándolos por inversión<sup>137</sup>, y seguidamente se centrifugaron las muestras a 13 300 rpm durante 5 minutos y 4 °C. El sobrenadante obtenido se desechó, cada pellet se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 75 % y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que la centrifugación anterior. Por último, se eliminó el sobrenadante de nuevo, se dejó secar cada pellet, se resuspendieron en 75  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Gibco® y se almacenaron a -20 °C.

### 3.3.4 Cuantificación de DNA y RNA total por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del RNA y del DNA totales aislados se empleó un espectrofotómetro NanoVue™ de GE Healthcare, que permite medir sus absorbancias a distintas longitudes de onda. Se depositaron 3  $\mu$ l de cada muestra en el pedestal del equipo y se siguieron los criterios de pureza basados en las relaciones de absorbancia  $Abs_{260}/Abs_{280}$  y  $Abs_{260}/Abs_{230}$ : muestra pura de RNA con un valor de 2 aproximadamente y de DNA en torno a 1,8 para  $Abs_{260}/Abs_{280}$ ; muestras de RNA y DNA con un valor próximo a 2,2 para  $Abs_{260}/Abs_{230}$ .

### 3.3.5 Retrotranscripción de RNA

Para poder amplificar un determinado gen, primero se realizó la retrotranscripción del RNA total obtenido de cada pellet, obteniendo así los cDNA monocatenarios de interés. Esta reacción se llevó a cabo mediante el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* de Roche y resultó fundamental la elección de los *primers* a utilizar (Tabla 3.29): en caso de sólo querer retrotranscribir los mRNA se usó un oligo(dT)<sub>18</sub> como *primer*, aprovechando la presencia de las colas poliA en el extremo 3' de los mismos; si el interés eran los transcritos mitocondriales policistrónicos no procesados o todos los tipos de transcritos, en general, en que se encontrase la secuencia de un determinado gen, entonces se utilizaron *random hexamers*. Estos *primers* están formados por 6 nucleótidos aleatorios que pueden hibridarse con todos los tipos de RNA presentes y, por tanto, no dependen de que haya colas de poliA en el extremo 3' de los mismos. Según se emplease uno u otro tipo de *primers*, la preparación inicial de las muestras para la RT-PCR fue diferente, tal como se indica en la Tabla 3.9.

<sup>137</sup> En este momento se observó claramente la aparición de un ovillo de DNA en suspensión.

**Tabla 3.9.** Reactivos para la síntesis de cDNA monocatenario (I)

Reactivo	Cantidad ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
RNA total	1 $\mu\text{g}$
Oligo(dT) <sub>18</sub> / <i>random</i>	1 $\mu\text{l}$ / 2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O Gibco®	Hasta 13 $\mu\text{l}$

Tras la primera mezcla de reactivos, las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65 °C en el termociclador para eliminar las posibles estructuras secundarias presentes en los RNA que pudieran afectar a la retrotranscripción. Después se añadieron los segundos reactivos necesarios hasta un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  por cada muestra (Tabla 3.10) y se introdujeron las preparaciones en el termociclador para realizar la RT-PCR a 55 °C durante 30 minutos (o a 50 °C durante 60 minutos<sup>138</sup>), después 5 minutos a 85 °C para inactivar a la retrotranscriptasa y, finalmente, a 4 °C indefinidamente. Por último, los cDNA monocatenarios sintetizados se almacenaron a -80 °C hasta que fuera requerido su uso.

**Tabla 3.10.** Reactivos para la síntesis de cDNA monocatenario (II)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final
Tampón	5 X	4	1 X
Inhibidor de RNasas	-	0,5	-
dNTPs	10 mM	2	1 mM
Retrotranscriptasa <sup>139</sup>	-	0,5	-
Volumen final	-	20	-

### 3.3.6 Diseño de primers para amplificar por PCR y secuenciar las mutaciones

El diseño de los *primers* para las PCR resultó fundamental para amplificar correctamente los genes de interés y minimizar los productos inespecíficos. Además, también se crearon *primers* con objeto de confirmar la presencia de las mutaciones encontradas previamente en los pacientes, así como la ausencia de variantes génicas introducidas en las PCR. El diseño de todos los *primers* se llevó a cabo manualmente o mediante *Primer-BLAST* (herramienta online de diseño de *primers* de NCBI), tomando como base la CDS de cada transcrito de interés y/o parte de las secuencias intrónicas<sup>140</sup>. Se generaron *primers* próximos a un tamaño de 19 pb; se evitó la presencia de timinas en el extremo 5'; se procuró que no hubiera más de 2 guaninas, 2 citosinas o una guanina y una citosina en el extremo 3; se buscó un contenido en guaninas y citosinas de cada *primer* en torno al 40-60 % y, en su caso, que los *primers* de cada pareja tuvieran una Tm lo más parecida posible. Además, se validó la especificidad de los *primers*

<sup>138</sup> Escoger uno u otro tiempo y temperatura dependió del tamaño del transcrito a retrotranscribir. Menor de 4 kb, 30 minutos a 55 °C; mayor de 4 kb, 60 minutos a 50 °C.

<sup>139</sup> Enzima recombinante expresada en *E. coli* con actividad RNasa H: elimina el RNA tras formarse híbridos de RNA-cDNA, quedando sólo el cDNA.

<sup>140</sup> La CDS escogida fue la del transcrito codificante para la proteína canónica. Para identificarlo, se usó la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) y, en concreto, la tabla de transcritos ofrecida para cada gen. Se seleccionó el transcrito que fuera codificante para una proteína, que tuviera una referencia de UniProt, una RefSeq de NCBI y un TSL 1. Por su parte, las secuencias intrónicas utilizadas también fueron obtenidas desde Ensembl.

obtenidos mediante un BLAST con la propia herramienta y con Ensembl, escogiendo dentro de las mismas la base de datos adecuada según el tipo de muestra a amplificar<sup>141</sup>.

Para el clonaje de los productos de PCR en vectores con el fin de sobreexpresar el gen de interés, a las secuencias diseñadas correspondientes al *primer forward* se les añadió en su extremo 5' la secuencia de corte de la enzima de restricción *PmeI* (5'-GTTTAAAC-3'), seguida de la secuencia Kozak (5'-GCCACC-3')<sup>142</sup>. Por su parte, en las secuencias del *primer reverse* se añadió la secuencia de corte de la enzima de restricción *BamHI* (5'-GGATCC-3')<sup>143</sup> en el extremo 5'.

La síntesis de los *primers* diseñados *in silico* se solicitó a Invitrogen™, a una escala de 20 nm y en formato liofilizado. Una vez recibidos, los *primers* se centrifugaron a 13 300 rpm durante 5 minutos y, en función de los nmoles de cada *primer*, se disolvieron en H<sub>2</sub>O Gibco® a una concentración final de 250 µM. Para ello, se incubaron en un termobloque a 37 °C durante 5 minutos y 350 rpm. Finalmente, a partir de las soluciones madre se realizaron diluciones de los *primers* a 10 µM para usarlos en las PCR o en la secuenciación posterior.

Cabe destacar que, a largo del trabajo realizado, fue necesario el diseño de distintos *primers* para las PCR y confirmar la presencia de las mutaciones en los dos pacientes. En la [Tabla 3.11](#) se exponen los de mayor relevancia para los estudios de los dos pacientes de esta tesis.

### 3.11. *Primers* diseñados para amplificar por PCR y secuenciar

	Secuencia (5'→3') <sup>144</sup>	T <sub>m</sub> <sup>145</sup>	Objetivo
TEFM F1	GTTTAAACGCCACC(ATGAGCGGGTCTGTCCTC)	69,8 (57)	PCR
TEFM R1	GTTTAAAC(CTAAGGCTGAGAGTCAAACAC)		
TEFM F2	AGCATCAGGTGCTGAGCATG	-	Secuenciar
PNPT1 F1	GTTTAAAC(GCCACCATG GCGCCTGCAGGTA)	72 (63,6)	PCR
PNPT1 R1	GGATCC(TCACTGAGAATTAGATGATGACTGTG)		
PNPT1 F2	GAATATGTTGTTAACCCAACAAG	-	Secuenciar
PNPT1 F3	CTGGTATTAAGTCAGATCAAG	-	Secuenciar
PNPT1 F4	GGTTCATTATCAAAACGAG	-	Secuenciar
PNPT1 R2	GTGTCCTCTGGTAACACCAG	-	Secuenciar
PNPT1 R3	GGAGGAAACTCGTAGTGACAG	-	Secuenciar
PNPT1 R4	GTTATAGCCACCAGGTCCAAC	-	Secuenciar
PNPT1 1519 F	ctcatgtacacattaccacagtt	60	PCR y secuenciar
PNPT1 1519 R	agcatagctaggtgcaaagt		
PNPT1 1684 F	AGCTGGCACTAATAAAGGAATAAC	60,2	PCR y secuenciar
PNPT1 1684 R	agcaaagtggaaaagaatgaaggg		

<sup>141</sup> *Primer*-BLAST presenta una opción llamada *Database* en que puede seleccionarse la base de datos a la que dirigir los *primers*: *RefSeq mRNA* se utilizó para las amplificaciones de un gen a partir de cDNA y *Genomes for selected organism* para las PCR de DNA genómico. Lo mismo se hizo para Ensembl.

<sup>142</sup> En realidad, la secuencia Kozak sería 5'-GCCACCATG-3', pero el triplete "ATG" viene dado por la CDS del gen. Esta secuencia es fundamental, ya que actúa como iniciadora de la traducción en eucariotas.

<sup>143</sup> *PmeI* en lugar de *BamHI* en caso de cortar esta última dentro de la CDS del gen de interés.

<sup>144</sup> Los *primers* con las secuencias en minúscula (PNPT1 1519 F-R y PNPT1 1684 R) son complementarios a intrones del gen.

<sup>145</sup> Las PCR con los *primers* TEFM F1-R1 y PNPT1 F1-R1 se realizaron en dos bloques con T<sub>m</sub> distintas: un primer bloque de 5 ciclos con las T<sub>m</sub> subrayadas, correspondientes a las secuencias subrayadas, y un segundo bloque de 28 ciclos con las T<sub>m</sub> sin subrayar, que son las de la totalidad de las secuencias.

### 3.3.7 Amplificación de DNA mediante PCR

La PCR se utilizó para amplificar exponencialmente fragmentos de DNA de interés a partir de muestras de DNA total, de vectores o de RNA total retrotranscritas a cDNA. Para la reacción se utilizaron dos DNA polimerasas diferentes, según el objetivo a cumplir: la *Taq* polimerasa de IBIAN, para evaluar la presencia de un gen en una muestra, y la PHS II polimerasa de ThermoFisher Scientific, variante de la *Pfu* polimerasa, para incrementar la cantidad de un determinado gen con el fin de secuenciarlo y/o sobreexpresarlo en células eucariotas. En estos últimos casos, la elección de la PHS II frente a la *Taq* se debió a que la primera es de alta fidelidad y, por tanto, menos propensa a introducir variantes en los productos de PCR con respecto a la secuencia original.

En función de la DNA polimerasa utilizada, se llevaron a cabo distintas mezclas de reacción (Tabla 3.12 y Tabla 3.13) y se usaron programas diferentes (Tabla 3.14 y Tabla 3.15)<sup>146</sup>. Además, las  $T_m$  de los *primers* también se evaluaron con herramientas distintas: *Tm Calculator* de New England Biolabs para las PCR con la *Taq* y *Tm Calculator* de ThermoFisher Scientific con la PHS II. En ambos casos, las PCR tuvieron lugar en un termociclador, con tubos de PCR de 200  $\mu$ l de capacidad y en un volumen final de 50  $\mu$ l para cada muestra. Del programa para la PHS II polimerasa, cabe destacar que se llevó a cabo en dos bloques en aquellos casos en que fue necesario utilizar *primers* con fragmentos no complementarios a la CDS del gen de interés (secuencia Kozak y sitios de corte de enzimas de restricción) para que así dichos *primers* pudieran hibridar en los 5 primeros ciclos con los trozos complementarios a la CDS y en los 28 ciclos siguientes con la totalidad de la secuencia a amplificar. En caso de emplear *primers* totalmente complementarios a la CDS, se siguió el programa indicado en la Tabla 3.15, pero con un único bloque de 30 ciclos.

**Tabla 3.12.** Reactivos para amplificar por PCR (*Taq*)

Reactivo	Concentración I (dU)	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración II (dU)
Tampón (con $MgCl_2$ )	10 X	5	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 $\mu$ M
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0,5	0,05 U/ $\mu$ l
<i>Primer forward</i>	10 $\mu$ M	1	0,2 $\mu$ M
<i>Primer reverse</i>	10 $\mu$ M	1	0,2 $\mu$ M
DNA molde	-	1-5	-
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	Hasta 50	-
Volumen final		50	

<sup>146</sup> Las condiciones establecidas en estas dos tablas son generales y fueron adaptadas a cada situación.

**Tabla 3.13.** Reactivos para amplificar por PCR (PHS II)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón HF <sup>147</sup>	x5	10	x1
dNTPs	10 mM	1	200 $\mu$ M
PHS II polimerasa	2 U/ $\mu$ l	1	0,04 U/ $\mu$ l
<i>Primer forward</i>	10 $\mu$ M	1	0,2 $\mu$ M
<i>Primer reverse</i>	10 $\mu$ M	1	0,2 $\mu$ M
DNA molde	-	$\chi$ <sup>148</sup>	-
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	Hasta 50	-
Volumen final		50	

**Tabla 3.14.** Programa de PCR (*Taq*)

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
1. Desnaturalización inicial	120	94	
2. Desnaturalización	10	94	30 ciclos
3. Hibridación	20	58	
4. Extensión	60/kb	72	
5. Final de la extensión	300	72	
	$\infty$	4	

**Tabla 3.15.** Programa de PCR (PHS II)

	Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
Primer bloque	1. Desnaturalización inicial	300	98	5 ciclos
	2. Desnaturalización	10	98	
	3. Hibridación	20	T <sub>m</sub>	
	4. Extensión	15-30/kb	72	
Segundo bloque	5. Desnaturalización	10	98	28 ciclos
	6. Hibridación	20	T <sub>m</sub>	
	7. Extensión	15-30/kb	72	
	8. Final de la extensión	300	72	
		$\infty$	4	

### 3.3.8 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Para comprobar que las PCR realizadas eran correctas, siempre se realizó después una separación electroforética horizontal en gel de agarosa de los productos de PCR con el sistema *Mini-Sub® Cell GT* de Bio-Rad.

En general, los geles se realizaron con una porosidad del 1 % (p/v) y, en particular, del 0,7 % (p/v) en caso de querer purificar un producto de PCR recortando de banda (como en el apartado 3.2.6). Para los geles del 1 % de agarosa lo que usualmente se hizo fue añadir 0,5 g de

<sup>147</sup> Contiene MgCl<sub>2</sub>.

<sup>148</sup> 1  $\mu$ l de cDNA; 10 ng de DNA plasmídico; 150 ng de DNA genómico.

agarosa en 50 ml de tampón electroforético TAE 1X<sup>149</sup> (Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8), se hirvió la solución para disolver la agarosa y se dejó enfriar brevemente, tras lo que se añadieron 2,5 µl de EtBr<sup>150</sup> 10 mg/ml para una concentración final de 0,5 µg/ml. A continuación, la solución se vertió sobre un soporte electroforético, cerrado previamente con cinta de carroceros, y con los peines para formar los pocillos de carga ya puestos, dejándose enfriar para la polimerización completa de la agarosa.

Una vez polimerizada la agarosa, la cinta fue retirada, el soporte con el gel se introdujo en una cubeta de electroforesis (sumergiéndolo con TAE 1 X), se retiraron los peines y se cargaron las muestras en los pocillos: por un lado, se mezclaron 4-5 µl de los productos de PCR con 2 µl de tampón de carga (BlueJuice™<sup>151</sup> de Invitrogen™) y, por otro, en un pocillo se cargaron 5 µl de marcador de pesos moleculares. De este último, según si el tamaño del amplificado de interés se encontraba entre 100-2 000 pb o entre 1 000-10 000 pb, se usó el *Low DNA Mass Ladder* o el *High DNA Mass Ladder* (ambos de Invitrogen™), respectivamente.

Finalmente, se realizó la separación electroforética de las muestras cargadas, aplicando un voltaje de 100 V durante 30-60 minutos, y los resultados se visualizaban exponiendo el gel a una fuente de radiación UV: un transiluminador o un GelDoc™ de Bio-Rad.

### 3.3.9 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida se realizó como primer paso para generar células que sobreexpresasen la proteína TEFM con la mutación c.1036C>T del paciente P2 (Tabla 3.1). La técnica se llevó a cabo a partir del vector pCR™4Blunt-TOPO®, con la CDS del gen *TEFM* clonada en el mismo (entre otros elementos, como la secuencia Kozak), y mediante el kit *QuickChange II Site Directed Mutagenesis* de Agilent Technologies. Este kit se basa en realizar una PCR del vector con *primers* internos que contienen la mutación de interés (Tabla 3.17) y en la endonucleasa *Dpn I*, enzima que reconoce la secuencia 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3' y corta las cadenas metiladas y hemimetiladas, es decir, las parentales procedentes de las DH5α™, pero no las amplificadas *in vitro* mediante PCR.

En concreto, primero se llevó a cabo la reacción de la PCR, mezclando los reactivos (Tabla 3.16) y aplicando el programa del ensayo según las instrucciones del fabricante (Tabla 3.18). Posteriormente, se comprobó la correcta amplificación de la PCR mediante un gel de agarosa al 1 % y, a continuación, se añadió 1 µl de la enzima *Dpn I* al producto de PCR, incubando la mezcla durante 60 minutos a 37 °C en un termociclador. Después, se transformaron 25 µl de las bacterias DH5α™ con 2 µl de la muestra obtenida y se llevaron a cabo todos los pasos descritos en los diferentes apartados anteriores, hasta secuenciar el nuevo inserto del vector pCR™4Blunt-TOPO® obtenido mediante la mutagénesis dirigida. Finalmente, se extrajo el inserto de interés de dicho vector, se clonó en un vector lentiviral y éste fue utilizado para generar partículas virales con las que transducir las células eucariotas seleccionadas para sobreexpresar *TEFM* con la mutación del paciente P2.

---

<sup>149</sup> Tampón que permite que los grupos fosfato del DNA mantengan sus cargas negativas.

<sup>150</sup> Agente que se intercala en el DNA y permite visualizarlo al irradiar con luz UV.

<sup>151</sup> Contiene glicerol (60 %), que incrementa la densidad de las muestras para que se depositen en el fondo de los pocillos, y azul de bromofenol (0,03 %), que se desplaza con el frente de migración y, por tanto, permite controlar el transcurso de la electroforesis.

**Tabla 3.16.** Reactivos para la PCR de la mutagénesis dirigida


Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón de reacción	10 X	5	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 μM
PfuTurbo DNA polimerasa <sup>152</sup>	2,5 U/μl	1	0,05 U/μl
TEFM mtg-F	125 ng	0,8 <sup>153</sup>	125 ng
TEFM mtg-R	125 ng	0,8 <sup>14</sup>	125 ng
Muestra	50 ng	2,1	50 ng
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	39,3	-
Volumen final		<b>50</b>	

**Tabla 3.17.** *Primers* para la PCR de la mutagénesis dirigida<sup>154</sup>

Primer	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)
TEFM mtg-F	GAGTAGAAGAGCTTTATGATTATTATAAGCTATTGCCTTCTATG	79
TEFM mtg-R	CATAGAAGGCAATAGCTTATAATAATGAATCATAAAGCTCTTCTACTC	

**Tabla 3.18.** Programa de la PCR de la mutagénesis dirigida

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	30	95
2. Desnaturalización	30	95
3. Hibridación	60	55
4. Extensión	360	68
5. Final de la extensión	360	68
	∞	4

 **14 ciclos**

### 3.3.10 Estudio de primers R-loop<sup>155</sup> mediante 3'-RACE

La 3'-RACE (de las siglas en inglés Amplificación Rápida de los Extremos del cDNA) es un tipo de PCR que permite analizar el extremo 3' de los transcritos retrotranscritos. En concreto, esta técnica fue utilizada para estudiar el tamaño de los *primers R-loop* (transcritos generados a partir del origen de la transcripción mitocondrial de la cadena ligera) en base a las condiciones establecidas por (S. Jiang et al., 2019).

#### 3.3.10.1 Fosforilación en 5' del *linker*

El primer paso para realizar el ensayo fue establecer un *linker* (Tabla 3.19), es decir, una secuencia de nucleótidos conocida en 3', para, en una etapa posterior, poder sintetizar el cDNA de los *primers R-loop* a partir de la misma.

<sup>152</sup> DNA polimerasa de alta fidelidad.

<sup>153</sup> En base a la fórmula:  $X \text{ pmoles del primer} = \frac{\text{ng del primer}}{330 \times n^{\circ} \text{ de bases del primer}} \times 100$

<sup>154</sup> *Primers* diseñados en base a la herramienta web *QuickChange Primer Design* de Agilent Technologies.

<sup>155</sup> Por *primers R-loop* se hace referencia a los diferentes *primers* de RNA que pueden sintetizarse para que pueda iniciarse la replicación del mtDNA.

**Tabla 3.19.** Oligonucleótidos utilizados para el estudio de *primers R-loop*

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Linker</i>	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGT GGCTGAATGAGACTGGTGTGACACTAGTGG	-
<i>Anti-linker</i>	GTCGACACCAGTCTCATTGAGCCAC	-
<i>R-loop F</i>	GATAAAATTTGAAATCTGGTTAGGCTGGTG	66
<i>R-loop R</i>	GTCTCTCTAGCAACGGTTACTCTTC	

Una vez diseñado el oligonucleótido, éste fue fosforilado en su extremo 5'. La enzima utilizada para ello fue la T4-PNK de New England Biolabs, que procede del bacteriófago T4 y es capaz de fosforilar a polinucleótidos en su extremo 5' a partir de ATP. En concreto, se preparó una mezcla de reactivos (Tabla 3.20), se llevó a cabo la reacción a 37 °C durante 30 minutos y después se paró mediante la inactivación de la enzima por calor: 65 °C, 20 minutos.

**Tabla 3.20.** Reactivos para la fosforilación en 5' del *linker*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón de T4 PNK	10 X	5	1 X
ATP	10 mM	5	1 mM
T4 PNK	10 U/µl	1	0,2 U/µl
<i>Linker</i>	100 µM (300 pmol)	3	6 µM (300 pmol)
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	36	-
Volumen final		50	

### 3.3.10.2 Ligación de RNA con el *linker* fosforilado en 5'

La enzima utilizada para esta ligación fue la T4 RNA ligasa 1 de New England Biolabs, que también procede del bacteriófago T4 y puede ligar tanto ssDNA como ssRNA (por separado o entre sí) siempre que exista un extremo 5' fosforilado y un extremo 3' hidroxilado. Por ello, la fosforilación previa del *linker* en su extremo 5'<sup>156</sup> es esencial para poder ligarlo junto a la muestra en que están los *primers R-loop*: el RNA total extraído con anterioridad.

Se llevaron a cabo diferentes intentos para poner a punto la mezcla de reactivos, hasta que se encontró que la mejor proporción para la ligación entre la cantidad (pmol) de *linker* fosforilado y de RNA total era de 3,2:1 (Tabla 3.21). La reacción se realizó a 16 °C durante 16 horas, tras lo que se precipitó el RNA para finalizar la ligación. Cabe destacar que para precipitar el RNA, se trabajó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. En particular, primero se añadió 1 µl de glucógeno G1767 (de Sigma-Aldrich) para poder visualizar mejor en los siguientes pasos el pellet de RNA, 10 µl de acetato de amonio 7,5 M y 50 µl de isopropanol frío; se invirtió la mezcla y se dejó precipitar a - 20 °C durante 30 minutos; se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 12 000 rcf y 4 °C y se retiró el sobrenadante; el pellet se lavó con 125 µl de etanol al 75 %; la solución se centrifugó durante 5 minutos a 7 500 rcf y 4 °C y se volvió

<sup>156</sup> Además de una fosforilación propia, también se solicitó un *linker* a ThermoFisher Scientific con la misma secuencia, pero ya fosforilado en 5' y con el extremo 3' inactivo mediante la adición de una molécula con un grupo amino y 7 átomos de carbonos (*Amino Linker C7*). Esto se realizó para evitar que el *linker* pudiera ligarse entre sí e interferir después. No obstante, los *primers R-loop* detectados con ambos *linkers* fueron semejantes.



a eliminar el sobrenadante; finalmente, se dejó secar el pellet de RNA al aire y temperatura ambiente (protegido), tras lo que se resuspendió en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Gibco®.

**Tabla 3.21.** Reactivos para la ligación del RNA total (*primers R-loop*) con el *linker*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón de T4 RNA ligasa	10 X	5	1 X
PEG 8 000	50 %	15	15 %
ATP	10 mM	5	1 mM
T4 RNA ligasa 1	10 U/ $\mu$ l	2,5	0,5 U/ $\mu$ l
<i>Linker</i> fosforilado en 5'	6 $\mu$ M (40 pmol)	6,7	0,8 $\mu$ M (40 pmol)
Muestra RNA	150 ng/ $\mu$ l (12,5 pmol <sup>157</sup> )	13,3	40 ng/ $\mu$ l (12,5 pmol)
Volumen final		50	

### 3.3.10.3 Retrotranscripción a cDNA y PCR de *primers R-loop* (3'-RACE)

El RNA total ligado al *linker* fue retrotranscrito a cDNA, tal y como se indica en el apartado 3.3.5, pero con la diferencia de retrotranscribir toda la cantidad de RNA total disponible (10  $\mu$ l) y utilizar un *primer* propio: un *anti-linker* (Tabla 3.19), complementario al *linker*, a una concentración final de 1,5  $\mu$ M.

El cDNA obtenido de los *primers R-loop* fue amplificado mediante una PCR con la DNA polimerasa de alta fidelidad PHS II polimerasa, *primers* específicos<sup>158</sup> (Tabla 3.19) y el programa presente en la Tabla 3.22. Cabe destacar que el diseño de estos *primers* fue llevado a cabo teniendo en cuenta: las indicaciones presentes en el apartado 3.3.6; las secuencias de *primers R-loop* obtenidas por (S. Jiang et al., 2019); la localización de regiones funcionales de interés dentro del mtDNA, como el LSP, la CSBIII, la CSBII y la CSBI (todas ellas aparecen indicadas en el anexo 8.5).

**Tabla 3.22.** Programa de la PCR para *primers R-loop*<sup>159</sup>

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	300	98
2. Desnaturalización	10	98
3. Hibridación	20	66
4. Extensión	5	72
5. Final de la extensión	300	72
	$\infty$	4

 30 ciclos

<sup>157</sup> Son 12,5 pmol aproximadamente porque añadimos 2  $\mu$ g de RNA total a la mezcla de reacción: según la tabla *ssRNA Size and Mass Conversions* de ThermoFisher Scientific, una muestra de 1  $\mu$ g de RNA equivale a 6,23 pmol (con transcritos de tamaños de 500 pb, que de media es lo que consideramos).

<sup>158</sup> Diseñados con la herramienta *Primer-BLAST* de NCBI.

<sup>159</sup> Para el cDNA procedente de RNA total ligado con el *linker* no comercial, se llevó a cabo una PCR previa para obtener más cantidad del producto de PCR de interés. Esta reacción se llevó a cabo con los mismos reactivos y programa, salvo por emplear una T<sub>m</sub> de 65,1 °C y un tiempo de extensión de 8 segundos.

### 3.3.10.4 Clonaje, replicación en bacterias y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1-2 %<sup>160</sup> y se recortaron y purificaron las bandas de interés, tal y como se describe en el apartado 3.2.6. A continuación, se clonaron en un vector pCR™-Blunt II-TOPO®, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α™, se seleccionaron las colonias positivas por PCR de colonia, se purificaron los vectores de las mismas y se mandaron a secuenciar por secuenciación de Sanger a Secugen S.L.

### 3.3.11 Secuenciación de insertos clonados y productos de PCR

La secuenciación de los insertos clonados en los diferentes vectores utilizados y de productos de PCR<sup>161</sup> se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Para ello se prepararon muestras de un volumen de 15 µl y con una concentración variable según el tipo de muestra que se mandase a secuenciar y su tamaño (Tabla 3.23). Además, para secuenciar un inserto clonado en los vectores pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™4Blunt-TOPO® se aprovecharon los sitios de reconocimiento de los *primers* F17 y R19 del fago M13 presentes en dichos vectores; en otras situaciones, se adicionaron 1,5 µl (10 µM) de un *primer* complementario al gen de interés (Tabla 3.19). Finalmente, los resultados se analizaron con el *software* de alineamiento de secuencias CodonCode Aligner v3.7.1, estableciendo la presencia o ausencia de variantes génicas, transcritos, etc. en las células estudiadas.

**Tabla 3.23.** Concentración de las muestras para mandar a secuenciar a Secugen S.L.

Muestra	Concentración (ng/µl)
Vector ≥ 20 kb	200
Vector 3-20 kb	100
Producto PCR 1 500-2 500 pb	40
Producto PCR 1 000-1 500 pb	20
Producto PCR < 500 pb	10

### 3.3.12 Secuenciación del mtDNA

Para secuenciar el mtDNA del paciente P2, primero se llevó a cabo una PCR anidada con objeto de enriquecer la muestra de DNA total extraída en mtDNA. Esta PCR anidada estuvo constituida por una primera PCR larga (Tablas 3.24 y 3.25), en la que se amplificó la mayor parte del mtDNA (desde la base 1 482 hasta la base 1 180, es decir, 16,3 kb aproximadamente de las 16 569 bp del mtDNA humano), y una segunda PCR (Tablas 3.24 y 3.26), en que se volvió a amplificar el producto de la PCR anterior en fragmentos. El resto del mtDNA no amplificado por la PCR anidada, así como fragmentos de la PCR anidada que resultaban difíciles de amplificar, fueron sometidos a una tercera PCR (Tablas 3.24 y 3.26), nombrada como PCR F128, en la que se partió del DNA total extraído y no del producto de la PCR larga. Como resultado de estas PCR

<sup>160</sup> Las muestras se cargaron en el gel con un tampón de carga con la misma composición que el BlueJuice™ de Invitrogen, pero sin azul de bromofenol para que no interfiriera en la visualización de los resultados.

<sup>161</sup> En caso de obtener un producto de PCR específico (sólo con el amplificado de interés), a veces, se optó por purificarlo directamente mediante el *PCR Purification Kit* de Norgen Biotek, sin realizar todo el proceso de clonación, transformación, etc.

se obtuvo el mtDNA amplificado en 8 fragmentos (Tabla 3.28), de los que F3-F7 procedían de la PCR anidada y F1, F2 y F8 de la PCR F128.


Cabe destacar que, de forma previa a la realización de estas PCR, los *primers* utilizados y sus temperaturas de hibridación (Tablas 3.27 y 3.28) fueron validados comprobando la ausencia de amplificadores en células  $\rho^0$  (carentes de mtDNA; control negativo). Se verificó así que, en caso de detectar amplificadores, sólo procediesen del mtDNA y no de pseudogenes del genoma mitocondrial presentes en el nDNA.

**Tabla 3.24.** Reactivos para la PCR anidada y PCR F128

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Master Mix <sup>162</sup>	x2	25	x1
Primer L <sup>163</sup>	25 $\mu$ M	1	0,5 $\mu$ M
Primer H	25 $\mu$ M	1	0,5 $\mu$ M
DNA molde	-	-	100 ng
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	Hasta 50	-
Volumen final		50	


**Tabla 3.25.** Programa de la PCR larga (primera de la PCR anidada)

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	30	98
2. Desnaturalización	10	98
3. Hibridación/extensión	495	72
4. Final de la extensión	600	72
	$\infty$	4

 30 ciclos

**Tabla 3.26.** Programa de la segunda PCR (de la PCR anidada) y PCR F128

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	300	94
2. Desnaturalización	45	94
3. Hibridación	30	T <sub>m</sub>
4. Extensión	180	72
5. Final de la extensión	300	72
	$\infty$	4

 35 ciclos

<sup>162</sup> Master Mix diferente en función de si las muestras iban destinadas a realizar la PCR larga (*Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer* de ThermoFisher Scientific), la segunda PCR de la PCR anidada ó la PCR F128 (*EmeraldAMP® GT PCR Master Mix* de Takara, estas dos últimas). En ambos casos contienen una DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y tampón optimizado para la reacción.

<sup>163</sup> Los *primers* L hibridan con la cadena ligera del mtDNA y los H con la pesada, de forma análoga a la nomenclatura de *primers forward* y *reverse*.

**Tabla 3.27.** *Primers* para la PCR larga (primera de la PCR anidada)

Primer <sup>164</sup>	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)
Oligo L	ACCGCCCGTCACCCTCTCAAGTATACTTCAAAGG	72
Oligo H	ACCGCCAGGTCCTTTGAGTTTTAAGCTGTGGCTCG	

**Tabla 3.28.** Fragmentos obtenidos y *primers* de la segunda PCR (de la PCR anidada) y PCR F128

	Fragmento	Oligo 5'→3'	Hebra	Secuencia 5'→3'	Tamaño (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
PCR F128	F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2452	66
		hmtH 2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCTG		
	F2	hmtL 2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417	65
		hmtH 5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
2ª PCR	F3	hmtL 5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476	65
		hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
	F4	hmtL8815	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	2524	65
		hmtH 9819	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC		
	F5	hmtL 9611	L	TCCCACTCCTAAACACATCC	2539	65
		hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG		
	F6	L1L	L	TACTCTCAATCAGCCACAT	2811	65
hmtH 14559		H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCTG			
F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCCTAACC	2590	65	
	hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG			
PCR F128	F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643	66
		hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

Una vez realizadas las PCR anteriores, la correcta amplificación de los fragmentos del mtDNA se comprobó mediante la misma metodología que la indicada en el apartado 3.3.8., con la salvedad de utilizar un gel de agarosa con porosidad del 0,7 % (p/v) para visualizar el producto de la PCR larga, precisamente por el mayor tamaño del mismo. Además, como marcador de pesos moleculares se empleó el *DNA Molecular Weight Marker II* de Roche. Tras comprobar la validez de los amplificados, se llevó a cabo la purificación de los productos de la PCR anidada y la tercera PCR mediante el kit *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* de Applied Biosystems™. Este reactivo enzimático transforma el exceso de moléculas de *primers* y dNTPs en nucleósidos y fosfatos inorgánicos, evitando así la interferencia posterior de los mismos en la secuenciación. En concreto, de cada producto de PCR se tomaron primero 15 µl, a los que se les añadieron 6 µl del reactivo enzimático. Después, cada muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos para que tuviera lugar la reacción enzimática, tras lo que las muestras fueron incubadas otros 15 minutos a 80 °C para inactivar al reactivo enzimático.

Las muestras purificadas se trasladaron a la unidad de genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid), donde cada uno de los 8 fragmentos fue secuenciado por el método de Sanger y con tres *primers* específicos para conseguir abarcar de forma óptima las 2 000 bp aproximadas de cada fragmento (Tabla 3.28). Finalmente, los

<sup>164</sup> El oligo L hibrida en la posición 1 482 y el oligo H en la posición 1 180 del mtDNA.

resultados obtenidos fueron solapados y analizados mediante el *software* de alineamiento de secuencias Sequencher (en base a la secuencia de referencia Cambridge del mtDNA ó rCRS), la base de datos MITOMAP y la web [www.phylotree.org](http://www.phylotree.org)<sup>165</sup>.

### 3.3.13 Análisis de niveles de transcritos por qPCR

La qPCR es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar los productos de PCR. A lo largo de la tesis doctoral, se llevaron a cabo qPCR con distintos termocicladores y kits para SYBR Green y sondas TaqMan®. En el caso de los termocicladores, se emplearon el termociclador con espectrofluorímetro LightCycler® 2.0 de Roche, con un carrusel en que podían introducirse hasta 32 capilares, y tres termocicladores de Applied Biosystems™, en su caso para placas de 96 pocillos MicroAmp™: StepOne™, ViiA7 y QuantStudio™ 5. Por su parte, se utilizaron kits diferentes según el termociclador de trabajo: *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I* de Roche para el termociclador LightCycler® y *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* para los de Applied Biosystems™; en el caso de las sondas TaqMan®, se emplearon los termocicladores de Applied Biosystems™ y los kits *TaqMan™ RNA-to-C<sub>T</sub>™ 1-Step* y *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (para una comparación estos kits consultar el anexo 8.5). Entre todos ellos, los principales termocicladores manejados fueron el ViiA7 y el QuantStudio™ 5, mientras que en el caso de los kits aparecen recogidos en la [Tabla 3.29](#), según el tipo de transcrito a detectar. El manejo de estos dos últimos termocicladores y sus kits es lo que queda registrado en esta memoria.

**Tabla 3.29.** Tipos de transcritos cuantificados por qPCR

Transcrito	DNasa I	Primers para cDNA	Kit para qPCR
Nuclear maduro	-	Oligo(dT) <sub>18</sub>	<i>PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix</i>
Mitocondrial sin madurar <sup>166</sup>	+	<i>Random</i>	<i>PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix</i>
Mitocondrial maduro	+	Oligo(dT) <sub>18</sub>	<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>
Mitocondrial total	+	<i>Random</i>	<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>

#### 3.3.13.1 SYBR Green

El SYBR Green es un fluorocromo que se une inespecíficamente al dsDNA y, por tanto, permite la detección en tiempo real de los genes que específicamente se encuentran amplificándose en cada ciclo de una qPCR, mediante *primers* diseñados para ello. Este diseño se realizó tanto con el *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche como mediante la herramienta online *Primer-BLAST* de NCBI, cuando la primera dejó de estar disponible (31/12/2020). Para la segunda, se indicó, sobre todo, que el producto de PCR fuera de 70-150 pb y, además, que los *primers* hibridasen en una región de unión entre exones.

La eficiencia de los *primers* diseñados ([Tabla 3.30](#)) se comprobó previamente a su uso en las muestras de interés, siguiendo las indicaciones del manual *Real-time PCR: understanding C<sub>T</sub>*, ofrecido por Applied Biosystems™. En síntesis, se llevaron a cabo diluciones seriadas de muestras de cDNA procedentes de fibroblastos control (1, 1/10, 1/100 y, en algunos casos,

<sup>165</sup> MITOMAP ofrece datos publicados de variantes en el mtDNA humano; la web [www.phylogeny.org](http://www.phylogeny.org) contiene un árbol filogenético exhaustivo de los distintos haplogrupos mitocondriales conocidos [última actualización el 18/02/2016].

<sup>166</sup> RNA policistrónico no procesado (al menos, en su totalidad).

1/1000) y se representaron los  $C_T$  en una recta para obtener las pendientes. A partir de las mismas se calculó la eficiencia de cada pareja de *primers*, teniendo en cuenta que una pendiente de  $-3.3 \pm 10\%$  representa una eficiencia de  $100\% \pm 10\%$  y que, en general, una eficiencia entre el 90 - 110 % es considerada aceptable.

**Tabla 3.30.** *Primers* diseñados para las qPCR con SYBR Green y su eficiencia<sup>167</sup>

	<i>Primer forward (5'→3')</i>	<i>Primer reverse (5'→3')</i>	Eficiencia (%)
<b>ACTB</b>	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	102
<b>TEFM</b>	ATGAGCGGGTCTGTCCTCT	TAAGGCCAGTACAGGGATG	95
<b>PNPT1</b>	ATGGTCACAGCGGTACAGTAA	CTGCAGCAGCTTTTTGTCTG	95
<b>SUV3</b>	TCTCATTCCCTGGATGTGGAC	AAATCATCCGCATGAGCTGC	95
<b>7S RNA</b>	GACATAATAATAACAATTGAATGTCTGC	GTGGAAATTTTTTGTATGATGTCTG	112
<b>CYTB+ND6</b>	GGCTTAGAAGAAAACCCACACA	TAGTCCGTGCGAGAATAATGATG	98
<b>ND6+ND5</b>	AACCTACTCCTAATCACATAACCT	CTGGTTGAACATTGTTTGTGG	97
<b>COIII+ATP6</b>	TCGCCTTAATCCAAGCCTAC	CCTTTTTGGACAGGTGGTGT	104
<b>COII+COI</b>	GCTCATTCAATTTCTCTAACAGCAG	GGCGTGATCATGAAAGGTG	93

Tras validar los *primers* y tener los cDNAs monocatenarios de las muestras de interés sintetizados, se prepararon las mezclas de los reactivos necesarios (Tabla 3.31), teniendo en cuenta que el volumen final por pocillo debía ser de 10  $\mu$ l (9  $\mu$ l de la mezcla en sí y 1  $\mu$ l de cDNA) y que debía trabajarse a baja luz para evitar dañar al SYBR Green (por su naturaleza fluorescente), así como en condiciones de asepsia para evitar contaminaciones que dieran lugar a amplificadas inespecíficas. A continuación, la placa se cubrió con una película adhesiva (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film* de Applied Biosystems™), se centrifugó a 1 500 rcf durante 30 segundos para mezclar los reactivos y bajarlos al fondo de pocillo y, finalmente, se introdujo en el termociclador para llevar a cabo el ensayo (Tabla 3.32).

**Tabla 3.31.** Reactivos utilizados para las qPCR con SYBR Green

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5
<i>Primer forward</i> 10 $\mu$ M	0,5
<i>Primer reverse</i> 10 $\mu$ M	0,5
H <sub>2</sub> O Gibco®	3,5
cDNA	1
Volumen final	10

<sup>167</sup> Los *primers* CYBT+ND6, ND6+ND5, COIII+ATP6 y COII+COI no fueron diseñados *de novo*, sino que son los utilizados por (Matilainen et al., 2017).

**Tabla 3.32.** Programa de las qPCR con SYBR Green

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Incubación UNG/UDG <sup>168</sup>	120	50
2. Activación de la polimerasa	120	95
3. Desnaturalización	15	95
4. Hibridación/extensión	60	60



**40 ciclos**

En general, las muestras analizadas se estudiaron por triplicado biológico ( $n = 3$ ) y técnico mediante el método  $\Delta\Delta C_T$ , basado en valorar el  $C_T$  o ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia marcado<sup>169</sup>, pero en que la amplificación y nivel de intensidad de fluorescencia siguen teniendo una relación lineal. Además, los datos obtenidos se normalizaron con respecto al gen *ACTB* (codificante para la actina) que es un gen constitutivo o *housekeeping* (cuyos *primers* eran añadidos en pocillos distintos a los de los genes de interés), empleado como control interno para validar la técnica, cuantificar los niveles de transcritos de interés presentes y poder comparar la expresión entre las distintas células analizadas.

En todos los ensayos se aplicaron controles negativos para evaluar posibles contaminaciones y, de forma adicional al programa de la qPCR (Tabla 3.32), se llevó a cabo una curva de *melting* para analizar posteriormente la  $T_m$  y conocer así la especificidad de la amplificación. La curva se realizó en tres pasos: 95 °C durante 15 segundos con una rampa de temperatura de 1,6 °C/segundo (desde los 60 °C del paso 4 de la Tabla 3.32); 60 °C durante 1 minuto con una rampa de temperatura de 1,6 °C/segundo; 95 °C durante 15 segundos con una rampa de temperatura de 0,15 °C/segundo.

### 3.3.13.2 Sondas TaqMan®

Las sondas TaqMan® permiten una cuantificación más específica de los transcritos de interés que el SYBR Green, ya que ellas mismas se encuentran dirigidas contra un gen en particular. En concreto, cada sonda está constituida por tres *primers* específicos: un *primer forward*, otro *reverse* y un *primer* central (la sonda en sí), que en sus extremos se encuentra unido a un fluoróforo y a un *quencher*. La técnica se fundamenta en la actividad 5'→3' exonucleasa de las polimerasas, de manera que en situación basal el *quencher* apantalla la fluorescencia del fluoróforo, pero después la polimerasa rompe el *primer* central de la sonda al amplificar el gen al que el *primer* se encuentra hibridado y, en consecuencia, se separa el fluoróforo del *quencher*, pudiendo entonces detectarse la fluorescencia emitida por el primero. De esta forma se consigue relacionar la intensidad de fluorescencia detectada por cantidad de cDNA de un determinado transcrito presente.

En particular, como aparece en la Tabla 3.29, las sondas TaqMan® se utilizaron para analizar transcritos mitocondriales maduros y totales y, en concreto, se empleó una serie de sondas comercializadas por ThermoFisher Scientific, cuya eficiencia se asegura de ser del 100 %<sup>170</sup> (Tabla 3.33). En cuanto a la preparación de las muestras (Tabla 3.34), las condiciones del

<sup>168</sup> La Uracil-DNA glicosilasa (UNG/UDG) es una enzima que permite degradar productos inespecíficos arrastrados de PCR previas.

<sup>169</sup> Punto de inflexión de las curvas sigmoideas obtenidas (Kornblum et al., 2013; Zsurka et al., 2008).

<sup>170</sup> *Efficiency of Real-Time PCR* (ThermoFisher Scientific).

ensayo (Tabla 3.35) y su análisis posterior, se llevó a cabo de forma similar a la descrita en el uso del SYBR Green: en placa de 96 pocillos, 10  $\mu$ l/pocillo, en condiciones de asepsia y baja luz (por los fluoróforos de las sondas), con controles negativos, usando una cinta adhesiva, realizando una centrifugación previa al ensayo en sí y analizando los datos por el método  $\Delta\Delta C_T$ . Además, para los transcritos maduros se utilizó el gen *ACTB* como estándar interno, mientras que para los totales el gen del rRNA 18S, según si para obtener los cDNAs se empleó un oligo(dT)<sub>18</sub> como *primer* o *random primers*, respectivamente. En este sentido, destacar que las sondas de los estándares internos no se añadieron en pocillos distintos a las de los genes de interés, sino en los mismos. Por ello fue fundamental que ambos tipos de sondas tuvieran dos fluoróforos diferentes, esto es, con una excitación (Ex) y emisión (Em) a distintas longitudes de onda: VIC para los estándares internos (Ex = 494 nm, Em = 518 nm) y FAM para los genes de interés (Ex = 538 nm, Em = 554 nm).

**Tabla 3.33.** Sondas TaqMan® utilizadas en este trabajo (ThermoFisher Scientific)

Gen	Producto codificado	Fluoróforo	Código de la sonda
<i>MT-ND1</i>	NADH deshidrogenasa 1	FAM	Hs02596873_s1
<i>MT-ND2</i>	NADH deshidrogenasa 2	FAM	Hs02596874_g1
<i>MT-ND3</i>	NADH deshidrogenasa 3	FAM	Hs02596875_s1
<i>MT-ND5</i>	NADH deshidrogenasa 5	FAM	Hs02596878_g1
<i>MT-ND6</i>	NADH deshidrogenasa 6	FAM	Hs02596879_g1
<i>MT-CYB</i>	Citocromo b	FAM	Hs02596867_s1
<i>MT-COI</i>	Citocromo c oxidasa 1	FAM	Hs02596864_g1
<i>MT-COII</i>	Citocromo c oxidasa 2	FAM	Hs02596865_g1
<i>MT-COIII</i>	Citocromo c oxidasa 3	FAM	Hs02596866_g1
<i>MT-ATP6</i>	ATP sintasa 6	FAM	Hs02596862_g1
<i>MT-RNR1</i>	12S rRNA	FAM	Hs02596859_g1
<i>18S</i>	18S rRNA	VIC	Hs99999901_s1
<i>ACTB</i>	Actina	VIC	Hs99999903_m1

**Tabla 3.34.** Reactivos empleados para las qPCR con sondas TaqMan®

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	5
Sonda FAM	0,5
Sonda VIC	0,5
cDNA (diluido 1/5 en H <sub>2</sub> O Gibco®)	4
Volumen final	10

**Tabla 3.35.** Programa de las qPCR con sondas TaqMan®

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Incubación UNG/UDG	120	50
2. Activación de la polimerasa	600	95
3. Desnaturalización	15	95
4. Hibridación/extensión	60	60



40 ciclos



### 3.3.14 Cuantificación relativa del número de copias del mtDNA

La medida del número de copias del mtDNA se basa en cuantificar mediante qPCR un gen mitocondrial, un gen nuclear y relativizar los  $C_T$  de uno con respecto al otro mediante el método  $\Delta\Delta C_T$ . La detección de ambos genes se realiza con sondas TaqMan®, una mitocondrial y otra nuclear (Tabla 3.36): la sonda mitocondrial contiene el fluoróforo FAM e hibrida con el gen mitocondrial *MT-RNR1*, que codifica para el rRNA 12S y que se encuentra en una región muy conservada del mtDNA; la sonda nuclear contiene el fluoróforo VIC e hibrida para el gen nuclear *RPPH1*, que codifica para la ribozima (RNA H1) de la ribonucleasa P (RNasa P) humana y que se encuentra en monocopia en el genoma haploide.

**Tabla 3.36.** Primers y sonda FAM para cuantificar el número de copias del mtDNA<sup>171</sup>

Primer	Secuencia 5'→3'
12S-L ( <i>forward</i> )	CCACGGGAAACAGCATGTATT
12S-H ( <i>reverse</i> )	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA
Sonda MT-FAM	FAM-TGCCAGCCACCGCG

El programa utilizado, el termociclador y la manera de trabajar fueron idénticos a lo descrito previamente en el apartado 3.3.13, con la diferencia de utilizar otras cantidades de reactivos (Tabla 3.37). Además, cabe destacar que los resultados obtenidos no fueron absolutos en cuanto al número de copias del mtDNA, sino relativizados con respecto a los valores de las células control (analizadas en la misma placa de 96 pocillos) y, por tanto, mostrados en porcentaje.

**Tabla 3.37.** Reactivos para cuantificar el número de copias del mtDNA

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μl)	Concentración final
TaqMan® Gene Expression Master Mix	-	10	-
12S-L	5 μM	0,5	0,125 μM
12S-H	5 μM	0,5	0,125 μM
Sonda MT-FAM	5 μM	0,5	0,125 μM
RNasa P (VIC)	20 X	1	1 X
DNA	2 ng/μl	5	0,5 ng/μl
H <sub>2</sub> O Gibco®	-	2,5	-
Volumen final		20	

### 3.3.15 Cuantificación relativa del número de copias del 7S DNA

Para evaluar la cantidad de copias del 7S DNA, se llevó a cabo una estimación mediante una qPCR en que se amplificó un gen del mtDNA fuera del 7S DNA (*MT-RNR1*; Tabla 3.36) y un fragmento de 85 pb del 7S DNA. Para este segundo, se utilizaron unos *primers* y una sonda TaqMan® ya publicados (Kornblum et al., 2013; Zsurka et al., 2008) y recogidos en la Tabla 3.38. De estos *primers* y sonda se verificó su localización dentro del 7S DNA (disponible la de este último en el anexo 8.5) y su especificidad de amplificado mediante una PCR, seguida de la purificación del producto de PCR, clonación de este último en el vector pCR™-Blunt II-TOPO®,

<sup>171</sup> Los *primers forward*, *reverse* y la sonda TaqMan®, marcada con el fluoróforo VIC, para el gen *RPPH1* se obtuvieron del kit *TaqMan RNase P Control Reagents* de Applied Biosystems™.

transformación de bacterias, selección de colonias, aislamiento del vector con el inserto y, finalmente, secuenciación del inserto por el método de Sanger.

**Tabla 3.38.** *Primers* y sonda VIC empleados para cuantificar el 7S DNA

<i>Primer</i>	Secuencia 5'→3'
MT16520F24 ( <i>forward</i> )	CATAAAGCCTAAATAGCCCACACG
MT35R24 ( <i>reverse</i> )	CCGTGAGTGGTTAATAGGGTGATA
MT16557F25 (sonda MT-VIC)	VIC-AGACATCACGATGGATCACAGGTCT

La manera de llevar a cabo el ensayo fue la misma a la ya redactada en el apartado 3.3.13 y los reactivos utilizados idénticos a los de la [Tabla 3.37](#), con la diferencia de añadir 7S DNA (VIC) 20 X<sup>172</sup> y no RNasa P (VIC) 20 X. Por su parte, el programa de qPCR utilizado se muestra en la [Tabla 3.39](#) ([Kornblum et al., 2013](#)) y el análisis de datos se realizó mediante el método  $\Delta\Delta C_T$ , aunque con una modificación: primero, como habitualmente, se relativizaron los  $C_T$  del gen *MT-RNR1* con respecto al fragmento amplificado del 7S DNA, pero, después, en lugar de relativizar los valores obtenidos ( $\Delta C_T$ ) para cada modelo celular con respecto a las células control, lo que se hizo fue referir los resultados con respecto al valor en que no hay 7S DNA, que es aquel en que el  $C_T$  obtenido con los *primers* y sonda para el mtDNA es el mismo que para el  $C_T$  de los *primers* y sonda para el 7S DNA<sup>173</sup>. Dicho de otra manera, las  $\Delta C_T$  se refirieron con respecto a  $\Delta C_T = 0$ , de manera que  $\Delta\Delta C_T$  pasó a ser la propia  $\Delta C_T$ . Finalmente, cabe destacar que, dado el análisis realizado, los resultados obtenidos no fueron absolutos, sino expresados en porcentaje.

**Tabla 3.39.** Programa para cuantificar el 7S DNA

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Incubación UNG/UDG	120	50
2. Activación de la polimerasa	180	95
3. Desnaturalización	15	95
4. Hibridación/extensión	60	60

 45 ciclos

### 3.3.16 Depleción del mtDNA, mtRNA y cinética de repoblación

La medida de la cinética de recuperación de los niveles del mtDNA y de los mtRNA permite evaluar la capacidad del mantenimiento del DNA mitocondrial y de la transcripción mitocondrial, respectivamente. Este ensayo, basado en el método propuesto por ([J. D. Stewart et al., 2011](#)), tiene como pilar fundamental el uso de EtBr, compuesto que, como se ha indicado con anterioridad, es capaz de inhibir de forma reversible tanto la replicación como la transcripción mitocondrial.

<sup>172</sup> Los *primers* y la sonda de la [Tabla 3.38](#) fueron solicitados a ThermoFisher Scientific y la casa comercial envió el producto final en una única mezcla a una concentración 20 X: 7S DNA (VIC) 20 X.

<sup>173</sup> Si no hay 7S DNA, entonces los *primers* y la sonda para el 7S DNA amplificarán las dos cadenas habituales de cada molécula del mtDNA, igual que los *primers* y la sonda para el mtDNA (*MT-RNR1*). La amplificación será idealmente la misma por haber el mismo material genético y, por tanto, los  $C_T$  serán iguales ( $\Delta C_T = 0$ ). En cambio, en caso de haber 7S DNA, entonces existirá una tercera cadena que podrán amplificar los *primers* y la sonda para el 7S DNA, pero no para el *MT-RNR1*, dando como resultado un  $C_T$  inferior para el 7S DNA por haber más material genético de partida.

Para llevar a cabo el ensayo, se sembraron  $1 \cdot 10^5$  células/pocillo de cada modelo celular y condición de interés, por triplicado biológico y en placas de 6 pocillos. Las células se crecieron en medio DMEM hasta alcanzar el 80 % de confluencia, momento en que se indujo la depleción de los ácidos nucleicos mitocondriales: se sustituyó el medio por el de tratamiento, es decir, DMEM con 0,05  $\mu\text{g/ml}$  de EtBr y 50  $\mu\text{g/ml}$  de uridina. Esta primera parte del ensayo se mantuvo durante 8 días, recogiendo células los días 0, 4 y 8; posteriormente, se permitió la recuperación del mtDNA y de los mtRNA, poniendo de nuevo las células en medio DMEM durante 20 días más y recogiénolas los días 5, 10 y 20. Finalmente, de todas las muestras obtenidas se extrajo el DNA y el RNA totales y se cuantificaron el número de copias del mtDNA y los niveles de los transcritos mitocondriales totales, respectivamente.

### 3.3.17 RNA-seq

El análisis del transcriptoma de diversos fibroblastos de interés se llevó a cabo por triplicado biológico y mediante una RNA-seq por parte del servicio GENEWIZ® de la empresa Azenta Life Sciences. Las células se crecieron 3 días antes de su recogida en medio DMEM con glucosa fisiológica y se extrajo su RNA total, que fueron las muestras evaluadas. En concreto, los RNA totales se trataron con DNase I y se aseguró que estuvieran a una concentración y cantidad superiores a 50 ng/ $\mu\text{l}$  y 2  $\mu\text{g}$ , respectivamente, a una pureza entre 1,8-2,2 ( $\text{Abs}_{260/280}$ ) y que tuvieran un RIN  $\geq 6.0$ <sup>174</sup>. Una vez enviados, el servicio realizó una genoteca de cDNA<sup>175</sup> con adaptadores, añadiendo previamente la mezcla comercial *ERCC Spike-In Mix*<sup>176</sup> de Invitrogen™. A continuación, la genoteca se secuenció en un sistema NovaSeq™ mediante la tecnología Illumina®, esto es, una amplificación en fase sólida del material de partida seguida de una secuenciación por síntesis. En total se obtuvieron, al menos, 20 millones de lecturas por muestra analizada (se realizaron triplicados biológicos).

Los resultados conseguidos fueron almacenados en archivos FASTQ y el servicio realizó, además, el análisis bioinformático de los datos. Primero se llevó a cabo un control de calidad de las secuencias obtenidas con Trimmomatic v.0.36 y, a continuación, se mapearon con el genoma nuclear de referencia para *Homo sapiens* GRCh38 (disponible en Ensembl), utilizando para ello la herramienta STAR aligner v.2.5.2.b. Posteriormente, las secuencias de los archivos BAM obtenidos se cuantificaron para generar matrices de conteo para cada muestra, usando featureCounts del alineador Subread package v.1.5.2 y contando sólo las lecturas dentro de las regiones exónicas. Después, las matrices de conteo se normalizaron<sup>177</sup>, se comparó la expresión génica entre las muestras de los diferentes análisis solicitados, todo ello mediante DESeq2, y se usó el test Wald para generar los p-valores y el estadístico de contraste, en este caso,  $\log_2(\text{fold}$

---

<sup>174</sup> La concentración de los RNA y su pureza se obtuvieron mediante un espectrofotómetro NanoVue™; los RIN se establecieron con un sistema TapeStation 2200 de Agilent Technologies.

<sup>175</sup> A las muestras de RNA totales se les eliminan los rRNA, después se fragmentan y, finalmente, se retrotranscriben con *random primers*.

<sup>176</sup> Es una mezcla de RNA exógenos que difieren en la longitud y el contenido en guaninas y citosinas en comparación con el transcriptoma humano endógeno. Permite controlar diferentes fuentes de variabilidad de una RNA-seq, como la calidad del material de partida o la plataforma escogida.

<sup>177</sup> Este paso resulta fundamental, ya que el conteo no sólo es proporcional a la expresión de los genes, sino también a la longitud de los mismos, que cambia de unos a otros. Además, la profundidad entre muestras también puede variar por defecto del propio secuenciador o por analizarse en momentos diferentes. Para evitar estos problemas se lleva a cabo la normalización del conteo.

change)<sup>178</sup>. Cabe destacar que también se estudió la calidad de los datos obtenidos para detectar posibles réplicas que no fueran representativas de su grupo. En concreto, la similitud entre las muestras se evaluó mediante la distancia euclídea (lineal) entre las mismas y con un análisis de componentes principales.

Una vez recibidos todos los datos anteriores, se elaboró un panel virtual con 53 genes, entre los que principalmente se encuentran los que codifican para proteínas localizadas en los nucleoides, gránulos de RNA y/o D-foci<sup>179</sup> (el panel se encuentra disponible en el anexo 8.10). Estos genes se analizaron en base a si los niveles de sus mRNA eran estadísticamente significativos (p-valor ajustado < 0,05) o no y si aumentaban o disminuían. Por otra parte, de todos los genes de la RNA-seq también se seleccionaron los 1 136 que codifican para las proteínas de localización mitocondrial, según MitoCarta 3.0 (Rath et al., 2021), después se escogieron los que presentaban niveles estadísticamente significativos de sus transcritos (de nuevo aquellos con un p-valor ajustado < 0,05) y se dividieron en 16 funciones mitocondriales, en base a las rutas establecidas en MitoCarta 3.0. Por último, se llevó a cabo un análisis del porcentaje de genes que experimentaban un incremento o un descenso en sus niveles, tanto globalmente como para cada una de las funciones analizadas.

### 3.4 Técnicas de manipulación de proteínas

#### 3.4.1 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo a partir de pellets celulares obtenidos de placas de 96 mm. Estos pellets se resuspendieron en el tampón de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, Tritón X-100, desoxicolato de sodio 0,5% y EDTA 5 mM) de Millipore®, que permite aislar tanto proteínas solubles como de membrana, y en la mezcla comercial de inhibidores de proteasas *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* de Roche, siendo esta última utilizada para impedir la degradación de las proteínas de interés al liberarse las propias proteasas endógenas de los extractos celulares.

Según su tamaño, los pellets celulares se resuspendieron en 75-100 µl de una mezcla preparada previamente de RIPA 1 X e inhibidores de proteasas (en proporción 1:25, respectivamente) y se incubaron en un agitador rotativo vertical (modelo SB2 de Stuart®) durante 15 minutos y a 4 °C para favorecer la extracción. Después, las muestras se centrifugaron otros 15 minutos a 4 °C y 13 000 rcf para eliminar los restos celulares y se recogieron los sobrenadantes en tubos nuevos. En este punto, las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso o se realizó la cuantificación de la concentración de las proteínas totales en las mismas por el método de Bradford.

---

<sup>178</sup> Los genes considerados con una diferencia de niveles significativa fueron aquellos con un p-valor ajustado < 0,05.

<sup>179</sup> Los genes para el panel se seleccionaron y analizaron en base a la información presente en la literatura, la mayoría de ellos mencionados en la sección *Introducción*.

### 3.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford se basa en el uso del reactivo homónimo<sup>180</sup> para cuantificar la cantidad total de proteínas presentes en una determinada muestra. Dicho reactivo contiene Azul Brillante de Coomassie G-250, un colorante que, en disoluciones acuosas, presenta tres formas que se encuentran en equilibrio: catiónica, neutra y aniónica. El colorante se prepara de manera que se encuentra predominantemente en su forma catiónica, en la que tiene un color rojo (máximo de absorción a 466 nm). Sin embargo, en presencia de proteínas el colorante vira a su forma aniónica, adoptando un color azul (su máximo de absorción pasa a 595 nm), que será mayor cuanto más concentración de proteína haya presente.

En primer lugar, se elaboró una recta de calibrado de valores de absorbancia a 595 nm y con una proteína de concentración inicial conocida, en concreto, 1 mg/ml (1 µg/µl) de BSA. A partir de esta solución de partida, se aplicaron distintas diluciones por duplicado para construir la recta: 0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 µl de BSA en 200 µl del reactivo Bradford y H<sub>2</sub>O miliQ hasta un volumen final de 1 ml. Por su parte, las muestras problema se prepararon por duplicado o triplicado, empleando en cada réplica 2 µl de las soluciones problema, 200 µl del reactivo Bradford y 798 µl de H<sub>2</sub>O miliQ. Tanto las soluciones con BSA como las de las muestras se dejaron incubar, al menos, 5 minutos a temperatura ambiente tras añadir el reactivo Bradford; la medida de las absorbancias a 595 nm se realizó en un espectrofotómetro de haz simple (Unicam UV 500 de Thermo Spectronic), usando para ello una cubeta de plástico de 1 cm de longitud de paso y la solución de 0 µg/µl de BSA como control negativo.

La recta de calibrado se ajusta a una ecuación del tipo  $y = a \cdot x + b$ , donde  $y$  es la absorbancia,  $a$  es la pendiente de la recta,  $x$  la concentración de proteínas y  $b$  es la ordenada en el origen. Esta recta deriva de la aplicación de la Ley de Beer-Lambert, es decir,  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ , en que  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción,  $c$  la concentración de la muestra y  $l$  la longitud del paso de la cubeta<sup>181</sup>. Por tanto, una vez obtenida la recta de calibrado y las absorbancias de las muestras, se llevó a cabo una interpolación de los valores conseguidos para saber la concentración de las proteínas totales en cada una de ellas (teniendo en cuenta que se utilizaron 2 µl de cada muestra) y los resultados se expresaron en µg/µl.

### 3.4.3 Purificación de mitocondrias

En determinados ensayos, fue necesaria la extracción previa de las mitocondrias de los pellets celulares obtenidos. Este proceso se realizó siguiendo el protocolo de (Fernández-Vizarra et al., 2006).

Para realizar el ensayo, se partió de 15-25 placas de 146 mm con células HEK293T a una confluencia del 80-90 %, crecidas 3-4 días antes en medio DMEM con glucosa fisiológica. Las células se tripsinizaron, se recogieron en varios tubos Falcon de 50 ml (2-3 según la cantidad de células en las placas), se centrifugaron a 1 500 rpm durante 8 minutos y se lavaron dos veces con PBS frío; en el segundo lavado las células se transfirieron a un nuevo Falcon de 15 ml. A

<sup>180</sup> El reactivo Bradford empleado fue el *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* de Bio-Rad.

<sup>181</sup> La longitud de la cubeta es 1 cm, de modo que la ecuación puede quedar como  $A = \varepsilon \cdot c \rightarrow y - b = a \cdot x$ ;  $x = \frac{y-b}{a} \rightarrow [\text{Proteínas}] = \frac{\text{Absorbancia medida} - \text{ordenada en el origen}}{\text{pendiente de la recta}}$

continuación, se descartó el sobrenadante, se midió el volumen ocupado por el pellet celular y se congeló durante 10 minutos, como mínimo, para favorecer la ruptura de las células.

El pellet celular se descongeló lentamente en hielo (todo el ensayo fue realizado en hielo para evitar degradar las mitocondrias) y fue resuspendido en un volumen (1 V) de medio hipotónico IB 0,1 X (obtenido a partir de una dilución 1:100 del medio hipotónico IB 10 X, compuesto por NaCl 0,35 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris HCl 0,35 M y con un pH de 7,8) para facilitar la rotura de las células. Concretamente, se resuspendió en la mitad del volumen y se pasó a un homogeneizador de tejido (de vidrio), tipo Potter-Dounce, y de 2 ó 5 cm<sup>3</sup> (dependiendo del menor o mayor volumen de la muestra); la otra mitad del volumen del medio IB 0,1 X fue utilizado para recoger los restos de la suspensión que quedasen en el Falcon de 15 ml y transferirlos al homogeneizador, junto al resto de la suspensión celular.

Posteriormente, se llevó a cabo la rotura de las células, realizando 25 *strokes* (movimientos manuales verticales y rápidos) del tubo de vidrio junto a un homogeneizador con un émbolo de teflón acoplado, y se añadió 0,1 V de medio IB 10 X<sup>182</sup>. Las células homogeneizadas se transfirieron a varios eppendorfs de 1,5 ml y se centrifugaron a 3 500 rpm y 4 °C durante 3 minutos, consiguiendo separar de esta manera las células que no se hubieran roto y los núcleos de cada sobrenadante. Después, estos últimos fueron transferidos a sendos eppendorfs de 1,5 ml (sobrenadantes 1), mientras que los pellets obtenidos fueron sometidos al mismo proceso que el pellet celular original: se resuspendieron en 1 V<sup>183</sup> de medio hipotónico IB 0,1 X, primero con la mitad del volumen para transferirlos a un mismo homogeneizador de vidrio y después con la otra mitad del volumen para recoger los restos; se sometieron a 25 *strokes*; se les añadió 0,1 V de IB 10 X; se centrifugaron en eppendorfs de 1,5 ml a 3 500 rpm y 4 °C durante 3 minutos. Los nuevos sobrenadantes obtenidos (sobrenadantes 2) se mezclaron con los sobrenadantes 1 y se centrifugaron de nuevo a 3 500 rpm y 4 °C durante 3 minutos. A continuación, los sobrenadantes obtenidos (sobrenadantes 3) se volvieron a centrifugar a 13 000 rpm y 4 °C durante 5 minutos para precipitar las mitocondrias.

Los pellets mitocondriales se lavaron dos veces con medio A (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM y pH de 7,4) y se centrifugaron a 13 000 rpm y 4 °C durante 5 minutos. En cada lavado se fueron juntando las soluciones hasta realizar un último lavado con medio de mitoplastos (manitol 250 mM, sacarosa 70 mM, HEPES 2 mM y pH de 7,4). Tras tener todas las mitocondrias en un mismo eppendorf de 1,5 ml, se llevó a cabo su cuantificación por el método de Bradford y volvieron a centrifugarse a 13 000 rpm y 4 °C durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron en una solución preparada previamente con el tampón TL (Mg-Acetato 4 mM, Aminocaproico 5 mM, NaCl 50 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 30 mM y pH de 7,4 (Koppen et al., 2007)) y la mezcla comercial de inhibidores de proteasas *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* de Roche; los inhibidores de proteasas (concentración 1 X) se añadieron para evitar la degradación de las proteínas mitocondriales. Cabe destacar que el volumen en que se resuspendió el pellet de mitocondrias en esta solución final fue el necesario para tenerlas a 5 µg/µl.

Las mitocondrias purificadas se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su nuevo uso.

---

<sup>182</sup> Este paso fue realizado con el fin de volver el medio isotónico.

<sup>183</sup> De cada pellet tras centrifugar a 3 500 rpm y 4 °C durante 3 minutos, no del pellet celular original.

### 3.4.4 Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Las proteínas totales cuantificadas fueron analizadas por *Western blot* con el fin de valorar los niveles de proteínas concretas entre distintas muestras.

#### 3.4.4.1 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se cargaron en geles de poliacrilamida con SDS para su separación mediante electroforesis desnaturizante (y, por tanto, en función de su peso molecular<sup>184</sup>) con el sistema de electroforesis *Mini-PROTEAN® II Cell* de Bio-Rad.

El primer paso consistió en elaborar el gel de electroforesis con el que separar las proteínas totales. Cada gel de electroforesis se componía a su vez de dos geles diferentes: uno concentrador (*stacking*), siempre preparado de la misma manera, y otro separador (*running*), con diferentes concentraciones para conseguir una mayor o menor porosidad<sup>185</sup> (Tabla 3.40). Se añadieron todos los reactivos en Falcon de 15 ml para ambos tipos geles a la vez, con la excepción del APS y el TEMED<sup>186</sup>, que sólo se adicionaron en la mezcla del gel separador. A continuación, dicha mezcla se vertió entre dos cristales de 1 mm de separación hasta ocupar 2/3 del volumen total y después se añadió una capa de isopropanol sobre el gel para que la parte superior quedase uniforme y para evitar la posible entrada de oxígeno<sup>187</sup>.

Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol, se lavó el gel separador con H<sub>2</sub>O destilada y se añadió el APS y el TEMED a la mezcla del gel concentrador, que rápidamente se añadió sobre el gel separador hasta ocupar la totalidad de los cristales. Por último, se colocó un peine de 1 mm de grosor para formar los pocillos. Tras la polimerización, se montaron los cristales sobre la cubeta de electroforesis, se añadió el tampón de electroforesis 1 X (diluido 1/10 a partir del tampón de electroforesis 10 X: Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92 M y SDS 10 %), se retiró el peine y se procedió a la carga de las muestras. En concreto, se cargaron 6 µl del marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* de Bio-Rad en el primer pocillo y 12 µl de las muestras de interés en los siguientes. De estos 12 µl, 3 µl fueron de tampón de carga 4 X (glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v) y β-mercaptoetanol 4% (v/v)) y 9 µl entre las muestras problema y H<sub>2</sub>O miliQ<sup>188</sup>.

Finalmente, se desarrolló la electroforesis a intensidad constante de 12 mA/gel hasta que el frente de banda atravesó el gel concentrador y llegó al separador, momento en que se incrementó la intensidad a 24 mA/gel hasta el fin de la electroforesis.

<sup>184</sup> El SDS desnaturiza a las proteínas y les otorga una carga global negativa proporcional a su tamaño.

<sup>185</sup> A mayor porosidad se separaban y visualizaban mejor las proteínas de un tamaño menor y viceversa.

<sup>186</sup> El APS y el TEMED inician y propagan la reacción de polimerización, respectivamente.

<sup>187</sup> El oxígeno inhibe la polimerización de la poliacrilamida.

<sup>188</sup> La cantidad de las muestras (µl) dependió de los µg de proteína a cargar y los valores de concentración obtenidos previamente mediante el método de Bradford.



**Tabla 3.40.** Reactivos utilizados para la preparación de los geles concentrador y separador

Reactivo	Gel concentrador 5 % <sup>189</sup>	Gel separador		
		8 %	10 %	12,5 %
Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 <sup>190</sup>	330 µl	1 333 µl	1 700 µl	2 125 µl
Tampón 4 X <sup>191</sup>	500 µl	1 250 µl	1 250 µl	1 250 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	1 167 µl	2 420 µl	2 000 µl	1 500 µl
APS 20%	10 µl	15 µl	15 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

**Tabla 3.41.** Composición de los tampones 4 X utilizados para los geles SDS-PAGE

Reactivo	Composición
Tampón 4 X del gel concentrador	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón 4 X del gel separador	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 % y EDTA 8 mM

#### 3.4.4.2 Electrotransferencia de proteínas a una membrana de PVDF

El siguiente paso fue transferir las proteínas separadas en la electroforesis a una membrana de PVDF. Para ello, se utilizó el sistema de electrotransferencia húmeda *Mini Trans-Blot® Cell* de Bio-Rad. Primero se recortó un trozo de membrana de PVDF y se activó con metanol absoluto<sup>192</sup> durante, al menos, 30 s; se recortaron cuatro trozos de papel Whatman®; tanto el gel, la membrana como los papeles se sumergieron en BSN frío (tampón de electrotransferencia: Tris 48 mM, glicina 39 mM y metanol 20 % (v/v)) y se procedió a su montaje, junto al resto del sistema de electrotransferencia de Bio-Rad, según las instrucciones del fabricante; finalmente, se comenzó la electrotransferencia a un voltaje constante de 80 V durante 2 h<sup>193</sup>, a 4 °C<sup>194</sup> y en agitación constante a 500 rpm con un agitador magnético.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante tinción reversible con rojo Ponceau (Ponceau S solution de Sigma-Aldrich), un colorante que tiñe todas las proteínas de una muestra de manera inespecífica y que puede retirarse lavando la membrana varias veces con H<sub>2</sub>O destilada. Después se incubó la membrana con un agente bloqueante, en concreto, una disolución de leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) en PBS-T (PBS con detergente Tween-20 al 0,1 % (v/v)) toda la noche a 4 °C y con agitación suave en un agitador orbital (100 rpm en el *Orbital Shaker SO3* de Stuart Scientific<sup>195</sup>). Este paso final se realizó para bloquear la superficie de la membrana sin proteínas y evitar así la unión inespecífica de los anticuerpos usados posteriormente.

<sup>189</sup> El gel concentrador presenta un porcentaje de porosidad bajo para así generar un tamaño de poro adecuado para poder concentrar todas las proteínas en un mismo punto.

<sup>190</sup> Mezcla comercial de IWT Reagents (PanReac AppliChem); solución de acrilamida (30 %) - 37,5:1.

<sup>191</sup> Tampón diferente según el tipo de gel (Tabla 3.41).

<sup>192</sup> La membrana es muy hidrofóbica. El metanol la hidrata, permitiendo su interacción con las proteínas.

<sup>193</sup> Alternativas: 100 V durante 1 hora; 30 V toda la noche.

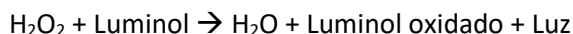
<sup>194</sup> En el sistema de electrotransferencia se añadió un bloque de hielo para refrigerar y el ensayo en sí se realizó en una cámara fría.

<sup>195</sup> Desde este punto de la presente memoria, todas las agitaciones suaves indicadas en los próximos apartados hacen referencia a las rpm y el agitador orbital indicados.



### 3.4.4.3 Incubación con anticuerpos y detección quimioluminiscente

La detección específica de las proteínas presentes en la membrana de PVDF se basó en una inmunodetección indirecta. Se usó un anticuerpo primario para localizar una proteína de interés y un anticuerpo secundario para encontrar al primario. Además, el anticuerpo secundario iba conjugado con la enzima HRP, que, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luminol, cataliza la reducción del peróxido, la oxidación del luminol y la liberación de luz. Esta última lleva a la formación de un compuesto excitado, llamado 3-aminofalato, que disminuye su energía mediante la liberación de fotones de luz a 425 nm. Un esquema básico de la reacción es:



La luz liberada durante esta reacción quimioluminiscente puede detectarse mediante el equipo adecuado y su localización se corresponderá con la de la proteína de interés.

Para llevar a cabo el ensayo, primero se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante 3 lavados con PBS-T de 5-10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se incubó la membrana durante 2 horas con el anticuerpo primario a temperatura ambiente y en agitación<sup>196</sup>, diluido a la proporción adecuada (Tabla 3.42) en 6 ml de una disolución de PBS-T con 0,25 % de leche. Después, se realizaron tres nuevos lavados con PBS-T en las mismas condiciones que los anteriores y se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o de conejo, según el origen biológico del anticuerpo primario) conjugado con la HRP. Esto también se realizó a temperatura ambiente y en agitación, así como diluido de nuevo a la proporción adecuada (Tabla 3.43) en 6 ml de una disolución de PBS-T con 0,25 % de leche. Finalmente, se llevaron a cabo tres últimos lavados con PBS-T (en las mismas condiciones que los anteriores) antes de revelar los resultados.

Para visualizar los resultados, se mezclaron previamente los dos sustratos del kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate de ThermoFisher Scientific (peróxido de hidrógeno y luminol), añadiendo 800 µl de cada uno en un Falcon de 15 ml, y se incubó la membrana con la solución resultante durante 5 minutos. Después, se introdujo la membrana en una funda de plástico y esta se dispuso sobre la bandeja superior del equipo de detección de quimioluminiscencia (Amersham™ Imager 600 de GE Healthcare), que permitió obtener imágenes de las proteínas de interés a distintos tiempos de exposición. Finalmente, las intensidades de las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante el *software* ImageQuant TL, en que se empleó el algoritmo *rolling ball* (radio de 90) para eliminar el ruido de fondo.

---

<sup>196</sup> Alternativa: incubación del anticuerpo primario toda la noche a 4 °C y con agitación suave.

Tabla 3.42. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	MW <sup>197</sup> (kDa aprox.)	Dilución	Origen	Clon	Casa comercial (código)
$\alpha$ -Tubulina	52	1:5000	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich (T6074)
Actina	42	1:5000	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich (A2066)
AIF	57	1:20000	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich (A7549)
CS	45	1:1000	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich (SAB2702186)
COI (CIV)	37	1:2000	Ratón	Monoclonal	ThermoFisher (459600)
GRSF1	50	1:1000	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich (HPA036985)
Hsp60	60	1:10000	Conejo	Policlonal	Abcam (ab46798)
MGME1	32	1:1000	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich (HPA040913)
ND6 (CI)	15	1:400	Conejo	Policlonal	Abcam (ab81212)
NDUFA9 (CI)	35	1:1000	Ratón	Monoclonal	Abcam (ab14713)
NDUFB8 (CI)	18	1:1000	Ratón	Monoclonal	ThermoFisher (459210)
OXPPOS cóctel	-	1:1000	Ratón	Monoclonal	Abcam (ab110411)
Porina	31	1:1000	Ratón	Monoclonal	Abcam (ab14734)
PNPasa	80	1:5000	Conejo	Policlonal	Proteintech (14487-1-AP)
POLG	140	1:500	Conejo	Policlonal	ThermoFisher (PA5-29676)
POLG	140	1:200	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz (sc-390634)
POLRMT	140	1:400	Conejo	Policlonal	ThermoFisher (PA5-28196)
Rieske	23	1:1000	Conejo	Policlonal	ThermoFisher (PA521420)
SDHA (CII)	70	1:1000	Ratón	Monoclonal	ThermoFisher (459200)
SDHB (CII)	29	1:1000	Ratón	Monoclonal	ThermoFisher (459230)
SUV3	78	1:500	Ratón	Policlonal	Sigma-Aldrich (SAB1400271)
SUV3	78	1:1000	Conejo	Monoclonal	Sigma-Aldrich (ZRB1065)
TEFM	35	1:1000	Conejo	Policlonal	Sigma-Aldrich (HPA023788)
TFAM	23	1:1000	Conejo	Monoclonal	Sigma-Aldrich (SAB5701430)
TFB2M	37	1:200	Ratón	Monoclonal	Sigma-Aldrich (SAB1402620)
TOM20	15	1:20000	Conejo	Policlonal	Santa Cruz (sc-11415)
UQCR2 (CIII)	44	1:2000	Ratón	Monoclonal	Abcam (ab14745)

Tabla 3.43. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Dilución	Origen	Clon	Casa comercial (código)
Conejo IgG (H+L) con HRP	1:5000	Cabra	Policlonal	ThermoFisher (31460)
Ratón IgG (H+L) con HRP	1:5000	Cabra	Policlonal	ThermoFisher (31430)

#### 3.4.4.4 Reutilización de las membranas

Las membranas ya utilizadas para revelar una proteína pudieron ser empleadas nuevamente para detectar otras. Para ello, se lavaron con PBS-T durante, al menos, 1 hora y se repitió todo el proceso indicado en el apartado anterior, desde los 3 primeros lavados en PBS-T (incluidos).

Por otra parte, en caso de querer visualizar en una misma membrana una proteína localizada a una altura muy similar a otra ya analizada previamente, se realizó un *stripping*: se rompieron las interacciones antígeno-anticuerpo para eliminar los anticuerpos con los que se

<sup>197</sup> El MW se trata del detectado en los ensayos que, en algunos casos, difiere con respecto al teórico. En caso de duda, la banda correspondiente a la proteína de interés se verificó mediante la sobreexpresión del gen codificante, su análisis en diferentes líneas celulares y/o estudiándola en muestras mitocondriales.

había incubado la membrana anteriormente. Para ello, se cubrió la membrana con tampón de *stripping* (Tris-HCl 1 M pH 6,7,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y SDS 2 %), se incubó durante 30 minutos a 58 °C, agitándola manualmente cada 10 minutos, y se lavó 3 veces con PBS-T (10 minutos cada lavado). Finalmente, la membrana fue incubada de nuevo con una disolución de leche al 5 % en PBS-T, durante toda la noche a 4 °C y con agitación suave, y se volvieron a realizar los pasos presentes en el apartado anterior.

Las membranas que no se usaron inmediatamente, se guardaron a 4 °C en PBS-T durante un tiempo. Las que no se emplearon, se secaron y se almacenaron definitivamente a 4 °C en papel PARAFILM® M de VWR.

### 3.4.5 Localización intramitocondrial de proteínas

Para determinar la localización intramitocondrial de la PNPasa se llevaron a cabo dos ensayos diferentes: por un lado, separación de las proteínas mitocondriales solubles y de membrana (Ryan et al., 2001) y, por otro, tratamiento con tripsina de mitocondrias sometidas a diferentes concentraciones de digitonina (Signes et al., 2019). Para ambos experimentos se partió de mitocondrias purificadas previamente.

#### 3.4.5.1 Separación de las proteínas mitocondriales solubles y de membrana

Este ensayo se inició a partir de alícuotas con 400  $\mu$ g de mitocondrias, que fueron sometidas a dos procesos diferentes: extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y rotura física con ciclos de *freeze-thawing* (congelación y descongelación) seguidos de una sonicación. En ambos casos, se obtuvieron dos fracciones: sobrenadante y pellet. El sobrenadante contenía proteínas solubles<sup>198</sup> (rotura física) o proteínas solubles y periféricas de membrana (extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); en el pellet se encontraban tanto las proteínas integrales como las periféricas de membrana (rotura física) o las proteínas integrales de membrana (extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Para la rotura física, las mitocondrias se resuspendieron en 240  $\mu$ l de una solución con Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM y 9,6  $\mu$ l de la mezcla de inhibidores de proteasas 25 X de Roche. Después, se sometieron a 5 ciclos de *freeze-thawing*, primero congelando la muestra en nitrógeno líquido durante 30 s y después descongelándola en un termobloque a 37 °C, durante 3 minutos y con un vórtex posterior<sup>199</sup>. Posteriormente, la muestra se sonicó 2 veces durante 5 s, con un 20 % de amplitud y un ciclo del 0,5 %, en un sonicador Ultrasonic Processor UP200S de Hielscher. A continuación, se cogieron 40  $\mu$ l de las mitocondrias totales (muestra control) y el resto del volumen se centrifugó a 18 000 rcf, a 4 °C y durante 1 hora. Del sobrenadante se recogieron los 160  $\mu$ l más alejados del pellet<sup>200</sup>, mientras que el pellet se resuspendió en 60  $\mu$ l de la primera solución con Tris-HCl, NaCl e inhibidores de proteasas. Finalmente, las muestras obtenidas fueron analizadas en un *Western blot*<sup>201</sup>, junto a la muestra control.

Para la extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , las mitocondrias se centrifugaron a 13 000 rpm, a 4 °C y durante 4 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 240  $\mu$ l de una solución alcalina, con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M pH 11,3 y con 9,6  $\mu$ l de la mezcla de inhibidores de proteasas 25 X de Roche, y se

<sup>198</sup> Las proteínas solubles podían ser tanto de la matriz mitocondrial como del espacio intermembrana.

<sup>199</sup> Los tiempos de congelación y descongelación son aproximados, según lo que tarde cada muestra.

<sup>200</sup> El volumen restante del sobrenadante se descartó por estar más próximo al pellet.

<sup>201</sup> Gel separador del 10 %.

incubó durante 30 minutos en hielo (mezclando cada 5 minutos). Posteriormente, se cogieron 40  $\mu\text{l}$  de la mezcla (muestra control) y el resto del volumen se centrifugó a 18 000 rcf, a 4 °C y durante 1 hora, igual que para la rotura física. Las dos fracciones obtenidas se trataron y analizaron de la misma forma que la indicada en el párrafo anterior, con la diferencia de resuspender el pellet en 60  $\mu\text{l}$  de la primera solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con inhibidores de proteasas.

### 3.4.5.2 Tratamiento de mitocondrias con tripsina y digitonina

Este experimento se basa en el uso de la digitonina, un detergente suave que permite disgregar las membranas mitocondriales, y la tripsina, una proteasa que hidroliza las proteínas en péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Cuanto más internalizada se encuentre una proteína dentro de las mitocondrias, más difícil será su acceso para la tripsina y requerirá de una mayor dosis de digitonina. Este comportamiento puede observarse mediante un *Western blot*, de manera que, para una misma concentración de tripsina, una proteína dejará de detectarse a menores dosis de digitonina si se encuentra más alejada de la matriz mitocondrial y viceversa.

El ensayo se realizó con alícuotas de 100  $\mu\text{g}$  de mitocondrias purificadas previamente, que se centrifugaron a 13 300 rpm, a 4 °C y durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  del tampón TL (composición en el apartado 3.4.3), que se dividieron en 20  $\mu\text{l}$  por eppendorf. A continuación, a cada suspensión se le añadió tripsina a una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS y diferentes cantidades de digitonina, hasta un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  por muestra (alcanzado con PBS). Las dosis de digitonina entre todas las muestras fueron de 0, 25, 75, 150, 300 y 900  $\mu\text{g}$ , todas ellas procedentes de una solución de este detergente preparada previamente a 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en PBS.

Cabe destacar que, además de la tripsina y la digitonina, se incluyó un control de la técnica: 20  $\mu\text{l}$  de las mitocondrias se trataron con 1  $\mu\text{l}$  de Tritón (detergente fuerte) al 1 % en PBS y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tripsina, también para un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  con PBS. Con esto se solubilizaron completamente las mitocondrias y pudo evaluarse si la concentración escogida de tripsina era capaz de digerir por completo la proteína de estudio cuando ésta no estaba protegida por las membranas mitocondriales.

Una vez preparadas las muestras, se incubaron a 25 °C durante 20 minutos y se visualizaron los resultados mediante un *Western blot*, con un gel separador del 12,5 %.

### **3.4.6 Estudio de complejos mitocondriales con BN-PAGE**

El análisis de los niveles y el ensamblaje de los complejos y supercomplejos del sistema OXPHOS se llevó a cabo mediante BN-PAGE, una técnica que se basa en realizar una electroforesis nativa y que, por tanto, mantiene las interacciones entre las diferentes subunidades de los complejos y de los complejos entre sí. Además, con este ensayo es posible separar las proteínas en una segunda dimensión, lo que fue realizado para evaluar la composición del degradosoma mitocondrial.

### 3.4.6.1 BN-PAGE 1D

La primera dimensión de la BN-PAGE se llevó a cabo a partir de mitoplastos<sup>202</sup> y en base a una serie de protocolos publicados: (Leary & Sasarman, 2009; Timón-Gómez et al., 2020; Wittig et al., 2006). En concreto, cada muestra de mitoplastos se obtuvo a partir de  $2 \cdot 10^6$  células, crecidas 3 días antes en DMEM con glucosa fisiológica. Las células primero se tripsinizaron, se lavaron 2 veces con PBS frío (4 °C), se contaron y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS frío. Después, se añadieron 200  $\mu$ l de digitonina 4 mg/ml en PBS; se incubaron en hielo durante 10 minutos; se les añadió 1 ml de PBS frío; se centrifugaron a 10 000 rcf, a 4 °C y durante 5 minutos; se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet de nuevo con 1 ml de PBS frío; finalmente, se volvió a centrifugar cada muestra a 10 000 rcf, a 4 °C y durante 5 minutos, obteniendo los mitoplastos. Éstos fueron almacenados a -80 °C o se continuó con su uso: se resuspendieron en 75  $\mu$ l de una mezcla de ácido aminocaproico 0,75 M, Bis-Tris/HCl 50 mM pH 7 e inhibidores de proteasas<sup>203</sup>; se cuantificaron por el método de Bradford; se trataron con digitonina o DDM al 10 % (en PBS y H<sub>2</sub>O, respectivamente) para una concentración final del 1 %<sup>204</sup>; se pusieron en un agitador rotativo vertical, a 4 °C y 10 minutos; se centrifugaron a 18 000 rcf, a 4 °C y durante 30 minutos; finalmente, se recogieron los sobrenadantes en tubos nuevos.

Una vez preparadas las muestras, se realizó la electroforesis. Para ello se utilizaron geles comerciales *NativePAGE™ 3-12%, Bis-Tris, 1.0 mm, 10-well* de Invitrogen™, de los que se limpiaron sus pocillos con papel de filtro, y el sistema *XCell Surelock™ Mini-Cell* de Life Technologies™, que se montó siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se añadió el tampón del cátodo *Dark Blue* hasta cubrir la totalidad de cada gel<sup>205</sup> y el tampón del ánodo *NativePAGE™ Running Buffer 1 X*, ambos preparados según las instrucciones comerciales<sup>206</sup>. Después, se añadió el marcador de pesos moleculares *NativeMark™ Unstained Protein Standard* de Invitrogen™, se cargaron las muestras junto al tampón de carga *Blue G-250* al 5 % (en ácido aminocaproico 0,75 M, Bis-Tris/HCl 50 mM pH 7)<sup>207</sup> y se inició la electroforesis a 4 °C, 12 mA/gel y 80 V durante 30 minutos. Después, se subió el voltaje a 150 V; 30 minutos

---

<sup>202</sup> Mitocondrias despojadas de su membrana externa, pero con la membrana interna intacta. Pueden obtenerse a partir de un detergente suave (digitonina) en las proporciones adecuadas.

<sup>203</sup> Este pellet es muy difícil de resuspender. Se realizó añadiendo los 75  $\mu$ l, machacándolo con una punta azul de micropipeta y, finalmente, resuspendiendo los trocitos obtenidos.

<sup>204</sup> El DDM es un detergente más fuerte que la digitonina. Esta diferencia entre ambos permite visualizar los complejos en diferentes estados: con el DDM se pierden las interacciones entre los complejos, de manera que pueden valorarse los complejos de forma individual; la digitonina permite separar los complejos de la membrana interna de los mitoplastos, pero mantiene las interacciones entre los mismos y, por tanto, habilita el estudio de los supercomplejos. Además, la altura a la que se detectan los complejos respiratorios varía según el detergente usado: con la digitonina, al ser menos agresiva que el DDM, permanecen más lípidos unidos a las proteínas, que las retienen en el gel. Por tanto, con el DDM los complejos salen a un tamaño menor que con la digitonina.

<sup>205</sup> El tampón del cátodo *Dark Blue* tiene un color muy oscuro y es difícil visualizar los pocillos. Previamente a añadirlo, los pocillos del gel se marcaron con un rotulador para poder localizarlos.

<sup>206</sup> *NativePage™ Novex® Bis-Tris Gel System* de Life Technologies™.

<sup>207</sup> Este tampón actuó como sustituto del SDS (*Western blot*), sin desnaturalizar a las proteínas, pero dotándolas de carga negativa y, por tanto, la capacidad de migrar en el gel nativo.

más tarde (es decir, tras 1 hora de electroforesis) se paró la electroforesis, se sustituyó el tampón del cátodo por el tampón *Light Blue*<sup>208</sup> y se reanudó el ensayo a 150 V hasta que se salió el frente.

Tras terminar la electroforesis, los complejos proteicos se transfirieron a una membrana de PVDF por gel, la membrana se incubó con anticuerpos que permitiesen localizar las subunidades de los complejos de interés y se revelaron los resultados por medio de la reacción quimioluminiscente catalizada por la HRP. Cabe destacar que, adicionalmente, tras la electrotransferencia la membrana fue lavada con metanol absoluto para eliminar el exceso de colorante azul en la misma y así visualizar mejor los complejos.

### 3.4.6.2 BN-PAGE 2D

Para realizar una BN-PAGE de dos dimensiones, se partió de alícuotas de 200 µg de mitocondrias purificadas, que se centrifugaron a 13 000 rpm, a 4 °C y durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en un volumen final de 75 µl en una mezcla de 60,92 µl del tampón TL (composición en el apartado 3.4.3), 11,28 µl de digitonina al 10 % (quedando así a una concentración final del 1,5 % en las muestras) y 3 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas 25 X. A continuación, las muestras se incubaron a 4 °C en un agitador rotativo vertical durante 20 minutos y se centrifugaron a 13 000 rcf, a 4 °C y durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como muestra para correr la primera dimensión de la BN-PAGE, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

La segunda dimensión se realizó en geles de Tricina-SDS-PAGE, ya que ofrecen una mejor resolución (Schägger, 2006). Estos geles, al contrario que para la primera dimensión, contienen SDS y, por tanto, permiten realizar una electroforesis desnaturalizante. La manera de preparar los geles y el sistema utilizado fue similar a lo descrito en el apartado 3.4.4, con las siguientes diferencias: los geles se realizaron con un grosor de 1,5 mm, con dos pocillos<sup>209</sup> y cada uno de ellos se componía de dos fases: un gel concentrador y un gel separador, cuyas composiciones aparecen en la Tabla 3.44 y las de los reactivos utilizados para los mismos en la Tabla 3.45.

**Tabla 3.44.** Reactivos utilizados para realizar geles de Tricina-SDS-PAGE

Reactivo	Gel concentrador 4 %	Gel separador 10 %
Acrilamida:bisacrilamida-3	500 µl	2 400 µl
Tampón del gel 3 X	1 500 µl	4 000 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	4 000 µl	5 600 µl
APS 20%	22,5 µl	30 µl
TEMED	4,5 µl	6 µl

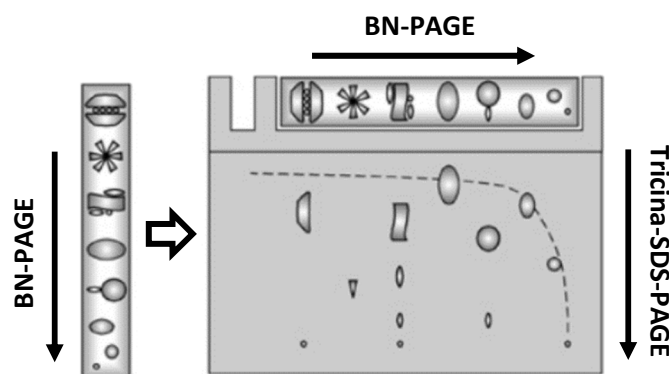
<sup>208</sup> Presenta la misma composición que el *Dark Blue*, pero 10 veces menos de concentración del *NativePAGE™ Cathode Buffer Additive*.

<sup>209</sup> El primero del tamaño habitual y el segundo de mayor longitud (Figura 3.2).

**Tabla 3.45.** Composición de los reactivos utilizados en los geles Tricina-SDS-PAGE

Reactivo	Composición
Acrilamida:bisacrilamida-3	48 g de acrilamida y 1,5 g de bisacrilamida en 100 ml de H <sub>2</sub> O miliQ
Tampón del gel 3 X	Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0,3 %, pH 8,45
Tampón del cátodo 10 X	Tris 1 M, Tricina 1 M, SDS 1 %, pH 8,25
Tampón del ánodo 10 X	Tris 1 M, HCl 0,225 M, pH 8,9

Tras tener los geles preparados y la primera dimensión de la BN-PAGE terminada, se recortaron con un bisturí las calles de interés de los geles *NativePAGE™*. Después, se incubaron 1 hora temperatura ambiente en una solución de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1 % en H<sub>2</sub>O miliQ, con el fin de desnaturalizar y reducir los puentes disulfuro de las proteínas que forman los complejos proteicos. A continuación, se cargó el marcador *Precision Plus Protein™* en el primer pocillo y se colocaron de manera horizontal cada una de las calles de interés en el segundo pocillo (Figura 3.2), teniendo así que haber preparado tantos geles de Tricina-SDS-PAGE como calles a analizar por segunda dimensión se requirieron. Finalmente, se inició la electroforesis a 4 °C y 30 V, hasta que las muestras de la calle de la primera dimensión entraron en el gel separador, momento en que se incrementó el voltaje a 100 V hasta que el frente de banda se salió del gel.



**Figura 3.2.** (adaptada de (Fiala et al., 2011)). Esquema de una BN-PAGE 2D. Se corre una primera dimensión nativa con mitocondrias purificadas para separar los complejos proteicos mitocondriales, se recorta la banda de interés y se coloca de forma horizontal en un nuevo gel, realizando una electroforesis desnaturalizante Tricina-SDS-PAGE. Las subunidades de cada complejo se separan en una misma calle del gel de la segunda dimensión.

Resuelta la electroforesis, los resultados se visualizaron y analizaron por inmunodetección, tal y como aparece indicado en el apartado 3.4.4.

### 3.5 Ensayos funcionales del sistema OXPHOS

#### 3.5.1 Medida de los niveles de ATP mitocondrial

El ensayo empleado para medir los niveles de ATP mitocondrial se basa en dos fundamentos: utilizar 2-deoxi-glucosa, molécula que compite con la glucosa por las enzimas glucolíticas y que no puede ser degradada debido a su grupo deoxi-, provocando que, en caso de encontrarse en exceso, dichas enzimas queden inhibidas y no se produzca ATP por medio de

la glucólisis; la reacción catalizada por la luciferasa, en que tomando luciferina y ATP como sustratos se genera una señal lumínica, proporcional a la cantidad de ATP consumido. La reacción catalizada por la luciferasa tiene lugar en dos pasos:

- i. Luciferina + ATP → Luciferiladenilato + PP<sub>i</sub>
- ii. Luciferiladenilato + O<sub>2</sub> → oxiluciferina + AMP + luz

Para la medida de los niveles de ATP mitocondrial, se seleccionaron una serie de células de interés y éstas fueron sembradas en una placa de 96 pocillos con fondo blanco de la casa comercial Nunc, preparadas para la medida de luminiscencia. Por cada modelo celular se sembraron 12 pocillos con pipeta multicanal para reducir el error de pipeteo que pudiera provocar diferencias de densidad celular entre pocillos. En concreto, se añadieron 200 µl/pocillo a partir de una dilución intermedia de 1·10<sup>5</sup> células/ml en medio DMEM, esto es, se sembraron 2·10<sup>4</sup> células/pocillo. Tras 10-14 horas, los pocillos fueron lavados dos veces con PBS y a 6 de los pocillos se les añadieron 100 µl de un tipo de medio de cultivo, mientras que a los 6 restantes otro tipo de medio, según estuvieran destinados a medir la cantidad de ATP mitocondrial o la viabilidad celular (Tabla 3.46).

Las células se dejaron incubando 2 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en ambiente húmedo, tras lo que se midió la señal de fluorescencia en los pocillos usados para la estimación del número de células viables. Posteriormente, en los pocillos destinados al estudio de los niveles de ATP mitocondrial se añadió 1 volumen de la solución luciferina/luciferasa (preparada previamente según las indicaciones presentes en el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* de Promega), se agitó la placa durante 1-2 minutos para favorecer el lisado celular, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos para estabilizar la señal y se tomaron las medidas de luminiscencia. Tanto las medidas de fluorescencia como de luminiscencia se realizaron en el lector de placas NovoStar MBG de Labtech y los resultados se expresaron como cantidad de ATP mitocondrial por célula viable.

**Tabla 3.46.** Medios de cultivo para valorar los niveles de ATP mitocondrial y el número de células viables

Reactivo	Niveles de ATP mitocondrial	Número de células viables
Medio de cultivo	DMEM sin glucosa	DMEM sin glucosa
Piruvato	1 mM	1 mM
2-deoxi-glucosa	5 mM	-
<i>CellTiter-Blue</i> <sup>®210</sup>	-	20 µl

### 3.5.2 Medida de las actividades del CIV y la CS por espectrofotometría

La medida de las actividades del CIV y la CS se basó en las reacciones catalizadas por estas enzimas, evaluando un descenso o incremento de la absorbancia con respecto al tiempo, respectivamente. Esta absorbancia fue detectada mediante un espectrofotómetro de haz simple, termostatzado con un PCB-150 *Water Peltier System* de PerkinElmer<sup>®</sup> y registrada con el *software* Vision 32. Además, para ambas medidas se partió de 3 pellets de cada modelo celular

<sup>210</sup> Nombre completo: *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* de Promega. Kit que permite estimar por fluorescencia el número de células viables presentes en los pocillos, ya que la señal emitida depende de la capacidad metabólica de reducir dicho reactivo por parte de las células viables.



de estudio con  $1 \cdot 10^6$  células/pellet, crecidas tres días antes de su recogida en medio DMEM con glucosa fisiológica. Cada uno de los pellets obtenidos se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón KP 10 mM pH 7,4, se sometieron a 5 ciclos de *freeze-thawing* (realizados como en el apartado 3.4.5) y se cuantificaron por el método de Bradford.

### 3.5.2.1 Actividad del CIV

El CIV cataliza la reacción de citocromo c reducido a citocromo c oxidado. Por tanto, en primer lugar, fue necesario preparar citocromo c reducido a 10 mg/ml a partir del citocromo c comercial C2506 de Sigma-Aldrich. Para ello, se disolvió este citocromo c en tampón KP 100 mM pH 7, se le añadió una punta de espátula de  $\text{NaBH}_4^{211}$ , se incubó en hielo durante 30 minutos y se ajustó su pH hasta 7-7,3 con HCl 1 N.

Una vez obtenido el citocromo c reducido, se llevó a cabo una mezcla de reactivos en una cubeta de plástico (de 1 cm de longitud de paso): 100  $\mu$ l de tampón KP 100 mM pH 7, 100  $\mu$ l de BSA 10 mg/ml (en EDTA 10 mM pH 7,4), 100  $\mu$ l de citocromo c y 685  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ. La mezcla se incubó 2 minutos a 38 °C, que es la temperatura a la que ocurre la reacción, en un baño termostatzado, tras lo que se le añadieron 15  $\mu$ l de la muestra de interés, homogeneizada previa y posteriormente. A continuación, se colocó la cubeta en el espectrofotómetro, termostatzado a 38 °C, y se midió la disminución de la absorbancia del citocromo c recudido con respecto al tiempo a 550 nm. Finalmente, y a partir de la variación de absorbancia obtenida ( $\Delta\text{Abs}$ ), pudo calcularse la actividad específica del CIV (en nmol/(min·mg de proteína)):

$$\text{Act. específica} = \frac{\Delta\text{Abs}(550 \text{ nm}) / \text{min} \times 1000 \times \text{Volumen total (ml)}}{\epsilon \left( \frac{21 \text{ ml}}{\text{nmol} \times \text{cm}} \right) \times \text{Volumen de muestra (ml)} \times [\text{Proteínas}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times 1 \text{ cm}}$$

### 3.5.2.2 Actividad de la CS

La CS cataliza la reacción de transformación del acetil-CoA con el oxalacetato en CoA-SH y citrato. El grupo sulfhidrilo (-SH) del CoA-SH es capaz de interactuar con el DTNB (reactivo de Ellman) y generar, en consecuencia, el compuesto coloreado TNB, que puede monitorizarse. Por tanto, lo primero que se llevó a cabo fue preparar acetil-CoA 7 mg/ml, oxalacetato 1,32 mg/ml, Tritón al 10 % y DTNB 0,4 mg/ml (en Tris-HCl 0,75 M pH 8).

Tras tener los reactivos preparados, se procedió de la misma manera que para la medida de la actividad del CIV, con las siguientes diferencias: la mezcla de la reacción estuvo compuesta por 100  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 0,75 M pH 8, 100  $\mu$ l de DTNB, 50  $\mu$ l de acetil-coA, 10  $\mu$ l de Tritón al 10 %, 10  $\mu$ l de la muestra de estudio y 680  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$ ; se incubó a 30 °C, que es la temperatura óptima de esta reacción, durante 2 minutos; tras la incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de oxalacetato; medir el incremento de la absorbancia a 412 nm. A partir de las  $\Delta\text{Abs}$  obtenidas, se calculó la actividad específica de la CS (en nmol/(min·mg de proteína)):

$$\text{Act. específica} = \frac{\Delta\text{Abs}(412 \text{ nm}) / \text{min} \times 1000 \times \text{Volumen total (ml)}}{\epsilon \left( \frac{13,8 \text{ ml}}{\text{nmol} \times \text{cm}} \right) \times \text{Volumen de muestra (ml)} \times [\text{Proteínas}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times 1 \text{ cm}}$$

<sup>211</sup> Tras añadirlo y agitar el tubo, empezó a habar una reacción (a formarse espuma).

### 3.5.3 Síntesis de proteínas mitocondriales

Esta técnica, basada en la publicación de (Chomyn, 1996), se fundamenta en dos pasos: por un lado, inhibir irreversiblemente la síntesis de proteínas citosólicas y, por otro, añadir metionina marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ . Para inhibir la síntesis de las proteínas citosólicas se utiliza emetina, un compuesto que se une a la subunidad menor 40S de los ribosomas del citoplasma (y que no afecta a los mitorribosomas o ribosomas mitocondriales porque la estructura de estos es distinta). Al inhibir a los ribosomas citosólicos, durante el tiempo que dure el experimento sólo se sintetizarán las 13 proteínas codificadas por el mtDNA. Además, como se añade metionina marcada con  $^{35}\text{S}$ , todas las proteínas mitocondriales que se sintetizan en ese mismo tiempo estarán marcadas con radiactividad.

#### 3.5.3.1 Preparación de las muestras: síntesis *in vivo*

En primer lugar, las células de interés se descongelaron en placas de 96 mm y 3-4 días antes del ensayo se pusieron en medio DMEM con glucosa fisiológica. Después, cada placa se lavó con 10 ml de PBS y las células se incubaron a 37 °C durante 5 minutos con 10 ml de medio de síntesis (DMEM sin metionina ni cisteína, con glucosa fisiológica, 5 % SFB, piruvato 0,11 mg/ml, uridina 50 µg/ml y L-glutamina 2 mM) para que consumiesen la metionina y cisteína endógenas. Posteriormente, se retiró el medio de síntesis, se añadió el medio de síntesis con 100 µg/ml de emetina y se volvieron a incubar las células a 37 °C y durante 5 minutos, consiguiendo así una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas citosólicas.

Una vez terminada la segunda incubación, se añadió a cada placa 7 µl de una mezcla con  $^{35}\text{S}$ , en concreto, la *PRO-MIX™L- $^{35}\text{S}$*  *in Vitro Cell Labeling Mix* de PerkinElmer. A continuación, las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas, de manera que las proteínas mitocondriales sintetizadas durante este tiempo quedaron marcadas con radiactividad<sup>212</sup>. Transcurridas las 2 horas, se eliminó el medio de las placas, se lavaron las células con 10 ml de PBS y se incubaron en medio DMEM con glucosa fisiológica durante otros 5 minutos a 37 °C, para impulsar que los mitorribosomas terminasen de sintetizar las cadenas polipeptídicas. Posteriormente, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 1 400 rpm durante 5 minutos, se lavó el pellet celular con 1 ml de PBS, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y, finalmente, el pellet se resuspendió en un tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, SDS 0,1 % e inhibidor de proteasas PMSF 1 mM de ThermoFisher Scientific).

Los pellets resuspendidos en el tampón de lisis fueron sometidos a 5 ciclos de *freeze-thawing* (realizados como en el apartado 3.4.5) para terminar de romper las membranas celulares, se cuantificaron sus proteínas totales por el método de Bradford y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

#### 3.5.3.2 Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida

La separación electroforética de las proteínas mitocondriales sintetizadas *in vivo* se realizó mediante el sistema PROTEAN® II xi Cell de Bio-Rad, un gel concentrador del 5 % y un gel separador de gradiente exponencial del 15 % al 20 %, ambos geles de poliacrilamida.

---

<sup>212</sup> La radiactividad del  $^{35}\text{S}$  tiene una vida media de 87 días.

Primero se cogió un cristal de 16 x 20 cm (vidrio interior) y otro de 18,3 x 20 cm (vidrio exterior), así como dos separadores de 0,75 mm. Después, ambos cristales se limpiaron con etanol y se ajustaron, junto a los separadores, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se preparó el gel separador mediante una bomba peristáltica Ecoline de Ismatec, un formador de gradiente Hoefer™ SG30 de Amersham Biosciences con un agitador magnético y dos disoluciones al 15 % y 20 % de poliacrilamida (Tabla 3.47). En concreto, se añadieron 13 ml de la disolución de acrilamida al 15 % en la cámara 1 del formador del gradiente, 13 ml de la disolución al 20 % de acrilamida en la cámara 2 y la bomba peristáltica se puso a 16 unidades; se abrió la llave de salida del formador de gradiente y, cuando la disolución al 20 % recorrió 3/4 de la goma, se abrió también la llave intermedia para que la disolución al 15 % se mezclase con la del 20 %; cuando las cámaras empezaron a vaciarse se añadieron 3 ml más de la solución al 15 % a la cámara 1 y, finalmente, se paró de añadir líquido entre los cristales en el momento en que las primeras burbujas estuvieron cercanas al final de la goma<sup>213</sup>.

Tras tener el gel separador en gradiente entre los dos cristales, se añadió isopropanol hasta cubrir todo el espacio sobrante entre los dos vidrios para favorecer la polimerización y establecer el frente del gel. Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol, se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O destilada, se añadió el gel concentrador al 5 % (Tabla 3.47), se colocó un peine de 0,75 mm y se dejó polimerizar. Después, se realizó el montaje para la electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante, poniendo la cubeta en una caja de poliespán con bloques de hielo. El peine se retiró, se limpiaron los pocillos con el tampón de electroforesis (Tabla 3.48), ya añadido previamente, y se cargaron las muestras. En concreto, se cargaron 80 µg de proteínas totales para cada muestra con 5 µl de tampón de carga 4 X (glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v) y β-mercaptoetanol 4% (v/v)) y tampón de lisis hasta 20 µl. Además, como marcador de pesos moleculares se emplearon 20 µl del *Precision Plus Protein™*. Finalmente, se inició la electroforesis a 40 mA y, una vez que las proteínas entraron en el gel separador, se subieron a 50 mA hasta el final del experimento<sup>214</sup>.

**Tabla 3.47.** Reactivos de la electroforesis de proteínas mitocondiales

Reactivo	Gel separador	
	Gel concentrador 5 % <sup>215</sup>	15 %    20 %
Solución de acrilamida 30 % <sup>216</sup>	1 200 µl	12 600 µl    8 600 µl
Tampón del gel concentrador	2 000 µl	-            -
Tampón del gel separador	-	6 300 µl    3 400 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	4 700 µl	6 250 µl    1 200 µl
APS 10 %	75	70 µl        40 µl
TEMED	20	12 µl        6 µl

<sup>213</sup> Para evitar la polimerización de los restos de acrilamida en el formador de gradiente, posteriormente las cámaras y la goma se lavaron rápidamente 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada, poniendo la bomba a 96 unidades.

<sup>214</sup> La electroforesis puede llegar a tardar 10 horas. Se paró 30-40 minutos después de que el frente de banda saliera del gel.

<sup>215</sup> El gel concentrador presenta un porcentaje de porosidad bajo para así generar un tamaño de poro adecuado para poder concentrar todas las proteínas en un mismo punto.

<sup>216</sup> La misma que la indicada en la Tabla 3.40.

**Tabla 3.48.** Composición de los reactivos de la electroforesis de proteínas mitocondriales

Reactivo	Composición
Tampón del gel concentrador	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM.
Tampón del gel separador	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM
Tampón de electroforesis	30 g de Tris, 144 g de glicina y 40 ml de SDS 25 % en 1 l de H <sub>2</sub> O (pH 8,3)

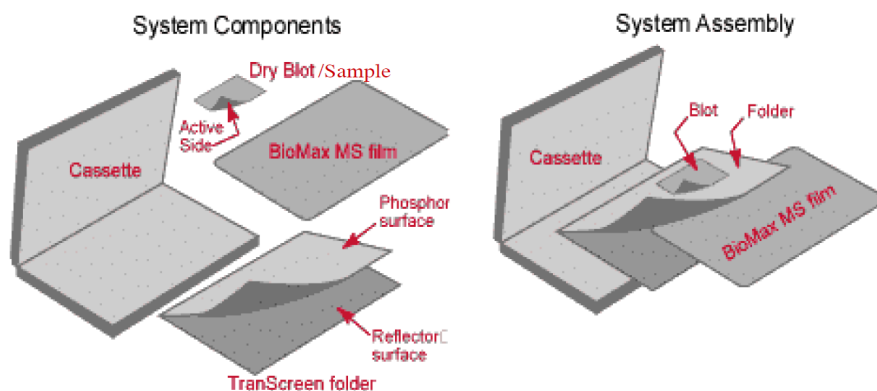
### 3.5.3.3 Tinción del gel, desteñido, rehidratación y escaneo

Al terminar la electroforesis, por un lado, se quitó el gel concentrador y, por otro, el separador con las proteínas separadas se puso en una solución de tinción (metanol 30 %, ácido acético 10 %, H<sub>2</sub>O destilada 60 % y *Brilliant Blue R* (Azul de Coomassie) 0,025 %) durante 30-45 minutos en agitación suave. Posteriormente, se retiró dicha solución y se añadió la de desteñir 1 (metanol 30 %, ácido acético 10 % y H<sub>2</sub>O destilada 60 %) durante 10 minutos, tras lo que volvió a usarse solución de desteñir 1 fresca. Se desteñó el gel toda la noche a 4 °C en agitación suave.

Al día siguiente, se retiró la solución de desteñir 1 y se utilizó la solución de desteñir 2 (metanol 50 %, ácido acético 10 % y H<sub>2</sub>O destilada 40 %) durante 15 minutos en agitación suave. Después, el gel se rehidrató con la solución de rehidratación (metanol 20 %, ácido acético 10 % y H<sub>2</sub>O destilada 70 %) durante 1 hora en agitación suave, tras lo que se eliminó dicho medio, se puso el gel en H<sub>2</sub>O destilada y se dejó rehidratándose, de nuevo, toda la noche a 4 °C en agitación suave. Finalmente, a la mañana siguiente el gel fue escaneado para poder utilizar las bandas visualizadas, correspondientes tanto a proteínas citoplasmáticas no degradadas como a mitocondriales, como control de carga.

### 3.5.3.4. Secado del gel, revelado de resultados y análisis

Para poder visualizar y evaluar la síntesis de las proteínas mitocondriales se llevaron a cabo estos últimos pasos. En primer lugar, se sumergió el gel en el reactivo Amplify™ de Amersham durante 30 minutos para potenciar la señal radiactiva de las proteínas mitocondriales. Después, se colocó sobre un papel Whatman® grueso, se cubrieron ambos con papel film (dejándolo lo más liso y pegado posible para evitar la formación de burbujas) y todo ello se llevó al secador de gel 583 de Bio-Rad. Éste, junto a una bomba de vacío y gel de sílice en una trampa con kitasatos, se utilizó para secar el gel mediante un programa de gradiente a 70 °C y durante 1 hora y 15 minutos. Como resultado, el gel quedó prácticamente fundido con el papel Whatman®. A continuación, se retiró el papel film para que no apantallase la emisión de radiactividad y, en un cuarto oscuro, se dispuso el gel junto a una película BioMax® MR en una placa autorradiográfica BioMax® TranScreen LE (ambas de Carestream). Finalmente, se introdujo todo el montaje en un casete (Figura 3.3) y se guardó a -80 °C.



**Figura 3.3.** Construcción de un sistema con placa de autorradiografía LE y cassette para favorecer la detección de las proteínas radiactivas (mitocondriales). La placa posee dos superficies: una brillante (*phosphor surface*) y otra más opaca (*reflector surface*). La película radiográfica debe colocarse entre ambas superficies, de forma que los dientes de sierra de la misma queden posicionados arriba a la derecha. Por su parte, encima de la superficie brillante se coloca el gel orientado hacia la radiografía (*Active Side*), de manera que el lado del papel Whatman® quede hacia arriba. Finalmente, se cierra el cassette con el gel, la placa y la radiografía dentro.

Tras 1 mes, se sacó el cassette, se esperó a que se descongelase y se abrió en el cuarto oscuro. Allí se sacó la película radiográfica y se pasó por tres soluciones durante, al menos, 1 minuto cada una: primero en 500 ml de la solución reveladora (Carestream) 1/5 en H<sub>2</sub>O destilada, hasta que aparecieron las bandas de interés; después en 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada para lavarla; por último, en 500 ml de la solución fijadora (Carestream) 1/5 en H<sub>2</sub>O destilada. A continuación, se lavó la película radiográfica con H<sub>2</sub>O destilada y se escaneó. La imagen obtenida se cambió del modo RGB por defecto a escala de grises, se exportó como un archivo TIFF (todo ello mediante el programa GIMP) y, junto a la imagen obtenida previamente al escanear el gel, fue analizada con el programa ImageQuantTL para cuantificar los resultados obtenidos.

### 3.5.4 Evaluación del consumo de oxígeno basal de células en cultivo

La respiración basal o endógena de unas células determinadas es la capacidad que tienen para consumir el oxígeno presente. La mayor o menor velocidad a la que ocurre este proceso proporciona una información directa sobre el estado de la funcionalidad del sistema OXPPOS al completo. Además, este estudio fue realizado tomando como punto inicial las directrices publicadas por (Hofhaus et al., 1996).

El equipo utilizado para evaluar el consumo de oxígeno fue Oxytherm + de Hansatech Instruments, un oxígrafo que cuenta con una base y una pieza superior termostatazada y, por tanto, capaz de mantenerse a una temperatura determinada (37 °C). Esta pieza superior incluye una cámara a la que se acopla un electrodo de tipo Clark, compuesto por un cátodo de Pt y un ánodo de Ag/AgCl, y en la se introduce un agitador magnético (60-70 rpm). Antes de cada sesión de trabajo, al cátodo y al ánodo se les añadió KCl saturado al 50 % (1,75 g de KCl en 10 ml de H<sub>2</sub>O) y se separaron mediante una membrana de teflón permeable al oxígeno. Por otra parte, y también antes de cada ensayo, el equipo fue calibrado, estableciendo la línea base de ausencia de oxígeno disuelto mediante ditionito de sodio (un agente oxidante).

En cuanto al procedimiento experimental, se partió de 2-3 placas de 96 mm para cada medida<sup>217</sup>, con células crecidas al 70-80 % de confluencia (es decir, todavía en fase exponencial de crecimiento) y puestas, al menos, 3 días antes del experimento en medio DMEM con glucosa fisiológica. Además, hubo ensayos en que se evaluó el efecto de la rotenona sobre la cadena respiratoria como control<sup>218</sup>, para lo que 1 hora antes del experimento se cambió el medio en las placas de interés por medio DMEM con glucosa fisiológica y rotenona a una concentración final de 100 nM (obtenida a partir de rotenona 2 mM en etanol absoluto). Posteriormente, las células se tripsinizaron, se contaron, la cantidad requerida se resuspendió en 500 µl de medio DMEM con glucosa fisiológica y la suspensión obtenida se añadió en la cámara del oxígrafo. A continuación, la cámara se cerró con un émbolo (cuenta con una apertura capilar por la que pueden introducirse reactivos con una jeringa Hamilton™) y se inició cada experimento mediante el programa OxyTrace + v1.0.48 de Hansatech Instruments. La respiración basal de cada modelo celular se evaluó durante 7,5 minutos y después se añadieron 5 µl de KCN 200 mM, que se dejó actuar durante 5 minutos más hasta, finalmente, dar la reacción por terminada (el KCN es un inhibidor del CIV y, por tanto, para toda la cadena de transporte electrónico). Cabe destacar que, antes de cada nueva medida, la cámara se lavó 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada.

El programa OxyTrace + representa la reducción de los niveles de oxígeno (en nmol de O<sub>2</sub>/ml) con respecto al tiempo (minutos), de manera que de cada muestra pudo establecerse la pendiente de su respiración basal, de la respiración inhibida por el KCN, calcular la diferencia entre ambas y expresar el dato obtenido como nmol de O<sub>2</sub>/ml/minutos. Finalmente, se comparó el comportamiento de las células entre sí y se expresaron los resultados en porcentaje.

### 3.6 Estudio de los niveles de serotonina

Los niveles de serotonina que se midieron fueron intracelulares y se evaluaron por HPLC en el hospital Sant Joan de Déu en Barcelona.

Las células que se estudiaron fueron las SH-SY5Y y líneas derivadas de ésta (todas ellas por triplicado biológico), ya que tienen la capacidad de producir serotonina de forma endógena (de la Fuente et al., 2017; Tajeddinn et al., 2015). En concreto, se analizaron las líneas SH-SY5Y, SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup> y SH-SY5Y tratadas con rotenona. Tras descongelarlas, todas ellas se crecieron en medio DMEM con alta glucosa, pero las líneas SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup> se mantuvieron, además, con 200-500 µg/ml de geneticina en el medio<sup>219</sup>. Esto último se realizó para ejercer una selección positiva y asegurar la sobreexpresión génica. Después, todas las líneas celulares se pusieron en medio DMEM con glucosa fisiológica 3 días antes de que alcanzaran un 80 % de confluencia y se recogieran (Tajeddinn et al., 2015; Wright Muelas et al., 2018). Además, 1 hora antes de obtener los pellets, 3 placas de células SH-SY5Y fueron

---

<sup>217</sup> Se realizaron como mínimo 3 medidas por modelo celular para así tener triplicados biológicos. Además, se cultivaron 2-3 placas para cada medida con objeto de tener suficiente número de células, especialmente en el caso de los fibroblastos: en cada medida se evaluó la respiración de  $1,5 \cdot 10^6$  fibroblastos primarios,  $2,3 \cdot 10^6$  fibroblastos inmortalizados y  $4 \cdot 10^6$  células SH-SY5Y.

<sup>218</sup> La rotenona actúa sobre el CI, inhibiendo la transferencia de electrones a la ubiquinona.

<sup>219</sup> Primero 500 µg/ml y, posteriormente, la dosis fue disminuyéndose hasta cambiar el medio a DMEM con glucosa fisiológica (sin antibiótico).

tratadas con rotenona a una concentración final de 100 nM (Aylett et al., 2013; de la Fuente et al., 2017).

Los pellets se lavaron una vez con 4 ml de PBS frío (4 °C), se resuspendieron en 900 µl de PBS frío, se centrifugaron a 5 000 rcf y 4 °C, se retiró por completo todo el sobrenadante<sup>220</sup> y se almacenaron a -80 °C hasta su envío en hielo seco. Las medidas obtenidas fueron normalizadas con respecto a las proteínas totales de cada muestra para que así los resultados no dependieran de la densidad celular (Yue & Liu, 2005).

### 3.7 Aplicaciones bioinformáticas

El análisis bioinformático realizado sobre las proteínas afectadas en los pacientes de estudio y sus variantes se llevó a cabo mediante una serie de bases de datos y herramientas. Su uso aparece reflejado en los resultados correspondientes (apartados 4.1 y 4.2) y entre ellas cabe destacar a las siguientes:

- **BLAST®**: herramienta disponible en NCBI que habilita la búsqueda de secuencias proteicas homólogas a la proteína de interés.
- **DOG**: programa gratuito que permite elaborar manualmente estructuras secundarias de proteínas, con sus respectivos dominios, motivos y residuos de interés.
- **Ensembl y UniProt**: bases de datos de genes y proteínas, respectivamente.
- **gnomAD**: base de datos de exomas secuenciados que ofrece información sobre las variantes encontradas en los mismos para cada gen y su frecuencia en la población.
- **MEMSAT**: aplicación de PsiPred que, dada una secuencia proteica, permite predecir si la proteína plegada presenta o no hélices transmembranales.
- **PeptideCutter**: herramienta que informa del número de cortes que realiza una determinada proteasa (entre las que dispone) sobre la proteína de interés y las posiciones de los sitios de corte.
- **Predictores de patología**: se usaron los predictores MutationTaster, PMut, PolyPhen-2 y PROVEAN Protein para estimar si las mutaciones tenían o no carácter patológico.
- **ProtParam**: herramienta de ExPASy empleada para estimar los pesos moleculares de las proteínas.
- **PyMOL**: programa que permite visualizar cristales resueltos de proteínas, así como realizar mutaciones *in silico* para predecir su efecto sobre la estructura proteica.
- **SnapGene Viewer**: programa con el que se pueden visualizar y evaluar los alineamientos realizados con BLAST®.

---

<sup>220</sup> Los lavados de los pellets y eliminar todo el sobrenadante fue fundamental, ya que previamente se comprobó mediante un ELISA competitivo que el SFB puede interferir en las medidas de serotonina (datos no ofrecidos). El uso de medios sin SFB para analizar los niveles de este neurotransmisor se encuentra descrito en la literatura (Becquet et al., 1990; Tajeddinn et al., 2015).

### **3.8 Análisis estadístico y diseño gráfico**

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con la aplicación StatView 6.0. En ningún caso se obtuvo un tamaño muestral de  $n = 30$  o superior, de modo que para evaluar la significación estadística entre distintos grupos experimentales se llevó a cabo, sobre todo, el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney. Las diferencias entre los datos se consideraron estadísticamente significativas en aquellos casos en que el p-valor fue, al menos, menor de 0,05.

Los gráficos de los resultados presentados a lo largo del presente trabajo se elaboraron fundamentalmente mediante el programa GraphPad 8, representando la media de los valores obtenidos  $\pm$  su desviación estándar.



## **RESULTADOS**

---

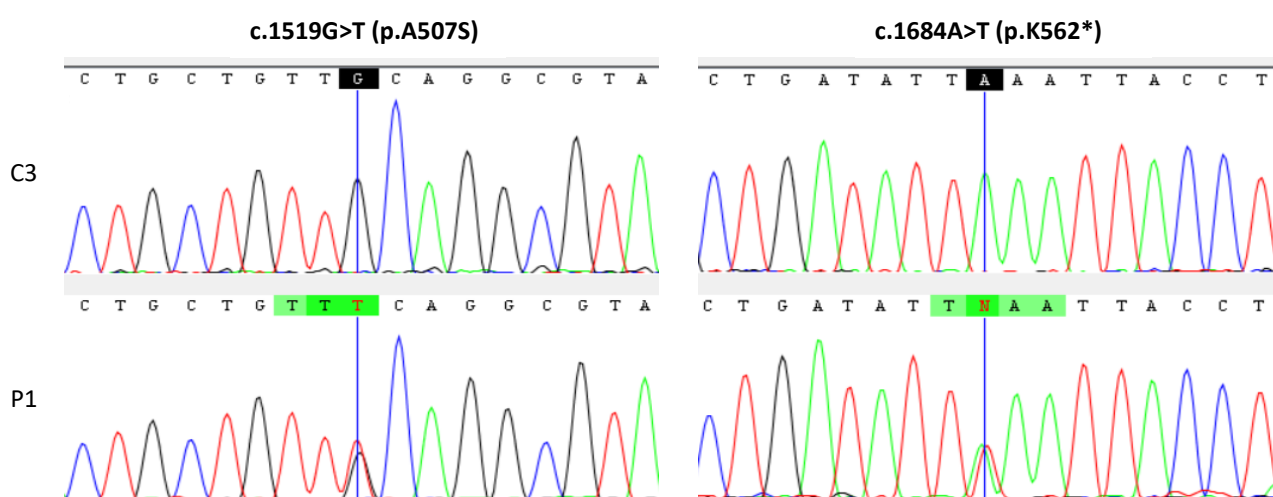


## 4.1 PNPasa

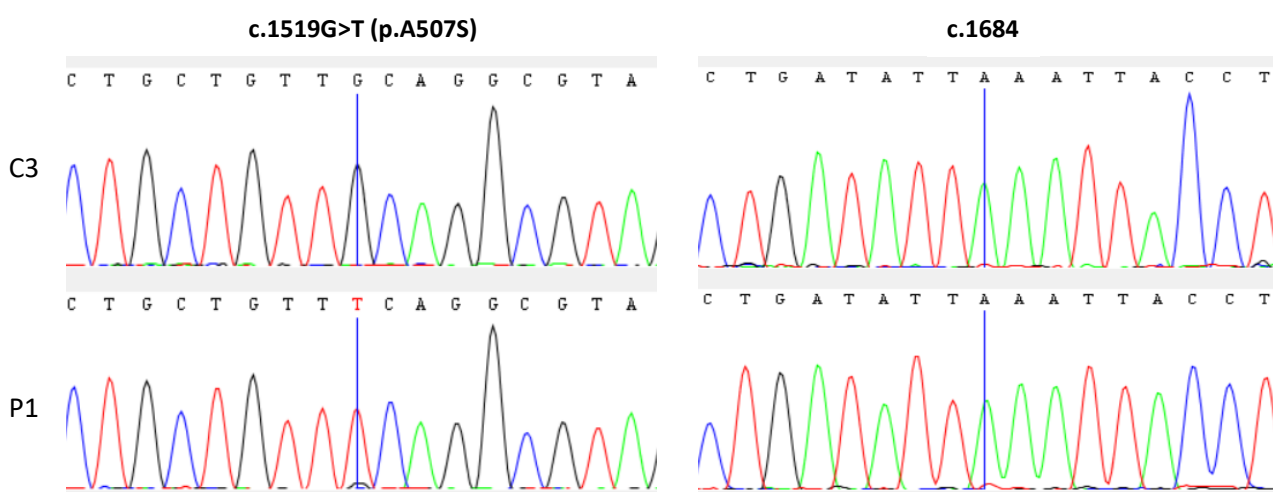
### 4.1.1 Confirmación de la presencia de las variantes en fibroblastos del paciente

Para confirmar que los fibroblastos del paciente (P1) presentan las variantes en heterocigosis compuesta detectadas en el gen *PNPT1* (p.A507S y p.K562\*), se extrajo su DNA total, se llevó a cabo la PCR para amplificar *PNPT1*, los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar y se detectó la presencia de las dos variantes (Figura 4.1A). A continuación, se analizó la expresión de ambos alelos partiendo de muestras de RNA total: primero se retrotranscribió a cDNA, después se amplificó el transcrito canónico de *PNPT1* por PCR, se purificaron los productos de PCR y, finalmente, se enviaron a secuenciar. Sólo se consiguió detectar el transcrito del alelo materno (Figura 4.1B), implicando que el del alelo paterno podría estar sometido a un decaimiento.

**A**



**B**



**Figura 4.1.** Electroferogramas con las variantes en el gen *PNPT1* de fibroblastos del paciente. **(A)** Alineamiento de secuencias del control C3 y el paciente P1, obtenidas partiendo de DNA. En el control sólo aparece el nucleótido *wild-type* en la posición 1 519 (electroferograma de la izquierda) y en la 1 684 (electroferograma de la derecha) de la CDS (ambas posiciones indicadas con una línea vertical azul),

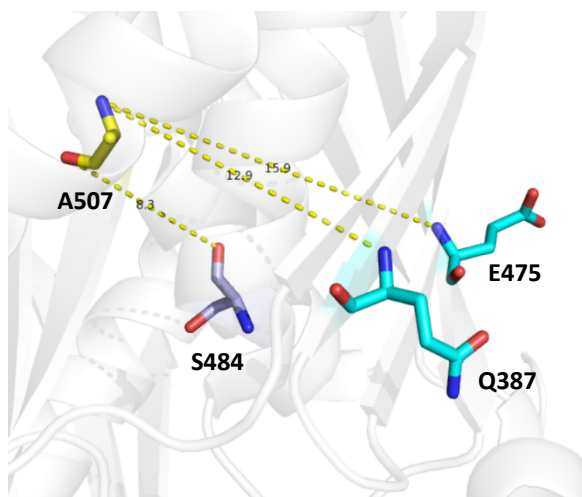
mientras que el paciente presenta un doble pico en ambas posiciones, coincidente con la presencia de las variantes en heterocigosis compuesta. **(B)** Alineamiento de secuencias entre el control C3 y el paciente P1, obtenidas tomando RNA como punto de partida. Siguiendo la misma distribución de imágenes y significados que en **(A)**, el control presenta los nucleótidos *wild-type*, mientras que en el paciente sólo se detecta el alelo materno, con la mutación correspondiente.

#### 4.1.2 Análisis bioinformático: predicción de la patología

Con objeto de establecer una primera aproximación sobre si las variantes tienen o no un efecto patológico sobre *PNPT1* y el paciente, se llevó a cabo un estudio *in silico* de las mismas, incluyendo el uso de diversos predictores de patología y análisis estructural:

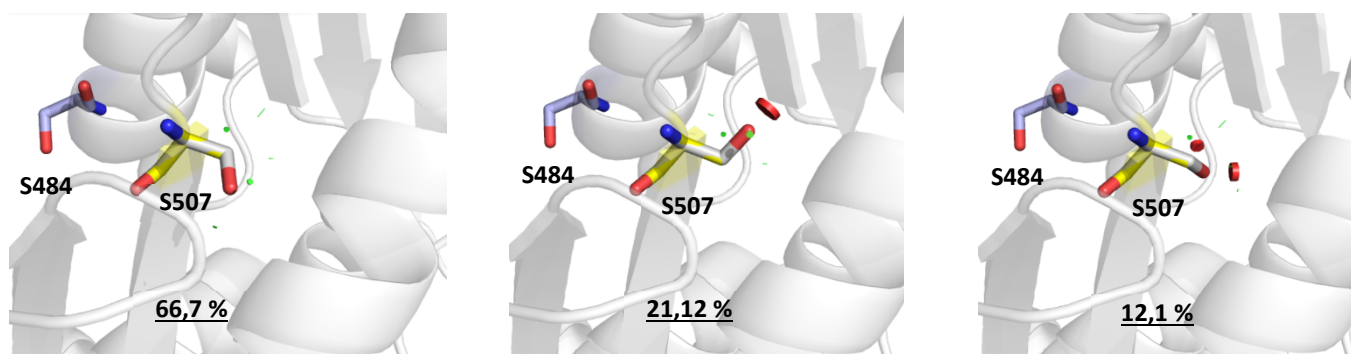
- **Variante p.A507S**: se predice como patológica por MutationTaster (probabilidad 0.999999993401545), PMut (79 % de que cause enfermedad) y PolyPhen-2 (posiblemente dañina, con una puntuación de 0,880; sensibilidad: 0,82; especificidad: 0,94). Por su parte, en PROVEAN Protein obtiene una puntuación de -2,115 y se predice como neutral con el punto de corte por defecto (-2,5), pero deletérea si se aumenta la especificidad de la detección (punto de corte -1,3). Además, la A507 se caracteriza por ser un residuo altamente conservado (se dispone de un alineamiento de 250 especies en el anexo 8.8) y apolar, mientras que la serina es polar y con un tamaño distinto, lo que podría afectar al entorno proteico. En particular, la A507 se encuentra a una distancia demasiado elevada del centro activo y de residuos implicados en la trimerización como para que la mutación los afecte directamente (**Figura 4.2A**), pero sí podría desestabilizar a residuos cercanos que, a su vez, llevasen a una alteración de la funcionalidad de la proteína (**Figura 4.2B**). Todas estas observaciones coinciden con que la mutación haya sido descrita como patológica en diversas publicaciones (citadas en ([Grochowska et al., 2022](#))).
- **Variante p.K562\***: se predice como patológica por MutationTaster (probabilidad de 1) y PROVEAN Protein (puntuación de -562,447). No ha sido descrita previamente y provoca la pérdida de los dominios de interacción con RNA (**Figuras 1.12** y **1.13**) y SUV3 ([Jain et al., 2022](#)). Todo ello, unido a que se ha observado que, al menos, un defecto en la formación de los poros KH deriva en una disfuncionalidad de la PNPasa ([Golzarroshan et al., 2018](#)), sugiere un fuerte carácter patológico de la mutación.

**A**



**Figura 4.2.** Análisis del efecto de la mutación p.A507S sobre la estructura proteica de la PNPasa. (PDB 3U1K). **(A)** Distancia entre los residuos A507 y S484 8,3 Å; A507 y Q387 12,9 Å; A507 y E475 15,9 Å. S484 forma parte del centro activo, concretamente, del motivo PBR (**Figura 1.12**), y es el más próximo a la A507 de los residuos implicados en la interacción con el citrato y/o los iones divalentes (imagen no ofrecida). Por su parte, la Q387 y el E475 participan en la trimerización de la PNPasa ([Golzarroshan et al., 2018](#)).

B



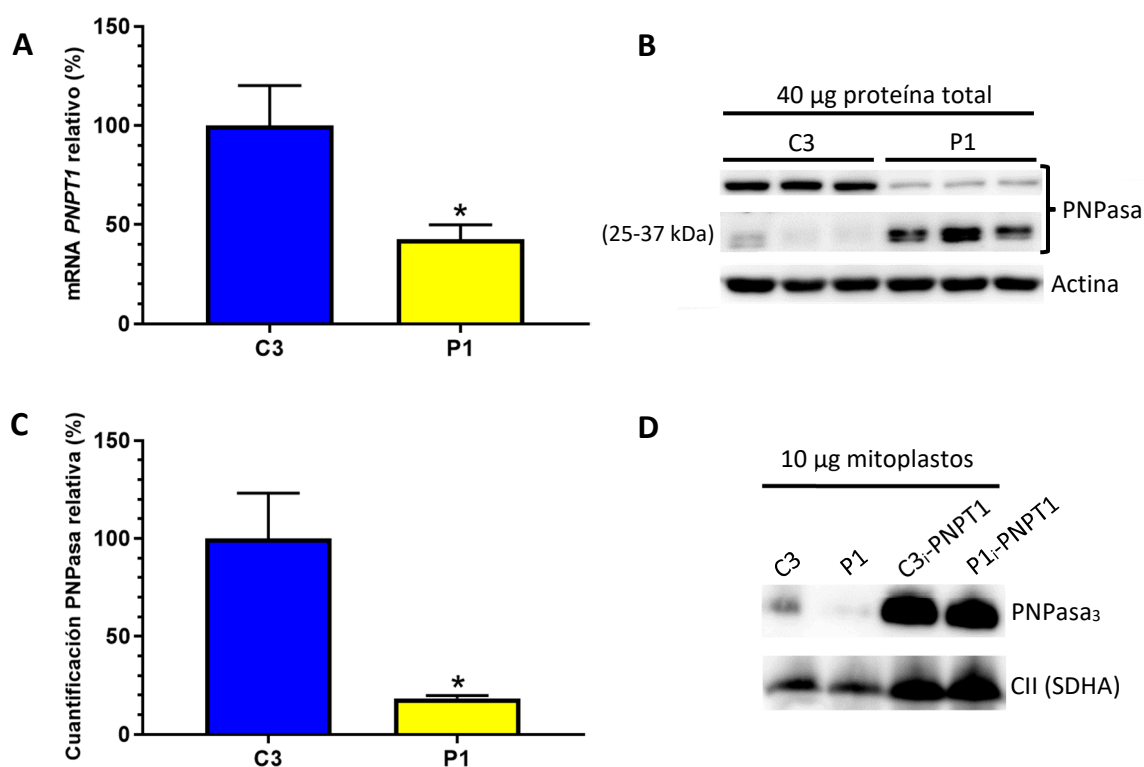
(B) Posibles conformaciones que resultan de mutar *in silico* la A507 por S507. Se ofrecen los porcentajes de cada una de ellas, en que la disposición espacial que varía es la de la cadena lateral. La más probable es la que no genera ningún impedimento estérico con sus residuos cercanos (66,7%), mientras que las conformaciones menos probables (21,12% y 12,1%) sí chocarían con residuos próximos, indicados mediante círculos rojos. Todos los residuos mencionados se encuentran representados en *sticks*, donde los átomos de oxígeno están en rojo, los de nitrógeno en azul y los átomos de carbono en amarillo (A507), blanco (S507. Grupo -OH adicional), azul claro (S484) y cian (Q387 y E475). La figura ha sido realizada con el programa PyMOL (v1.3r1).

#### 4.1.3 Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de PNPT1

El estado de la PNPasa en los fibroblastos del paciente se analizó en tres niveles: transcrito, proteína y trímero funcional. En el primer caso, se extrajo RNA total, se sintetizaron cDNA mediante oligo(dT)<sub>18</sub> y, de éstos, el procedente del mRNA de *PNPT1* se amplificó y cuantificó por qPCR con SYBR Green. Como resultado, se obtuvo que en el paciente existe una caída media del 57 % de estos transcritos (Figura 4.3A), coincidente con que sólo se pudiera detectar la transcripción del alelo materno (Figura 4.1B). Una posible explicación de ambos hechos es que el mRNA de *PNPT1* procedente del alelo paterno sea degradado por la ruta NMD<sup>221</sup>. Por su parte, para los niveles de proteína, se extrajeron las proteínas totales, se separaron mediante un *Western blot* (Figura 4.3B) y se cuantificaron (Figura 4.3C), obteniendo una caída mayor del 57 % (82 % de media). Esto sugiere una degradación adicional de la PNPasa a nivel proteico, lo que viene apoyado por la detección en P1 de una mayor intensidad en las bandas entre 25-37 kDa, que podrían tratarse de productos de degradación de la PNPasa (Figura 4.3B). Finalmente, para visualizar los niveles del trímero de la PNPasa se llevó a cabo una BN-PAGE a partir de mitoplastos de distintas células, obteniéndose de nuevo, por un lado, un descenso en P1 y, por otro, un aumento en los fibroblastos que sobreexpresan *PNPT1*<sup>222</sup> (ambos con respecto a C3). La BN-PAGE también informa sobre el estado multimérico en situaciones nativas, pero dado que las variantes no parecen afectar a la trimerización (por el análisis *in silico* del apartado anterior), la caída del trímero detectada en el paciente se considera consecuencia directa de la menor cantidad de la proteína. Cabe destacar que la banda ofrecida de la PNPasa fue la única que se detectó con el anticuerpo correspondiente (Figura 4.3D).

<sup>221</sup> La ruta NMD es uno de los mecanismos de control de calidad celular más caracterizados. Su principal función es la de degradar los mRNA que presentan codones de terminación prematura, evitando así la producción de proteínas disfuncionales (Kurosaki et al., 2019).

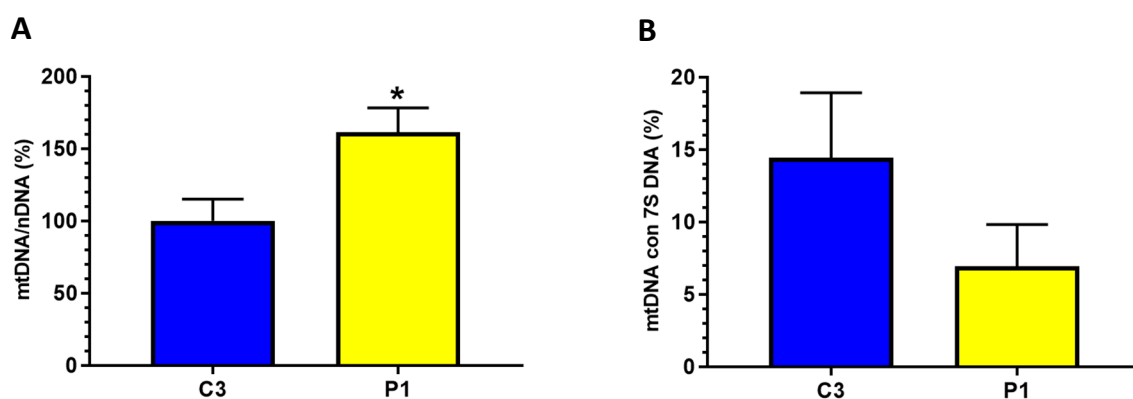
<sup>222</sup> Se ofrece una información más detallada sobre estos fibroblastos en el apartado 4.1.9.



**Figura 4.3.** Evaluación en los fibroblastos del paciente de los niveles de la PNPasa en diferentes estadios **(A)** Nivel del mRNA de *PNPT1* detectado por qPCR de C3 y P1, en que se empleó la actina como *housekeeping* ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). Forma parte de la [Figura 4.11A](#). **(B)** Cantidad de proteína presente en C3 y P1, observada por *Western blot* con gel separador al 10 %. Los anticuerpos se añadieron de manera secuencial y, al utilizar el que reconoce a la PNPasa ([Tabla 3.42](#)), entre 25-37 kDa se detectaron bandas adicionales, más intensas en P1. **(C)** Cuantificación de los resultados obtenidos en **(B)**, tomando los valores de la actina como control de carga. **(D)** Niveles del trímero de la PNPasa obtenidos por medio de la BN-PAGE (1D) con DDM (1 % final) en mitoplastos de C3, P1 y de los fibroblastos inmortalizados de ambos con sobreexpresión de *PNPT1*: C3i-PNPT1 y P1i-PNPT1. Los niveles del CII, detectados con el anticuerpo contra SDHA, se utilizaron como estándar interno. En **(A)** y **(C)** se representa la media de los datos y su desviación estándar en porcentaje (%), todo ello relativizado con respecto a la media de los valores de C3. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C3).

#### 4.1.4 Análisis de la replicación: niveles de mtDNA y 7S DNA

La replicación mitocondrial en el paciente se investigó mediante el estudio del número de copias del mtDNA con respecto al nDNA y del porcentaje de dichas moléculas que presentan 7S DNA. Ambos ensayos se llevaron a cabo purificando DNA total y realizando una qPCR posterior. El paciente experimenta un aumento significativo del número de copias del mtDNA ([Figura 4.4A](#)), mientras que tiene una caída del 7S DNA ([Figura 4.4B](#)). Esto coincide con el hecho de que este último sea una molécula inversamente relacionada con la replicación mitocondrial, ya que resulta de una terminación prematura de la misma en la región TAS ([Jemt et al., 2015](#); [Nicholls & Minczuk, 2014](#); [Reyes et al., 2020](#); [Røyrvik & Johnston, 2020](#)). Por su parte, en el control el porcentaje medio de copias de mtDNA que contienen 7S DNA es similar al 10 % descrito en la literatura ([Nicholls & Minczuk, 2014](#)), y, en particular, al 14 % de los fibroblastos ([Kornblum et al., 2013](#)), tal y como se exponía en el apartado 1.3.3.



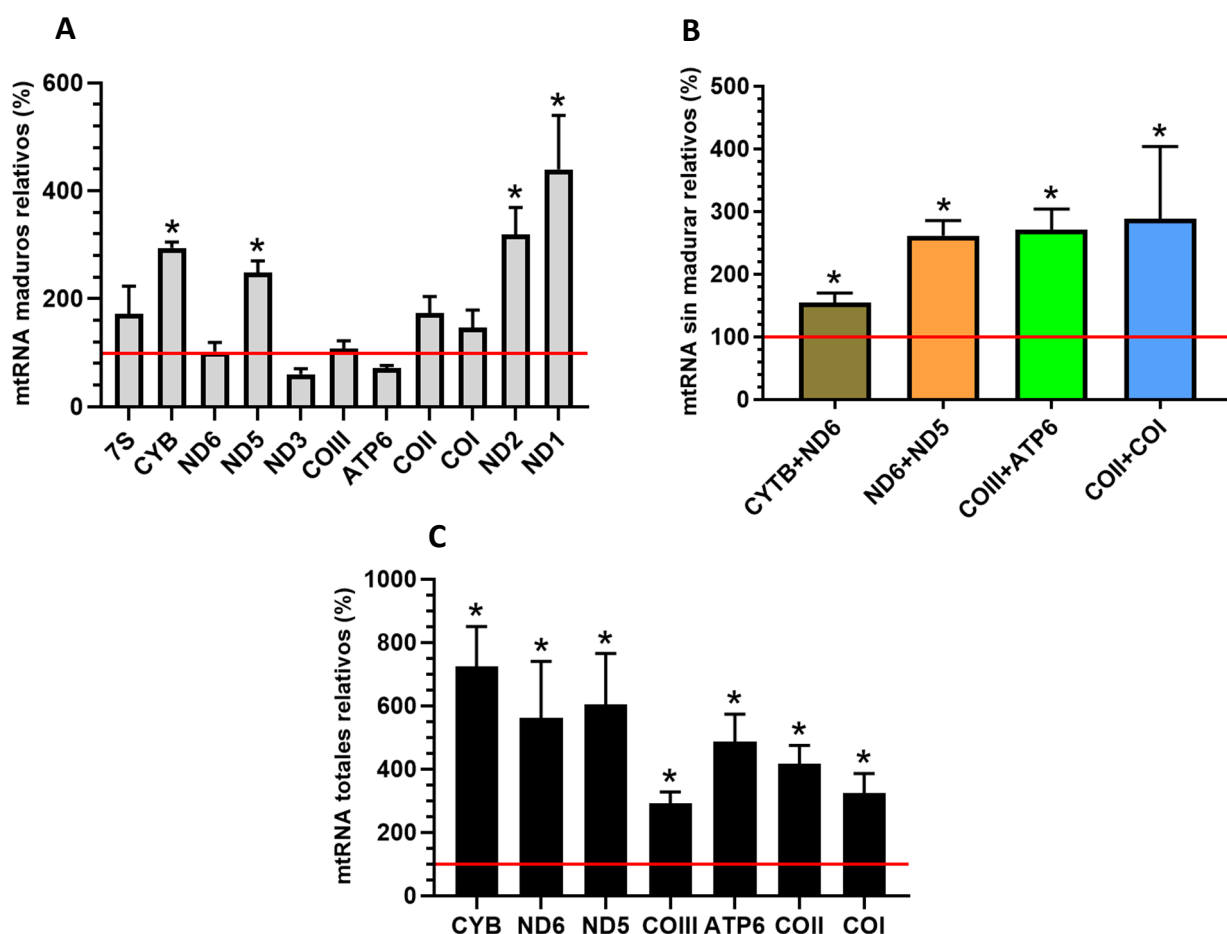
**Figura 4.4.** Número de copias del mtDNA y cantidad de las mismas con 7S DNA en fibroblastos del paciente. **(A)** Cuantificación del número de copias del mtDNA de C3 y P1 por qPCR, normalizando los valores con respecto al nDNA ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). **(B)** Cuantificación por qPCR de las copias de mtDNA que presentan 7S DNA de C3 y P1, normalizando los datos con respecto al 7S DNA ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). Tanto en **(A)** como en **(B)** se representa la media de los datos y su desviación estándar en porcentaje (%), relativizados respecto a la media de los valores de C3 **(A)** o a la situación en que no hay ninguna copia de 7S DNA y  $\Delta Ct = 0$  **(B)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C3).

#### 4.1.5 Cuantificación de los mtRNA

La principal función y la mejor caracterizada de la PNPasa humana es la de degradar RNA, como se ha explicado previamente en el apartado 1.4.4. Debido a las variantes que presenta el paciente en *PNPT1* y su efecto sobre los niveles de su mRNA y la proteína que codifica, se valoraron los niveles de diferentes transcritos mitocondriales para comprobar su estado y si se veían o no afectados por el déficit de la PNPasa. En concreto, a partir de RNA total (tratado con DNasa I previamente) se obtuvieron cDNA (utilizando *random primers* u oligo(dT)<sub>18</sub>, según los transcritos de interés, tal y como aparece indicado en la [Tabla 3.29](#)), que se amplificaron y cuantificaron por qPCR con diversas sondas TaqMan® ([Tabla 3.33](#)) o SYBR Green con *primers* específicos ([Tabla 3.30](#)). De esta manera, se evaluaron los mtRNA maduros ([Figura 4.5A](#)), policistrónicos no procesados (sin madurar; [Figura 4.5B](#)) y totales (mezcla de los anteriores; [Figura 4.5C](#)). Los mtRNA maduros en el paciente presentan un comportamiento heterogéneo: desde niveles similares al control hasta un cúmulo significativo de algunos de ellos ([Figura 4.5A](#)), lo que implica que la degradación de estos transcritos se encuentra comprometida. Por su parte, todos los policistrónicos sin madurar experimentan un incremento significativo en el paciente ([Figura 4.5B](#)), lo que sugiere la participación indirecta de la PNPasa en el procesamiento de los mismos y que esté fallando en el paciente. En cuanto a los transcritos totales por qPCR existe un gran aumento de todos ellos ([Figura 4.5C](#)), mayor que en los resultados anteriores, lo que implica que se está produciendo un cúmulo no sólo de determinados transcritos con sentido, sino, sobre todo, de ncRNA<sup>223</sup>. Todos estos resultados

<sup>223</sup> Como se indica en sus respectivos apartados de la sección *Material y métodos*, para hacer el cDNA de los transcritos policistrónicos y totales, así como para elaborar la genoteca de cDNA para la RNA-seq, se emplearon *random primers*. Por tanto, pudieron detectarse posteriormente tanto los transcritos codificantes como los antisentido. En cambio, en el caso de los maduros se empleó un *primer* oligo(dT)<sub>18</sub>, por lo que, en principio, se retrotranscribieron principalmente los mtRNA con sentido, ya que los ncRNA experimentan oligoadenilación, pero no poliadenilación ([Pajak et al., 2019](#)) y, por tanto, el oligo(dT)<sub>18</sub> hibrida de forma menos eficiente con los mismos.

demuestran que el paciente experimenta una disfuncionalidad en el metabolismo de los mtRNA, produciéndose un cúmulo generalizado de los transcritos y, especialmente, de aquellos sobre los que la PNPasa parece actuar más: los que, en situaciones fisiológicas, presentan una vida media menor (Borowski et al., 2013; Nagao et al., 2008).



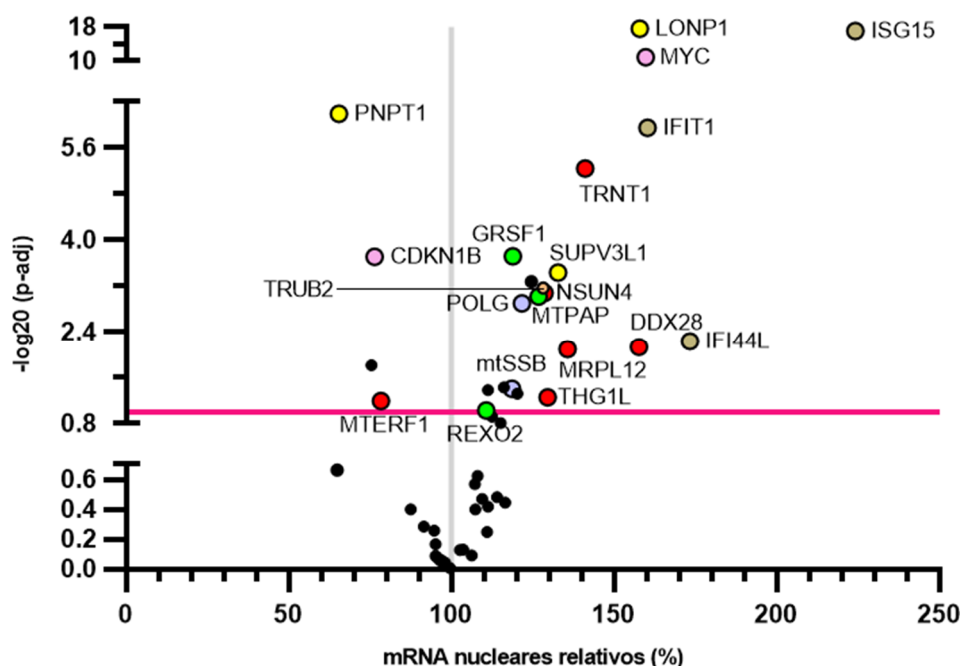
**Figura 4.5.** Caracterización de diversos mtRNA en fibroblastos del paciente. (A), (B) y (C) Niveles de varios mtRNA maduros, policistrónicos no procesados y totales (mezcla de los dos anteriores), respectivamente, analizados por qPCR en C3 y P1. En todas las gráficas se representa la media de los valores obtenidos para cada transcrito de interés, así como su desviación estándar (n = 3; cada n medida por triplicado técnico). Los datos se muestran en porcentaje (%) con respecto a la media de los resultados de C3 para cada mtRNA (líneas rojas horizontales; 100 %) y utilizando la actina (en (A) y (B)) o el rRNA 18S (en (C)) como *housekeeping*. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con C3).

#### 4.1.6 Análisis de mRNA nucleares codificantes para proteínas mitocondriales

Para evaluar el nivel de los transcritos de genes relacionados con el metabolismo del mtRNA, entre otros, se estudió por RNA-seq un panel virtual constituido por 53 genes nucleares (presente en el anexo 8.10). Dentro de los que experimentan diferencias significativas en sus niveles de mRNA, destacan genes implicados en la replicación del mtDNA (*POLG*, *mtSSB*), genes que codifican para modificadores post-transcripcionales (*MTPAP*, *TRUB2*, *TRNT1*, *THG1L*), genes relacionados con la traducción mitocondrial (*MTERF1*, *NSUN4*, *MRPL12*, *DDX28*, *TRNT1*, *THG1L*), genes involucrados en el metabolismo de los ncRNA (*MTPAP*, *GRSF1*, *REXO2*) y el propio *PNPT1* (que desciende en el paciente, como se había detectado mediante qPCR; Figura 4.3A). Además,



también se llevó a cabo un análisis del mitotranscriptoma (transcriptoma de los genes incluidos en MitoCarta 3.0 (Rath et al., 2021)), dividiendo los resultados en 16 funcionales mitocondriales y obteniendo un comportamiento similar al observado en el panel virtual con los 53 genes: dentro de los que experimentan diferencias significativas en sus niveles, existe un porcentaje mayor de genes que se incrementan que de los que disminuyen, tanto de forma global como para cada una de las funciones (datos disponibles en el anexo 8.11). Todos estos resultados implican que las variantes de *PNPT1* presentes en el paciente también afectan a la transcripción de muchos otros genes con los que la PNPasa se encuentra relacionada (tanto directa como indirectamente) y que llevan a la activación de distintos mecanismos compensatorios.



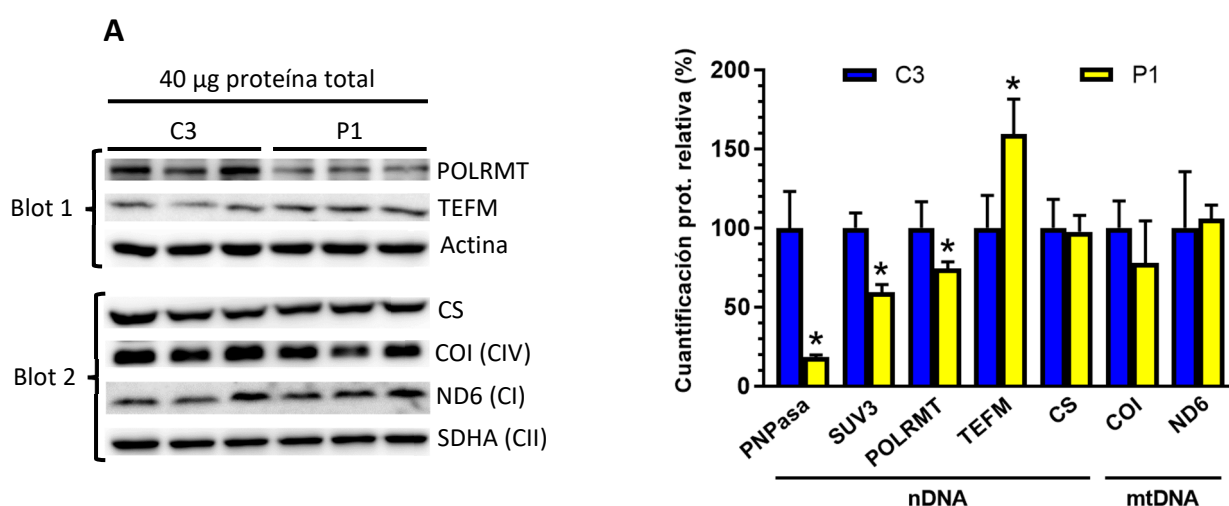
**Figura 4.6.** Volcano plot con los niveles diferenciales de los mRNA de los 53 genes nucleares<sup>224</sup> del panel virtual elaborado en fibroblastos del paciente con respecto al control (n = 3). Los transcritos de P1 se representan en forma de círculos, agrupados por colores (distintos al negro) aquellos con una diferencia de niveles estadísticamente significativa con respecto a C3 y que guardan relación entre sí. En concreto, en rosa se muestran genes involucrados en el ciclo celular (*MYC*, *CDKN1B*); en azul genes de la replicación del mtDNA (*POLG*, *mtSSB*); en rojo genes relacionados con la traducción mitocondrial (*MTERF1*, *NSUN4*, *MRPL12*, *DDX28*, *TRNT1*, *THG1L*); en verde genes del metabolismo de los ncRNA (*MTPAP*, *GRSF1*, *REXO2*); en marrón genes de respuesta a interferón (*IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*); en amarillo genes implicados en los niveles del degradósoma (*PNPT1*, *SUV3* y *LONP1*<sup>225</sup>); en naranja *TRUB2* (representa a genes implicados en modificaciones post-transcripcionales que presentan cambios, entre los que también estarían *MTPAP*, *TRNT1* y *THG1L*). Destacar que los genes subrayados son los que incrementan sus niveles. Además, los datos se encuentran divididos en cuatro cuadrantes, separados verticalmente por la media del control C3 para cada transcrito de estudio (línea gris clara; 100 %) y horizontalmente por el  $-\log_{20}$  del p-valor ajustado de 0,05 (línea rosa; 1). Por tanto, todos los transcritos de P1 a la derecha del 100 % aumentan con respecto a C3, mientras que a la izquierda disminuyen; los mRNA por encima de 1 experimentan un cambio de niveles significativos en comparación con C3 (que son aquellos en que p-valor ajustado <0,05).

<sup>224</sup> 49 en realidad, ya que no se obtuvieron *reads* para *RSAD2*, *SIGLEC1* y *TPH1*.

<sup>225</sup> La relación de *LONP1* con el degradósoma sólo se trata de una hipótesis.

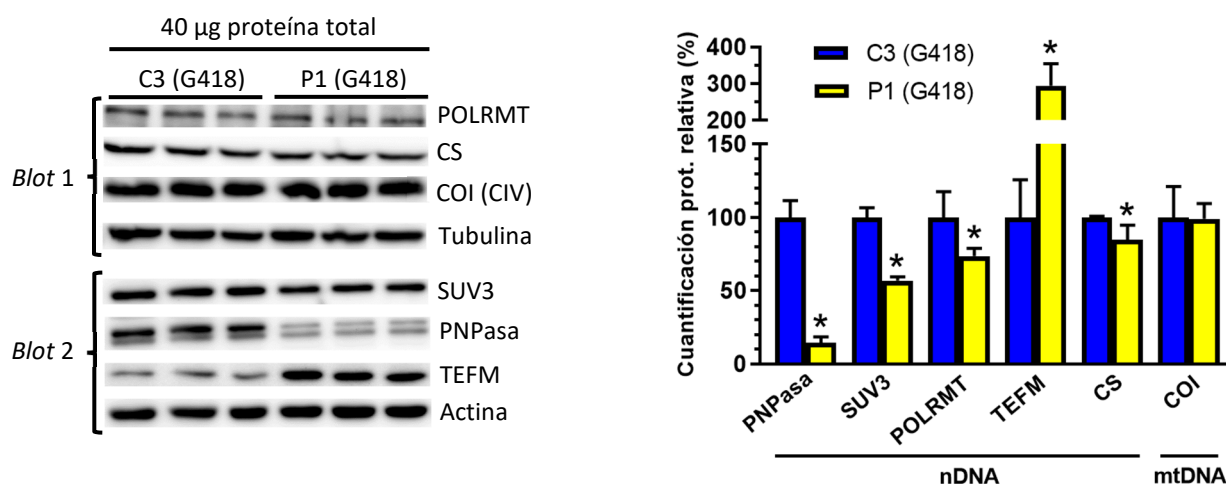
#### 4.1.7 Estudio de los niveles de proteínas mitocondriales

Se analizó la cantidad presente en fibroblastos control y del paciente de varias proteínas mitocondriales, tanto codificadas en el nDNA (relacionadas con la transcripción y degradación de mtRNA) como en el mtDNA. Para ello se realizaron diferentes *Western blot* a partir de proteínas totales, cuantificadas previamente por el método de Bradford. Además, se valoraron los niveles de esas mismas proteínas al someter a los fibroblastos de estudio a un estrés: 100  $\mu\text{g/ml}$  de geneticina (G418) durante 3 días. El objetivo original de tratar los células con geneticina fue el de iniciar las bases de una posible terapia, ya que algunos otros aminoglucósidos, como la gentamicina, han sido probados en ensayos clínicos para combatir mutaciones que generan un codón de parada prematuro (y llevan a una degradación de los transcritos por la ruta NMD): se ha visto que dichos antibióticos tienen la capacidad de permitir la síntesis completa de la proteína correspondiente (Bidou et al., 2012; Pacheu-Grau et al., 2012). Sin embargo, los resultados que fueron obteniéndose resultaron negativos y se pasó a estudiar el uso de la geneticina como condición de estrés. En una situación de cultivo habitual (con medio DMEM con alta glucosa), los fibroblastos del paciente experimentan un descenso de POLRMT, un aumento de TEFM y un descenso de SUV3 (Figura 4.7A). En presencia de geneticina, los niveles proteicos de TEFM en el paciente se ven todavía más incrementados, la CS experimenta un descenso y la cantidad del resto de proteínas estudiadas se mantiene con respecto a la obtenida en ausencia de geneticina (Figura 4.7B). La disminución de POLRMT en ambas condiciones de estudio y de la CS al tratar las células con geneticina podrían tratarse de mecanismos compensatorios; en el caso de la CS, para intentar disminuir los niveles de citrato y, por tanto, la inhibición por parte del mismo de la PNPasa (Stone et al., 2017). Por su parte, el comportamiento observado de TEFM sugiere que sus niveles se encuentran relacionados con la PNPasa, lo que se ve confirmado por el mayor cúmulo de este factor de elongación en los fibroblastos inmortalizados que sobreexpresan *PNPT1*<sup>226</sup>, siendo entre ellos aún mayor en los P1-PNPT1 (Figura 4.8).

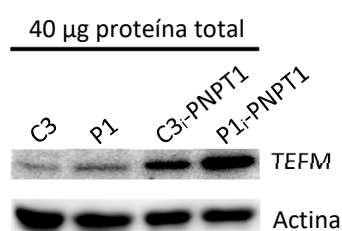


<sup>226</sup> Se ofrece más información sobre estas células inmortalizadas en el apartado 4.1.9.

## B



**Figura 4.7.** Análisis de los niveles de diversas proteínas mitocondriales en fibroblastos del paciente basales y tratados con geneticina (G418). **(A)** Cuantificación de las proteínas PNPasa, SUV3, POLRMT, TEFM, CS, COI y ND6 en C3 y P1 por *Western blot*, tomando los valores de la actina y de la SDHA como controles de carga en el *blot 1* y el *blot 2*, respectivamente (los datos de la PNPasa son los de las Figuras 4.3B y 4.3C; los valores de SUV3 se corresponden con los del *blot 2* de la Figura 4.11B). **(B)** Cuantificación de las proteínas PNPT1, SUV3, POLRMT, TEFM, CS y COI en C3 y P1 (tratados con G418) por *Western blot*, tomando los valores de la tubulina y de la actina como controles de carga en el *blot 1* y el *blot 2*, respectivamente. En el *blot 2*, la banda inferior de la PNPasa se corresponde con SUV3 (obtenida en una hibridación previa). En todos los ensayos los anticuerpos se añadieron secuencialmente, se emplearon geles separadores del 8 % y los datos que aparecen representados en porcentaje (%) son las medias de los valores en P1 (sin y con tratamiento con G418 en **(A)** y **(B)**, respectivamente) y su desviación estándar con respecto a su control (C3 sin y con tratamiento con G418 en **(A)** y **(B)**, respectivamente). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor < 0,05 (comparando con el control de cada caso).

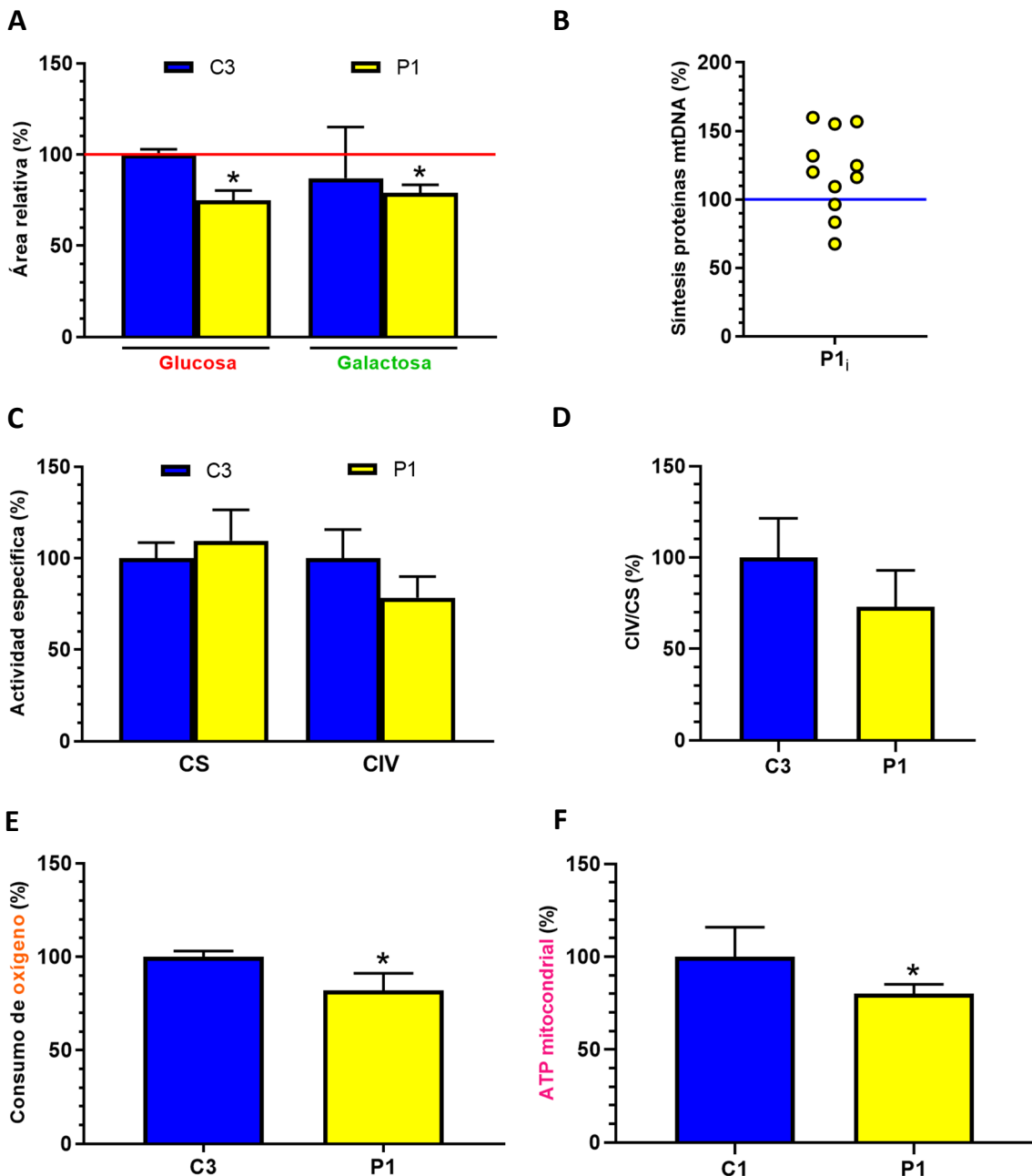


**Figura 4.8.** Niveles de TEFM en diferentes fibroblastos. Cantidad de la proteína TEFM en C3, P1, C3i-PNPT1 y P1i-PNPT1, evaluada por *Western blot* con un gel separador del 12,5 % y con la actina como control de carga. Los anticuerpos se añadieron secuencialmente.

#### 4.1.8 Crecimiento celular y estudio de la funcionalidad OXPHOS

Tras analizar el número de copias del mtDNA, los niveles de los transcritos mitocondriales y diversas proteínas en el paciente, se llevaron a cabo diferentes ensayos de carácter general y funcional con objeto de establecer el estado de los fibroblastos del paciente y su actividad mitocondrial. En primer lugar, se estudió el tiempo de duplicación de las células mediante el equipo Incucyte®. En el medio habitual DMEM con alta glucosa los fibroblastos del paciente experimentaron un menor crecimiento con respecto al control a pases de cultivo semejantes, mientras que dicha proliferación se vio igual de afectada al cultivarlas en medio DMEM con galactosa (Figura 4.9A). En segundo lugar, se llevó a cabo la evaluación de la síntesis de las 13 proteínas codificadas por el mtDNA, por un lado, y la medida de la actividad específica de la citrato sintasa y del complejo IV del sistema OXPHOS, por otro. Se pudo detectar la síntesis

de 11 de las 13 proteínas del mtDNA, obteniéndose un aumento en 8 de las 11 (Figura 4.9B); no se observó afectación en la actividad de la citrato sintasa, mientras que sí se obtuvo una caída de la actividad del CIV, aunque no significativa<sup>227</sup> (Figura 4.9C); la actividad del CIV normalizada por CS<sup>228</sup> también presenta una tendencia a disminuir, pero, de nuevo, sin ser un comportamiento significativo (Figura 4.9D). Finalmente, se valoró la capacidad de consumo de oxígeno (Figura 4.9E) y los niveles de ATP mitocondrial (Figura 4.9F), obteniéndose un descenso de ambos. Todos estos resultados, junto a los de los apartados previos, llevan a afirmar que el paciente presenta una disfuncionalidad de la fosforilación oxidativa.



**Figura 4.9.** Análisis de la proliferación de fibroblastos del paciente y su funcionalidad mitocondrial. (A) Área ocupada por los fibroblastos C3 y P1 con respecto al tiempo (días) en pocillos de placas de 96 pocillos,

<sup>227</sup> Ambos resultados coincidentes con los niveles proteicos detectados de la CS y de COI (Figura 4.7A).

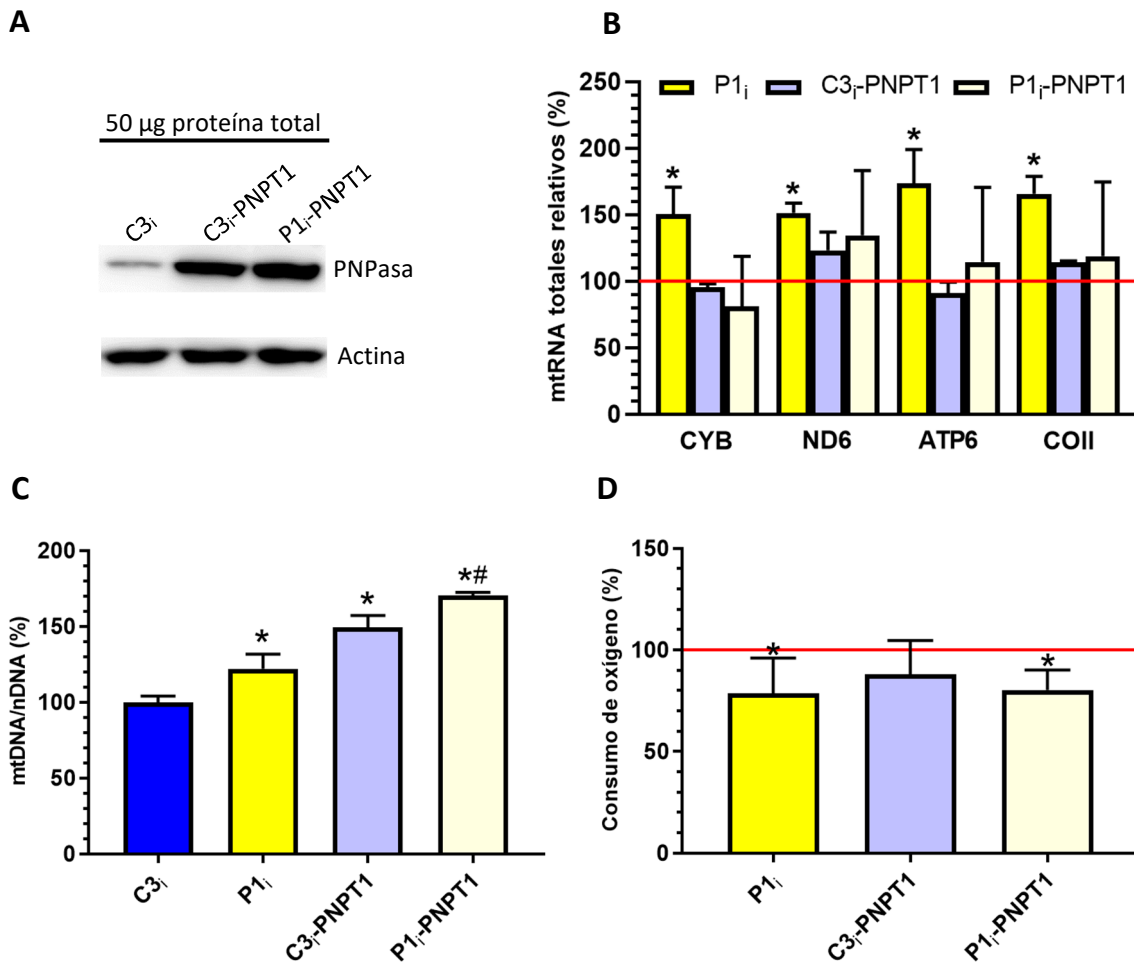
<sup>228</sup> Es equivalente a normalizar la actividad del CIV por cantidad de mitocondrias, ya que la CS, que se trata de una enzima situada en la matriz mitocondrial, se usa como marcador de la biogénesis mitocondrial.

crecidos en medio DMEM con alta glucosa y DMEM con galactosa, y partiendo de 1 000 células/pocillo ( $n = 4$ ; ver [Figura 3.1](#) como ejemplo). **(B)** Síntesis de 11 de las 13 proteínas codificadas por el mtDNA (no se pudieron distinguir correctamente ND4 ni ATP6) en C3<sub>i</sub> y P1<sub>i</sub> ( $n = 1$ ). Orden de mayor a menor síntesis: ND4L > ATP8 > COI > CYB > ND6 > COIII > ND5 > ND2 > COII > ND1 > ND3 (subrayadas en las que existe aumento). La intensidad promedio en el paciente asciende un 17,8 % con respecto al control. **(C)** Actividad específica (nmol/(min\*mg proteína<sup>229</sup>) de la CS y del CIV del sistema OXPHOS en C3 y P1 ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por duplicado técnico). **(D)** Actividad del CIV normalizada por la actividad de la CS. **(E)** Capacidad de consumo de oxígeno ([fmolO<sub>2</sub>/ml]/min)/célula) en C3 y P1, evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN ( $n = 3$ ). **(F)** Niveles de ATP mitocondrial (tras su síntesis durante la duración del ensayo) por célula viable en C1 y P1 ( $n = 6$ ). En todos los ensayos aparece representada la media de los valores obtenidos y su desviación estándar (excepto en **(B)**). En todos los casos los datos se muestran en porcentaje (%) con respecto a cada control: C3 en **(A)** (en concreto, C3 en glucosa, representada con una línea roja; 100 %), **(C)**, **(D)** y **(E)**; C3<sub>i</sub> en **(B)** (línea azul; 100 %); C1 en **(F)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor <0,05 (comparando con el respectivo control de cada ensayo).

#### 4.1.9 Ensayo de complementación: sobreexpresión de PNPT1

Con objeto de tratar de revertir el fenotipo patológico detectado en los fibroblastos del paciente, se llevó a cabo un ensayo de complementación tanto en C3 como en P1. Sin embargo, estos últimos, ya con un menor crecimiento de por sí con respecto a C3 en glucosa ([Figura 4.9A](#)), experimentaron un mayor déficit en su capacidad de división y pasaron a ser células senescentes. En consecuencia, se optó por inmortalizar los fibroblastos C3 y P1 primero (comprobado por observación al microscopio invertido y PCR; datos no ofrecidos) y sobreexpresar *PNPT1* en los mismos posteriormente ([Figura 4.10A](#)). Tras tener los fibroblastos con las modificaciones de interés, se analizó su número de copias del mtDNA y los niveles totales de algunos mtRNA por qPCR con sondas TaqMan®, así como su capacidad de consumo de oxígeno. La sobreexpresión de *PNPT1* provoca un aumento en el número de copias del mtDNA ([Figura 4.10C](#)), siendo mayor en los fibroblastos derivados del paciente (P1<sub>i</sub>-PNPT1) que en los del control (C3<sub>i</sub>-PNPT1). Sin embargo, mientras que P1<sub>i</sub> experimenta un cúmulo de todos los transcritos totales analizados, la sobreexpresión de *PNPT1* en P1<sub>i</sub> revierte el fenotipo ([Figura 4.10B](#)). Esto implica que el aumento del número de copias del mtDNA en P1 ([Figura 4.4A](#)) no es el principal responsable del cúmulo de los transcritos observados en dichos fibroblastos ([Figura 4.5](#)) y afianza que sea debido al déficit de la PNPasa ([Figura 4.3](#)). Cabe destacar que no se consiguió recuperar la capacidad de consumo de oxígeno de P1<sub>i</sub> al sobreexpresar *PNPT1* con respecto a C3 ([Figura 4.10D](#)), en lo que puede haber influido tanto inmortalizar a los fibroblastos, ya que lleva a que éstos adopten un fenotipo algo distinto al de las células primarias, como al hecho de que la sobreexpresión de *PNPT1* es perjudicial para las células ([Sarkar et al., 2003](#); [van Maerken et al., 2009](#)), tal y como observamos en los fibroblastos no inmortalizados.

<sup>229</sup> Las actividades se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total (mg/ml), detectada por el método de Bradford.

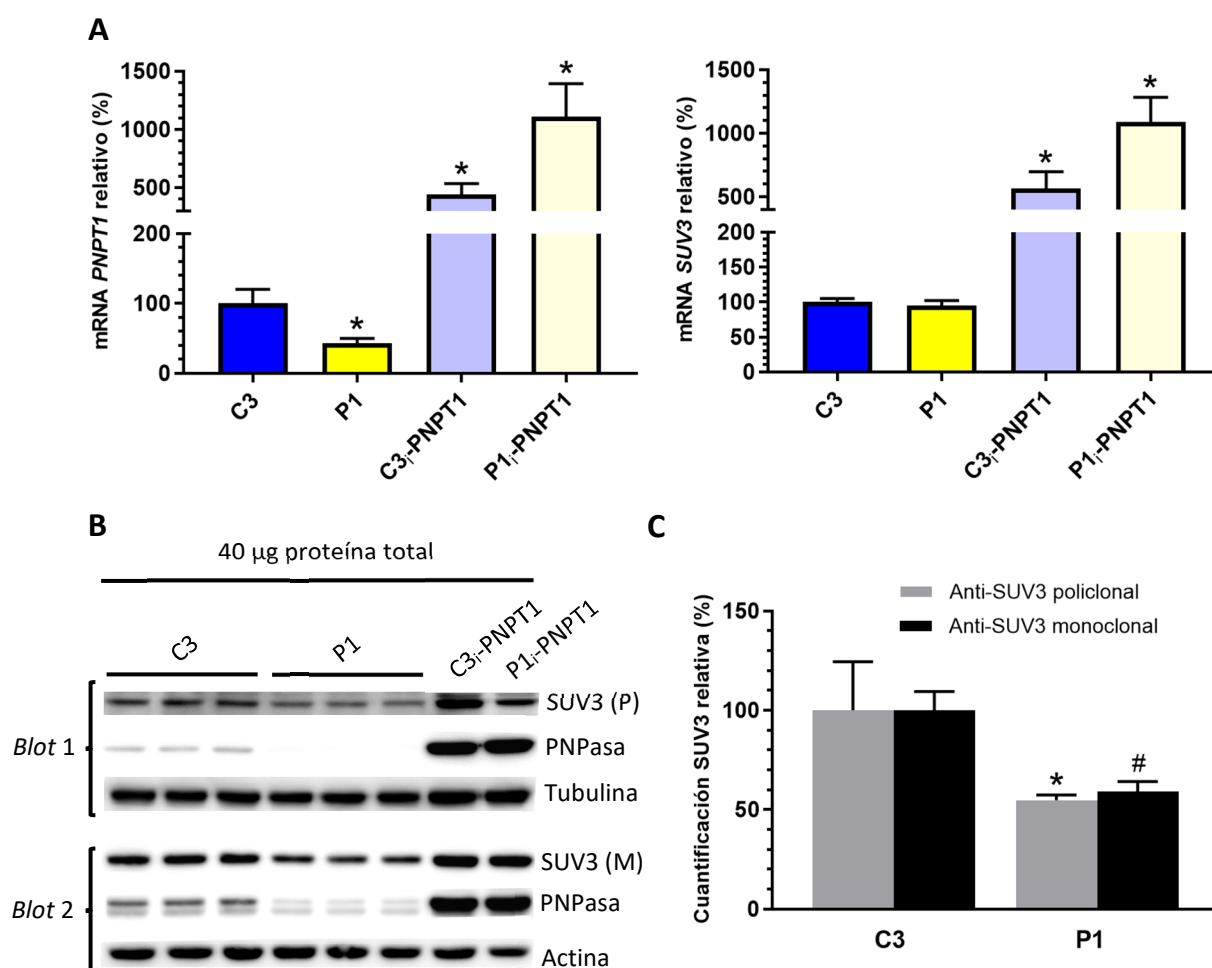


**Figura 4.10.** Valoración de la sobreexpresión de *PNPT1* en fibroblastos por complementación genética. **(A)** Confirmación de la sobreexpresión de *PNPT1* en C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1 con respecto a C3<sub>i</sub> por medio de un *Western blot* con un gel separador al 12,5 % y utilizando la actina como control de carga. **(B)** Niveles de diversos mtRNA totales (maduros y policistrónicos sin procesar) analizados por qPCR en C3<sub>i</sub>, P1<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1 (n = 3; cada n medida por triplicado técnico). **(C)** Cuantificación del número de copias del mtDNA en C3<sub>i</sub>, P1<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1 por qPCR, normalizando los valores con respecto al nDNA (n = 3; cada n medida por triplicado técnico). **(D)** Capacidad de consumo de oxígeno ([fmolO<sub>2</sub>/ml)/min]/células) en C3<sub>i</sub>, P1<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1, evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN (n = 4). En **(B)**, **(C)** y **(D)** se representa la media de los valores obtenidos para cada experimento, junto a su desviación estándar, en porcentaje (%) con respecto a la media de los datos de C3 (línea roja en **(B)** y **(C)**; 100 %). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con C3). Con el mismo test, en **(B)**, **(C)** y **(D)** también se analizó la significación de P1<sub>i</sub>-PNPT1 con respecto a C3<sub>i</sub>-PNPT1, siendo significativos (#) los resultados con p-valor <0,05.

#### 4.1.10 Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de SUV3

Dado que en la matriz mitocondrial se ha descrito que la PNPasa interactúa con la helicasa SUV3, constituyendo el degradosoma (D. D.-H. Wang et al., 2009, 2014), se decidió analizar si los niveles de los transcritos y proteínas de dichas moléculas se encuentran o no relacionados. Para ello, por un lado, se cuantificó y amplificó por qPCR con SYBR Green los cDNA obtenidos a partir de los mRNA de *PNPT1* y SUV3 y, por otro, se separaron por *Western blot* las proteínas de interés, con su correspondiente cuantificación posterior. En ambos casos, se analizaron muestras procedentes de fibroblastos control y del paciente, pero también de los

fibroblastos inmortalizados que sobreexpresan *PNPT1*. Por qPCR se obtuvo que el mRNA de *SUV3* no se ve afectado en el paciente y, por tanto, difiere con respecto a la pérdida de los niveles de *PNPT1*<sup>230</sup>, mientras que, por el contrario, la sobreexpresión de *PNPT1* también causa un aumento de los niveles del mRNA de *SUV3* (Figura 4.11A). A nivel proteico, sí se obtuvo una caída de *SUV3* en el paciente con respecto al control, aunque no tan pronunciada como la de la PNPasa<sup>231</sup> (Figuras 4.3C y 4.11C), mientras que en los fibroblastos que sobreexpresan *PNPT1* se observa un aumento tanto de la PNPasa como de *SUV3* (Figura 4.11B). Todo ello sugiere que los niveles de ambas proteínas se encuentran altamente relacionados entre sí, coincidiendo con la función conjunta que efectúan, y motivó a intentar estudiar los niveles y el ensamblaje del degradosoma, si bien no se consiguió detectar este complejo (ver anexo 8.9 para más información). Cabe destacar que la PNPasa y *SUV3* presentan un peso molecular parecido (Tabla 3.42; Figura 4.11B, blot 2), hecho por el que se decidió analizar los resultados obtenidos con dos anticuerpos contra *SUV3* diferentes. El comportamiento en ambos casos fue similar (Figuras 4.11B y 4.11C) y, por tanto, se mantienen las observaciones indicadas con anterioridad sobre sus niveles.



**Figura 4.11.** Comparación de los niveles de transcritos y proteína entre *SUV3* y la PNPasa en fibroblastos. (A) Nivel de los mRNA de *PNPT1* y *SUV3* detectados por qPCR de C3, P1 y los fibroblastos inmortalizados

<sup>230</sup> Presumiblemente porque, al no presentar el mRNA de *SUV3* codones de parada prematuros, no entra en la ruta NMD.

<sup>231</sup> Una posibilidad es que, aunque parece existir una regulación proteica de ambas moléculas, la PNPasa del paciente experimente aun así una mayor degradación por sus variantes (Figura 4.3B).



que sobreexpresan *PNPT1*: C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1. En ambas gráficas se representa la media de los valores obtenidos, y su desviación estándar, en porcentaje (%) con respecto a la media de los datos de C3 y tomando la actina como *housekeeping* ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C3). **(B)** Cantidad de las proteínas SUV3 y PNPasa presentes en C3 y P1 ( $n = 3$ ), así como en C3<sub>i</sub>-PNPT1 y P1<sub>i</sub>-PNPT1. Los anticuerpos se añadieron de manera secuencial en dos membranas distintas (*blot* 1 y *blot* 2), siendo SUV3 (P) un anticuerpo policlonal y SUV3 (M) un anticuerpo monoclonal, ambos contra SUV3 (Tabla 3.42). El *blot* 1 y el *blot* 2 se obtuvieron a partir de un gel separador al 10 % y al 8 %, respectivamente. En el *blot* 2 la banda inferior a la PNPasa se corresponde con la del anticuerpo SUV3 (M), hibridado previamente. **(C)** Cuantificación de los resultados obtenidos en **(B)**, usando la tubulina y la actina como controles de carga para el *blot* 1 y el *blot* 2, respectivamente. Se representa la media de los datos y su desviación estándar en porcentaje (%), estando relativizado cada *blot* con respecto a la media de los valores de su C3. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\* para el *blot* 1; # para el *blot* 2) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con los respectivos C3 de cada *blot*).

#### 4.1.11 Estudio de la localización intramitocondrial de la PNPasa

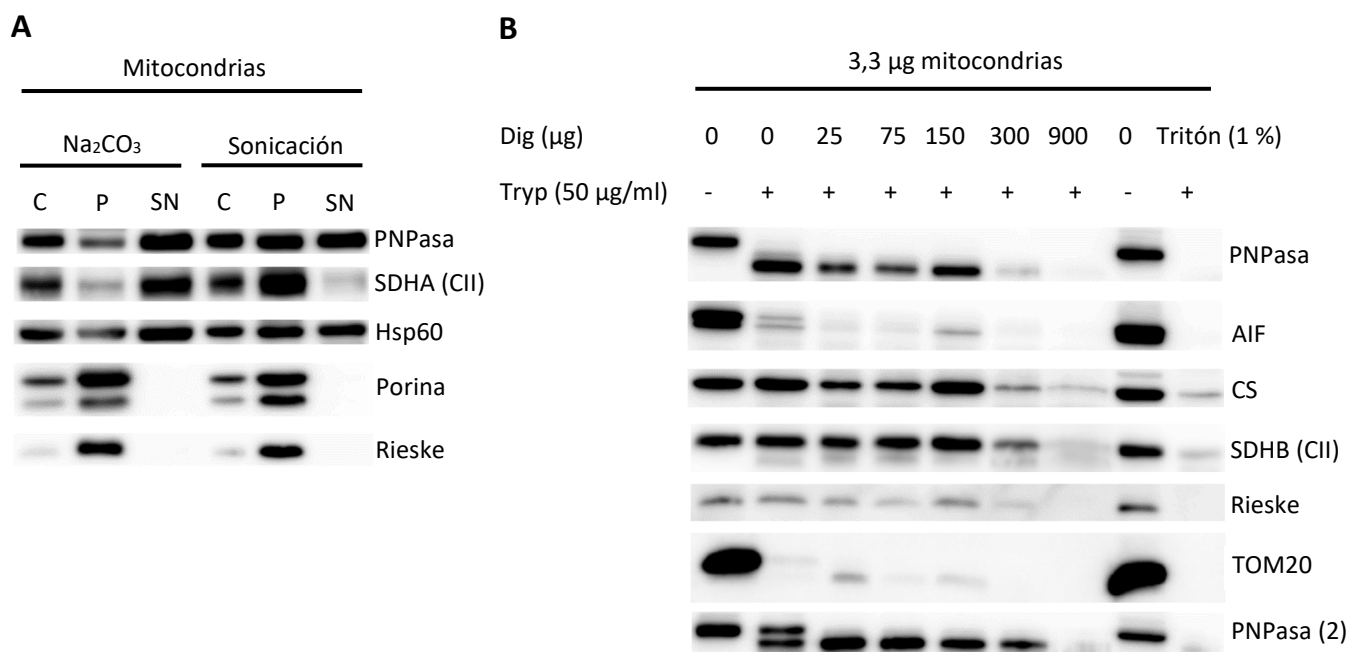
Como se expone en el apartado 1.4.4.2, la localización intramitocondrial de la PNPasa se encuentra en debate en la literatura. Con objeto de verificar si la PNPasa se encuentra en la matriz y/o en el IMS se llevaron a cabo dos ensayos en mitocondrias purificadas de células HEK293T: separación de las proteínas solubles y de membrana mediante ciclos de *freeze-thawing* con sonicación posterior, por un lado, y por medio de la extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , por otro; tratamiento con tripsina y diferentes concentraciones de digitonina. En el primero de los experimentos, los sobrenadantes contienen proteínas solubles, tanto de la matriz como del IMS (sonicación) o proteínas solubles y periféricas de membrana (extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); en los pellets se encuentran tanto las proteínas periféricas como las integrales (sonicación) o las proteínas integrales de membrana (extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). De entre las proteínas de distinta localización mitocondrial usadas como control, el patrón de bandas con el que más se asemeja la PNPasa es con la SDHA, en la extracción con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y con Hsp60, en general. Ambas son proteínas de la matriz mitocondrial, pero mientras que la SDHA es periférica de la IM, Hsp60 es una proteína soluble y muy abundante, siendo esto último el motivo por el que la encontramos en todas las fracciones (Figura 4.12A). Por su parte, en el segundo ensayo las proteínas usadas como control con las que más parecido guarda la PNPasa son SDHB y CS, ambas también localizadas en la matriz (Figura 4.12B). Atendiendo al propio patrón de bandas de la PNPasa, los resultados del primer experimento sugieren que se trata de una proteína soluble o periférica de la IM (Figura 4.12A), mientras que la pérdida de kDa<sup>232</sup> (PNPasa) o la presencia de dos bandas (PNPasa (2)) al comenzar el tratamiento con tripsina sin digitonina parece indicar que una parte de la PNPasa se localiza en el IMS<sup>233</sup> (Figura 4.12B). Por otro lado, está el hecho de que el anticuerpo utilizado para detectar la PNPasa (Tabla 3.42) reconoce los residuos 427-783 de la proteína y que la herramienta MEMSAT predice la presencia de una hélice transmembrana para la PNPasa (Figura 4.13A), que coincide con ser el espacio entre los que más residuos hay sin corte de la tripsina (Figura 4.13B). Todo ello, nos lleva a proponer que es posible que la PNPasa

<sup>232</sup> Utilizando la herramienta ProtParam, teóricamente la PNPasa completa presenta 86 kDa, sin el péptido señal 81 kDa y, además, sin la región transmembrana predicha por MEMSAT 68 kDa.

<sup>233</sup> En general, la OM de las mitocondrias aisladas puede encontrarse algo agujereada y que, por tanto, la tripsina pueda acceder a proteínas o fracciones del IMS sin digitonina. A su vez, esto explica la degradación que experimenta AIF, una proteína del IMS, en la calle con tripsina, pero sin digitonina. En cambio, las proteínas control que se localizan en la matriz mitocondrial permanecen intactas en estas condiciones.



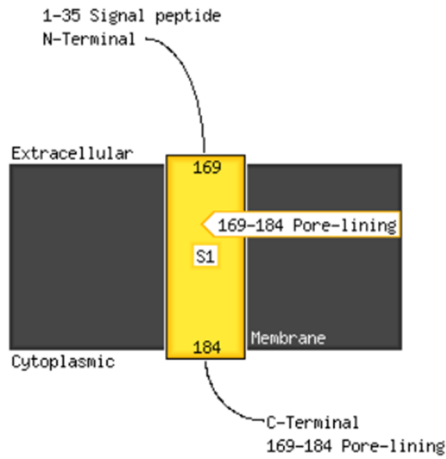
pueda encontrarse tanto soluble en la matriz como anclada a la IM por su N-terminal, estando éste expuesto en el IMS. No obstante, más experimentos son necesarios para establecer de forma inequívoca la localización intramitocondrial de esta proteína.



**Figura 4.12** Localización intramitocondrial de la PNPasa en mitocondrias aisladas de células HEK293T. **(A)**<sup>234</sup> Fraccionamiento subcelular de las mitocondrias mediante ruptura física con sonicación o extracción con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, obteniendo una muestra control con todas las proteínas (C), un sobrenadante (SN) y un pellet (P). La intensidad de las bandas de la PNPasa obtenida para cada muestra se contrasta con: SDHA, localizada en la matriz formando parte del CII, junto a SDHB, SDHC y SDHD; Hsp60, chaperona situada en la matriz; porina o VDAC1, integrada en la OM; Rieske, también conocida como UCRFS1, una subunidad del CIII que se encuentra en la IM. **(B)** Digestión con tripsina (50 µg/ml finales) de mitocondrias con las membranas más disgregadas a mayor cantidad (µg) de digitonina añadida. Las dos últimas calles se usaron como control de la técnica, sin añadir nada (como en la primera calle) o utilizando Tritón al 1 % de concentración final, en lugar de digitonina. Las proteínas con que se compara la PNPasa son: AIF, situada en el IMS; la CS y SDHB (subunidad del CII), ambas de la matriz mitocondrial; Rieske, mencionada previamente; TOM20, subunidad del complejo TOM, integrada en la OM. Las bandas tituladas como *PNPasa (2)* se corresponden con las de la PNPasa obtenidas con otras mitocondrias a las del resto de anticuerpos de la imagen. Tanto en **(A)** como en **(B)** las proteínas se separaron mediante un *Western blot*, con un gel separador del 10 % en **(A)** y del 12,5 % en **(B)**, y los anticuerpos contra las proteínas de interés se añadieron secuencialmente.

<sup>234</sup> El volumen cargado de cada una de las fracciones obtenidas fue diferente: 6 µl de los controles, 6,7 µl de los sobrenadantes y 3 µl de los pellets resuspendidos.

**A**



**Figura 4.13.** Predicción del carácter transmembrana de la PNPasa. **(A)** MEMSAT de PsiPred predice la existencia de una hélice transmembrana constituida por los residuos 169-184. Sólo con este predictor no puede establecerse la orientación de la PNPasa, ya que no distingue entre el IMS y la matriz mitocondrial. **(B)** PeptideCutter establece todas las posiciones en que la PNPasa puede ser metabolizada por la tripsina. Entre 136-192 es el espacio en que más residuos hay entre un posible corte y el siguiente. La hélice transmembrana predicha por MEMSAT se encuentra incluida en el mismo.

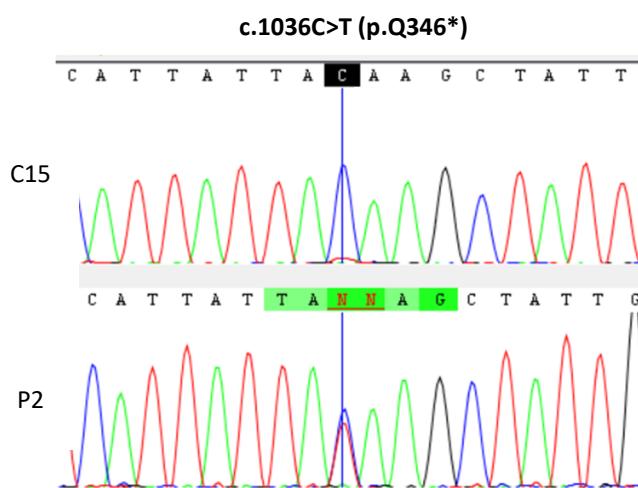
**B**

Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Trypsin	88	5 12 25 26 28 36 45 54 55 62 65 87 103 105 111 118 119 126 132 136 192 206 207 223 246 250 264 270 271 275 285 289 294 306 309 315 317 325 327 345 349 357 358 362 368 378 388 407 419 421 439 445 446 456 464 471 516 521 528 546 552 562 569 582 583 591 597 600 601 616 617 619 629 630 661 690 697 715 716 718 734 738 744 746 749 750 761 766

## 4.2 TEFM

### 4.2.1 Confirmación de la presencia de la variante en fibroblastos del paciente

Para verificar que los fibroblastos del paciente (P2) presentan la variante *de novo* en heterocigosis encontrada en el gen *TEFM* (p.Q346\*), se extrajo su RNA total, se obtuvo su cDNA, de éste se amplificó el transcrito canónico de *TEFM* por PCR, se purificaron los productos de PCR y se mandaron a secuenciar, detectando la presencia de la variante descrita (Figura 4.14). Cabe destacar que la altura parecida de los picos detectados en la posición c.1036 de *TEFM* del paciente sugiere unos niveles similares de transcripción por parte de ambos alelos.



**Figura 4.14.** Electroferograma con la variante en *TEFM* de fibroblastos del paciente. Alineamiento de secuencias del control C15 y el paciente P2, obtenidas partiendo de RNA. En el control sólo aparece el nucleótido *wild-type* en la posición 1036 de la CDS (línea vertical azul), mientras que el paciente presenta un doble pico de citosina y timina en dicha posición, coincidente con la presencia de la variante en heterocigosis.

### 4.2.2 Secuenciación del mtDNA del paciente

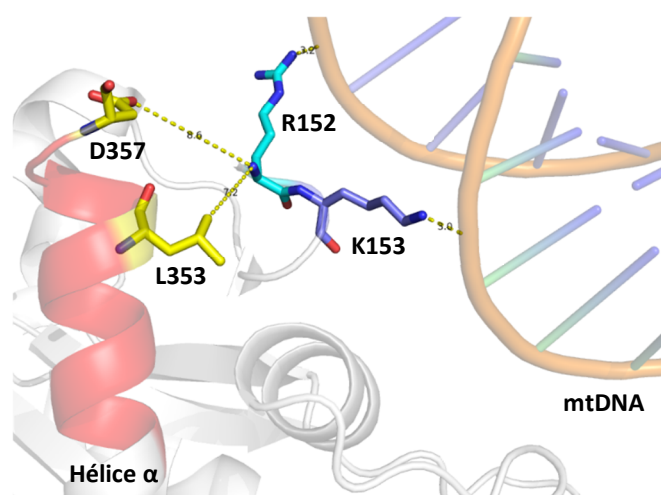
Dada la naturaleza *de novo* de la variante detectada en el paciente, se llevó a cabo la secuenciación de su mtDNA con objeto de descartar la presencia de mutaciones en el mismo. Para ello se extrajo DNA total y se amplificó el mtDNA por PCR y PCR anidada en 8 fragmentos. Posteriormente, éstos fueron validados, purificados y enviados a secuenciar por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se solaparon entre sí y junto a la secuencia de referencia rCRS, obteniendo que el paciente presenta diferentes polimorfismos en su mtDNA, pero ninguna mutación: m.750A>G, m.1438A>G, m.1821A>G, m.3010G>A, m.4733T>C, m.4769A>G, m.8860A>G, m.12771G>A, m.13708G>A, m.15326A>G, m.15848A>G, m.16291C>T, m.16519T>C. Debido a la presencia de los polimorfismos m.1821A>G, m.3010G>A y m.4733T>C puede establecerse que el paciente pertenece al haplogrupo H1j2.

Por otra parte, la G4 de CSBII se caracteriza por estar constituida por una secuencia altamente polimórfica, de manera que a mayor contenido en guaninas más eficiente resulta en la terminación prematura de la transcripción (G6AG8 > G5AG7; secuencia del transcrito)<sup>235</sup> (Agaronyan et al., 2015; Hillen, Parshin, et al., 2017). La secuencia del paciente en esta localización es G6AG9, si bien se ha descrito que la presencia de un polimorfismo más o menos eficiente no influye sobre la actividad de TEFM (Tan et al., 2016).

<sup>235</sup> G5AG7 es la secuencia polimórfica presente en el CSBII de la rCRS (y, por tanto, la que puede encontrarse en el anexo 8.6) mientras que G6AG8 se encuentra más extendida entre los diferentes haplogrupos (Agaronyan et al., 2015; Tan et al., 2016).

### 4.2.3 Análisis bionfornático: predicción de la patología

Antes de realizar diferentes ensayos relacionados con el paciente y *TEFM*, se llevó a cabo un estudio *in silico* como primera toma de contacto para establecer si la variante p.Q346\* presenta un carácter patológico o no. El predictor de patología MutationTaster<sup>236</sup> señala la mutación como patológica (probabilidad 0.9999998896414), lo que coincide con que la Q346 se encuentre altamente conservada y los residuos Q346-P360 parcialmente conservados entre las especies analizadas (se dispone de un alineamiento de 250 especies en el anexo 8.8). Estos residuos se pierden a causa de la variante *de novo*, pero, pese a localizarse en el C-terminal (región fundamental en las interacciones que establece TEFM con POLRMT y el RNA generado, como se indica en el apartado 1.4.2), aparentemente no participan en los enlaces que establece dicha región con otras moléculas del EC (Hillen, Parshin, et al., 2017). Mediante un análisis estructural con PyMOL en base al PDB 5OLA, obtenemos que el extremo C-terminal de la hélice  $\alpha$  que constituyen los residuos Q346-D357<sup>237</sup> se encuentra próximo a residuos del inter-dominio enlazante que se unen al mtDNA, pero está demasiado alejada como para poder interactuar con ellos (Figura 4.15). Estas observaciones sugieren que la variante no influye directamente sobre las interacciones de TEFM en su actividad anti-terminadora de la transcripción, pero podría ser que afectara al plegamiento de la proteína o a algún cambio de conformación funcional, principalmente en su interacción con el mtDNA.



**Figura 4.15.** Análisis del efecto de la variante p.Q346\* sobre TEFM (PDB 5OLA). R152 y K153 son residuos del interdominio enlazante (Figura 1.11) que presentan una cadena lateral con carga positiva, capaz de interactuar con los grupos fosfato del mtDNA (del que se muestra parte de su doble cadena): R152 se encuentra a 3,2 Å; K153 a 3 Å. La L353 y el D357 de la hélice  $\alpha$  de la que forman parte los residuos afectados por la variante (Q346-D357; en rojo), están a 7,2 Å<sup>238</sup> y 8,6 Å de la R152, respectivamente. Todos los residuos mencionados se encuentran representados en *sticks*, donde los átomos de oxígeno están en rojo, los de nitrógeno en azul y los átomos de carbono en amarillo (L353 y D357), cian (R152) y azul claro (K153). La figura ha sido realizada con el programa PyMOL (v1.3r1).

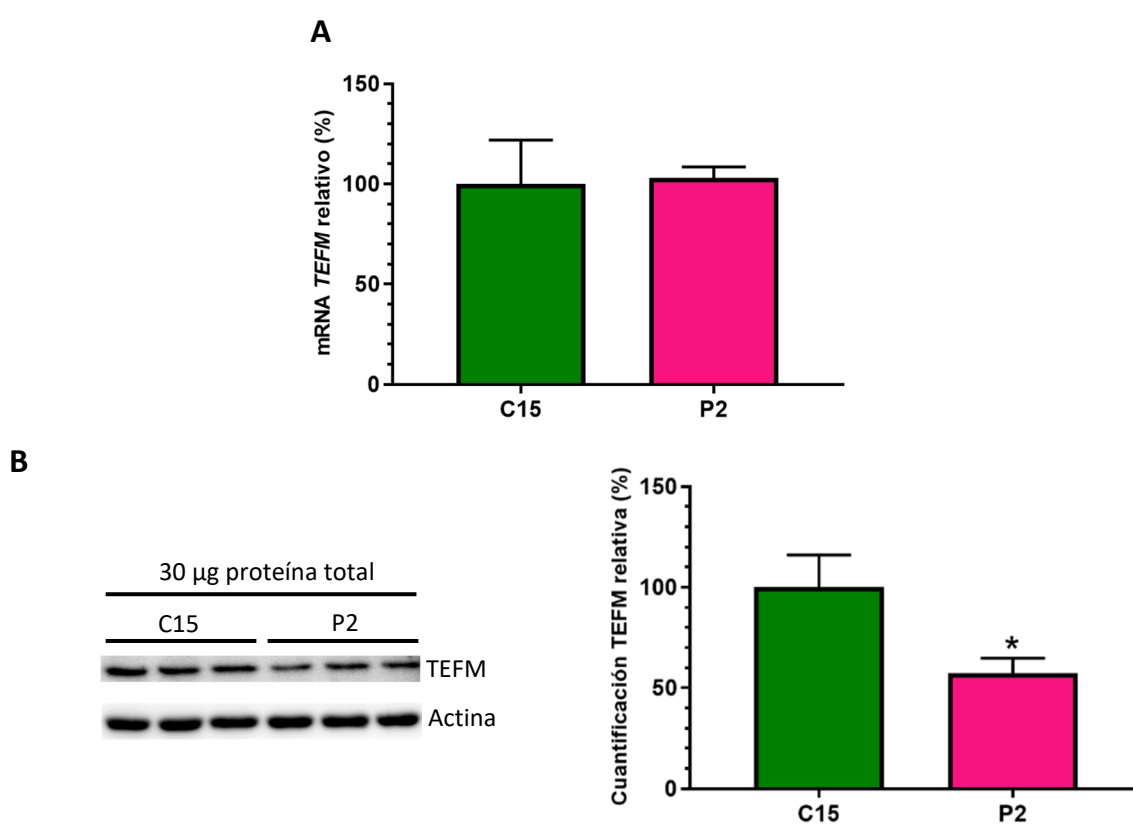
<sup>236</sup> PROVEAN Protein también permitía predecir la patología de variantes sin sentido, como la p.K562\* de la PNPasa, pero el servicio *online* dejó de estar disponible antes de poder valorar la variante p.Q346\*.

<sup>237</sup> Los residuos S358, Q359 y P360 no se encuentran cristalizados.

<sup>238</sup> Para todos los residuos ofrecidos en la imagen, pero, especialmente, para la L353, se han escogido los átomos más próximos para visualizar la distancia entre ellos, con independencia de si pueden o no establecer una interacción.

#### 4.2.4 Cuantificación de los niveles del transcrito y proteína de TEFM

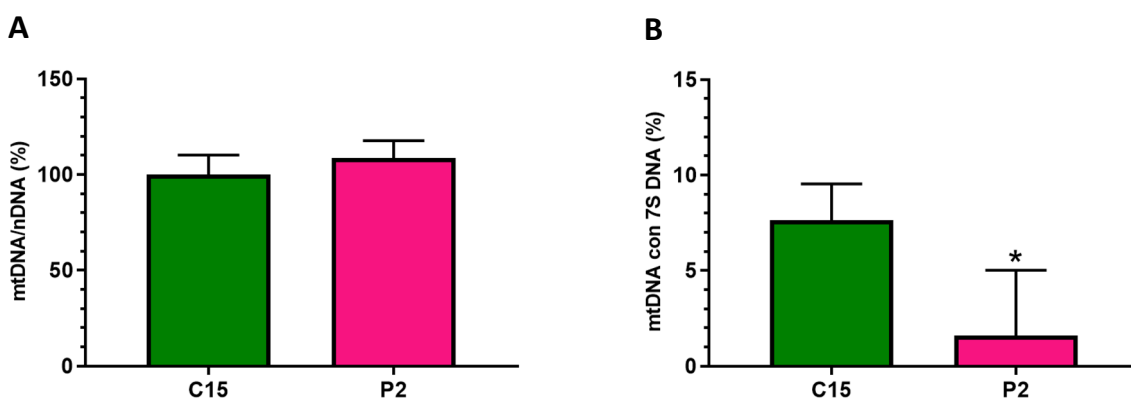
Para valorar el estado de *TEFM* en los fibroblastos del paciente se analizó su mRNA y su producto proteico. Para lo primero se extrajo RNA total, se retrotranscribió a cDNA mediante oligo(dT)<sub>18</sub> y el procedente del mRNA de *TEFM* se amplificó y cuantificó por qPCR con SYBR Green. No se detectaron diferencias entre el control y el paciente (Figura 4.16A), de manera que, a pesar de que la variante del paciente genera un codón de parada prematuro, el transcrito no parece ser eliminado por la ruta NMD. Esto puede deberse a que dicho codón nuevo debe situarse  $\geq 50$ -55 nucleótidos *upstream* de una unión exón-exón (Kurosaki et al., 2019) y la variante del paciente se produce en el último exón de *TEFM* (Figura 1.11). Por su parte, los niveles de la proteína TEFM se analizaron mediante un *Western blot*, previa extracción de las proteínas totales, y se cuantificaron, obteniéndose una caída media del 43 % (Figura 4.16B). Esto, junto a su análisis del mRNA, implica que la variante afecta a *TEFM* principalmente a nivel proteico, promoviendo su degradación.



**Figura 4.16.** Evaluación en los fibroblastos del paciente de los niveles *TEFM*. **(A)** Nivel del mRNA de *TEFM* detectado por qPCR de C15 y P2, en que se empleó la actina como *housekeeping* ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). Forma parte de la Figura 4.23A. **(B)** Cantidad de la proteína TEFM presente en C15 y P2, observada por *Western blot* con gel separador al 10 % y cuantificada tomando la actina como control de carga. En ambos resultados se representa la media de los datos y su desviación estándar en porcentaje (%), todo ello relativizado con respecto a la media de los valores de C15. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C15).

#### 4.2.5 Análisis de la replicación: niveles de mtDNA y 7S DNA

La replicación del mtDNA en el paciente se estudió por medio del análisis del número de copias del mtDNA con respecto al nDNA y del porcentaje de dichas moléculas que presentan 7S DNA. Para ambos experimentos se purificó DNA total y se realizó una qPCR posterior. El paciente presenta un ligero aumento no significativo del número de copias del mtDNA (Figura 4.17A), mientras que sí presenta una caída clara del 7S DNA (Figura 4.17B). Igual que para el paciente P1, esto coincide con el hecho de que el *D-loop* sea una molécula que se sintetiza al terminar la replicación de forma prematura en la TAS de la NCR y, por tanto, se encuentre inversamente relacionada con el número de copias (Jemt et al., 2015; Nicholls & Minczuk, 2014; Reyes et al., 2020; Røyrvik & Johnston, 2020). Además, en el control el porcentaje medio de copias de mtDNA que contienen 7S DNA es similar al 10 % descrito en la literatura (Nicholls & Minczuk, 2014).



**Figura 4.17.** Número de copias del mtDNA y cantidad de las mismas con 7S DNA en fibroblastos del paciente. **(A)** Cuantificación del número de copias del mtDNA de C15 y P2 por qPCR, normalizando los valores con respecto al nDNA ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). **(B)** Cuantificación por qPCR de las copias de mtDNA que presentan 7S DNA de C15 y P2, normalizando los datos con respecto al 7S DNA ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). Tanto en **(A)** como en **(B)** se representa la media de los datos y su desviación estándar en porcentaje (%), relativizados respecto a la media de los valores de C15 **(A)** o a la situación en que no hay ninguna copia de 7S DNA y  $\Delta Ct = 0$  **(B)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C15). Esta figura forma parte de las Figuras 4.23C y 4.23D.

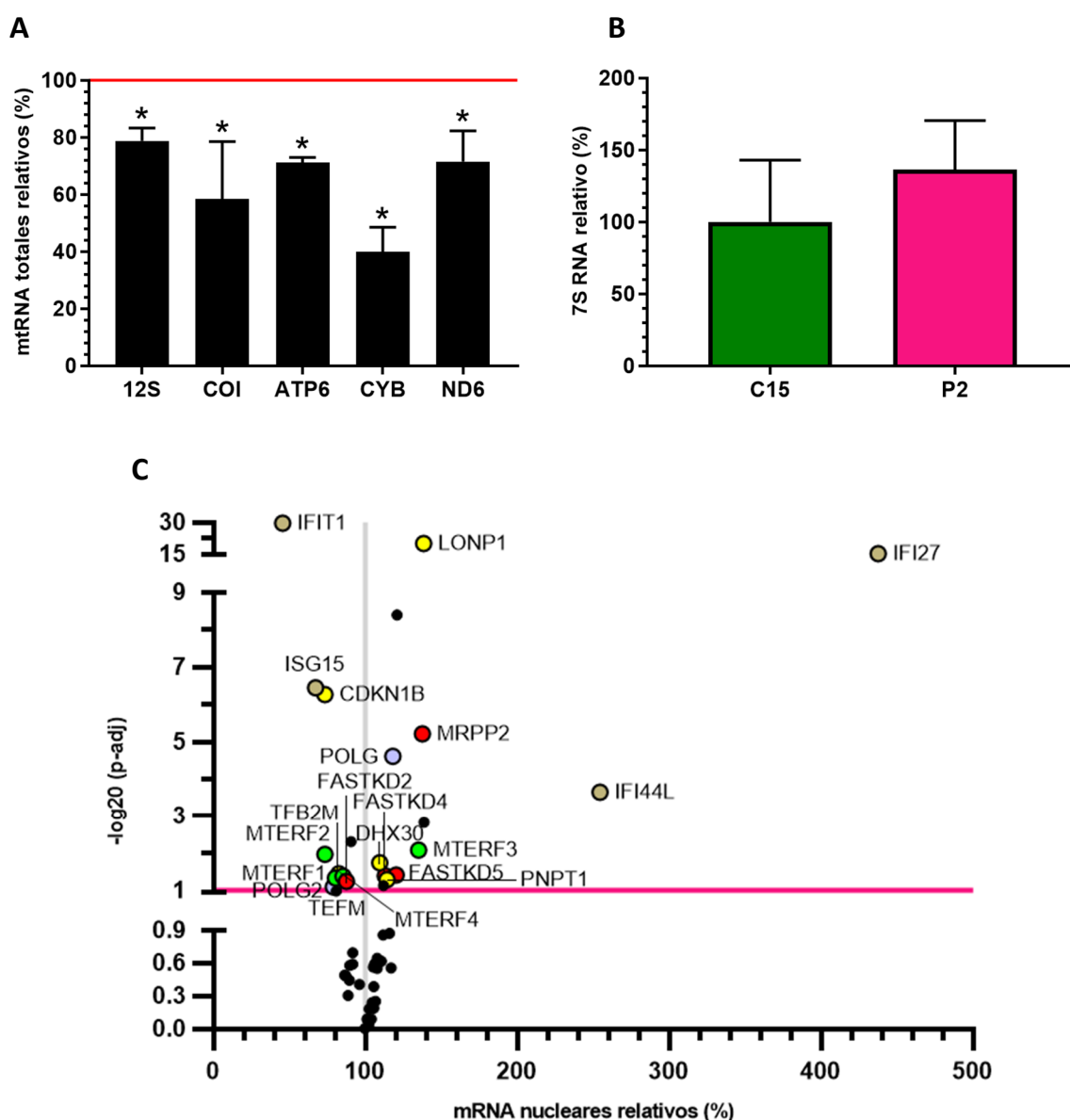
#### 4.2.6 Cuantificación de RNA implicados en la funcionalidad mitocondrial

La principal función descrita que lleva a cabo TEFM es la de elongar la transcripción mitocondrial, permitiendo así la síntesis completa de los transcritos de ambas cadenas del mtDNA. Con objeto de analizar si un déficit en sus niveles proteicos provoca algún tipo de cambio en los niveles totales de los transcritos, y a partir de muestras de RNA total (tratadas con DNasa I previamente) procedentes de fibroblastos control y del paciente, se llevó a cabo la cuantificación de diversos mtRNA por qPCR. Los transcritos analizados presentan menores niveles en los fibroblastos del paciente con respecto al control, lo que confirma la hipótesis de que su transcripción mitocondrial se encuentra comprometida (Figura 4.18A) y se ve reafirmado por el hecho de que de media el paciente presenta mayores niveles del 7S RNA (Figura 4.18B).

Por otra parte, a partir de los datos de transcriptómica de la RNA-seq se elaboró un panel con 53 genes nucleares codificantes, sobre todo, para diversas proteínas mitocondriales, localizadas en los nucleoides, gránulos de RNA y D-foci (el panel se encuentra en el anexo 8.11). De los genes del panel con diferencias significativas en sus mRNA (Figura 4.18C), destacan los

implicados en la replicación del mtDNA (*POLG*, *POLG2*) y genes de las familias MTERF (*MTERF1*, *MTERF2*, *MTERF3*, *MTERF4*) y FASTK (*FASTKD2*, *FASTKD4*, *FASTKD5*). Junto a otros, los genes de estas últimas pueden dividirse a su vez en los que participan en la activación/represión de la transcripción (*MTERF1*, *MTERF2*, *MTERF3*), en el procesamiento de los transcritos (*FASTKD4*, *FASTKD5*, *MRPP2*) y en los que influyen en la traducción mitocondrial (*MTERF4*, *FASTKD2*). Además, también se llevó a cabo un análisis del mitotranscriptoma (transcriptoma de los genes incluidos en MitoCarta 3.0 (Rath et al., 2021)), dividiendo los resultados en 16 funcionales mitocondriales y obteniendo un comportamiento similar al observado en el panel virtual con los 53 genes: dentro de los que experimentan diferencias significativas en sus niveles, existe un porcentaje similar de genes que se incrementan y disminuyen de forma global y para cada una de las funciones, teniendo todas ellas genes alterados (datos disponibles en el anexo 8.11).

Todas estas observaciones llevan a concluir que la variante de *TEFM* en el paciente no sólo influye sobre él mismo, sino que también afecta a la transcripción mitocondrial, en general, y de otros genes con los que se encuentra relacionado funcionalmente, en particular.



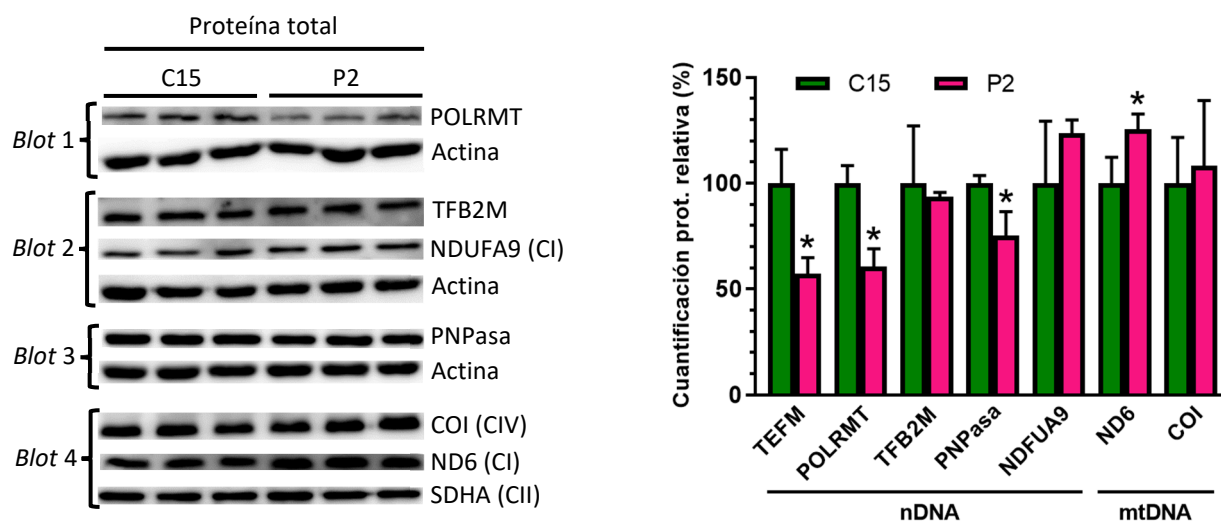
**Figura 4.18.** Caracterización de los niveles de mtRNA totales y de los mRNA del panel virtual con 53 genes nucleares<sup>239</sup> en fibroblastos del paciente. **(A)** Niveles de los transcritos totales de *MT-RNR1* (12S RNA), *COI*, *ATP6*, *CYB*, *ND6* analizados por qPCR de C15 y P2. **(B)** Nivel del 7S RNA evaluado por qPCR en C15 y P2. En **(A)** y **(B)** Se representa la media de los valores obtenidos para cada transcrito de interés, así como su desviación estándar (n = 3; cada n medida por duplicado técnico en **(A)** y triplicado técnico en **(B)**). Además, los datos se muestran en porcentaje (%) con respecto a la media de los resultados de C15 para cada mtRNA (líneas rojas horizontal; 100 %) y utilizando el 18S rRNA como *housekeeping* **(A)** o la actina **(B)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con C15). **(C)** *Volcano plot* del panel virtual con los transcritos de 53 genes nucleares de P2 con respecto a C15 (n = 3). Los transcritos de P2 se representan en forma de círculos, agrupados por colores: en negro se encuentran aquellos que no experimentan un cambio estadísticamente significativo en sus niveles y/o de implicaciones inciertas; en azul genes de la replicación del mtDNA (*POLG*, *POLG2*), en verde genes de las familia MTERF (*MTERF1*, *MTERF2*, *MTERF3*, *MTERF4*); en rojo genes de la familia FASTK y relacionados con la misma (*FASTKD2*, *FASTKD4*, *FASTKD5*, *MRPP2*); en marrón genes de respuesta a interferón (*IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*); en amarillo genes no relacionados entre sí, pero con implicaciones en la funcionalidad de TEFM y/o de los fibroblastos (*TFB2M*, *PNPT1*, *CDKN1B*, *DHX30*, *LONP1*). Destacar que los genes subrayados son los que incrementan sus niveles. Además, los datos se encuentran divididos en cuatro cuadrantes, separados verticalmente por la media del control C15 para cada transcrito de estudio (línea gris clara; 100 %) y horizontalmente por el  $-\log_{20}$  del p-valor ajustado de 0,05 (línea rosa; 1). Por tanto, todos los transcritos de P2 a la derecha del 100 % aumentan con respecto a C15, mientras que a la izquierda disminuyen; los RNA por encima de 1 experimentan un cambio de niveles significativos en comparación con C15 (que son aquellos en que p-valor ajustado <0,05).

#### 4.2.7 Estudio de los niveles de proteínas mitocondriales

Se evaluó la cantidad de varias proteínas mitocondriales, tanto codificadas en el nDNA (relacionadas con el metabolismo del mtRNA) como en el mtDNA, en fibroblastos control y del paciente. Para ello se llevaron a cabo diferentes *Western blot* a partir de proteínas totales, cuantificadas previamente por el método de Bradford (Figura 4.19). En el paciente se produce una caída de POLRMT con respecto al control, pero no de TFB2M (no se encuentra alterado), lo que coincide con la dependencia funcional que presentan TEFM y POLRMT (comentada con anterioridad en el apartado 1.4.2). Además, los niveles de la PNPasa también se reducen significativamente, observación que reafirma la sugerencia ofrecida en el apartado 4.1.7 de que TEFM y la PNPasa se encuentran relacionadas y experimentan una regulación en sus niveles para adaptarse a los cambios en el metabolismo del mtRNA. Finalmente, destaca el aumento de las subunidades NDUFA9 (no significativo; codificada en el nDNA) y ND6 (significativo; codificada en el mtDNA), ambas del CI y cuyo incremento sugiere un mecanismo compensatorio de comunicación núcleo-mitocondria para paliar un posible defecto en el sistema OXPHOS.

<sup>239</sup> 49 en realidad, ya que no se obtuvieron *reads* para *RSAD2*, *SIGLEC1* y *TPH1*.



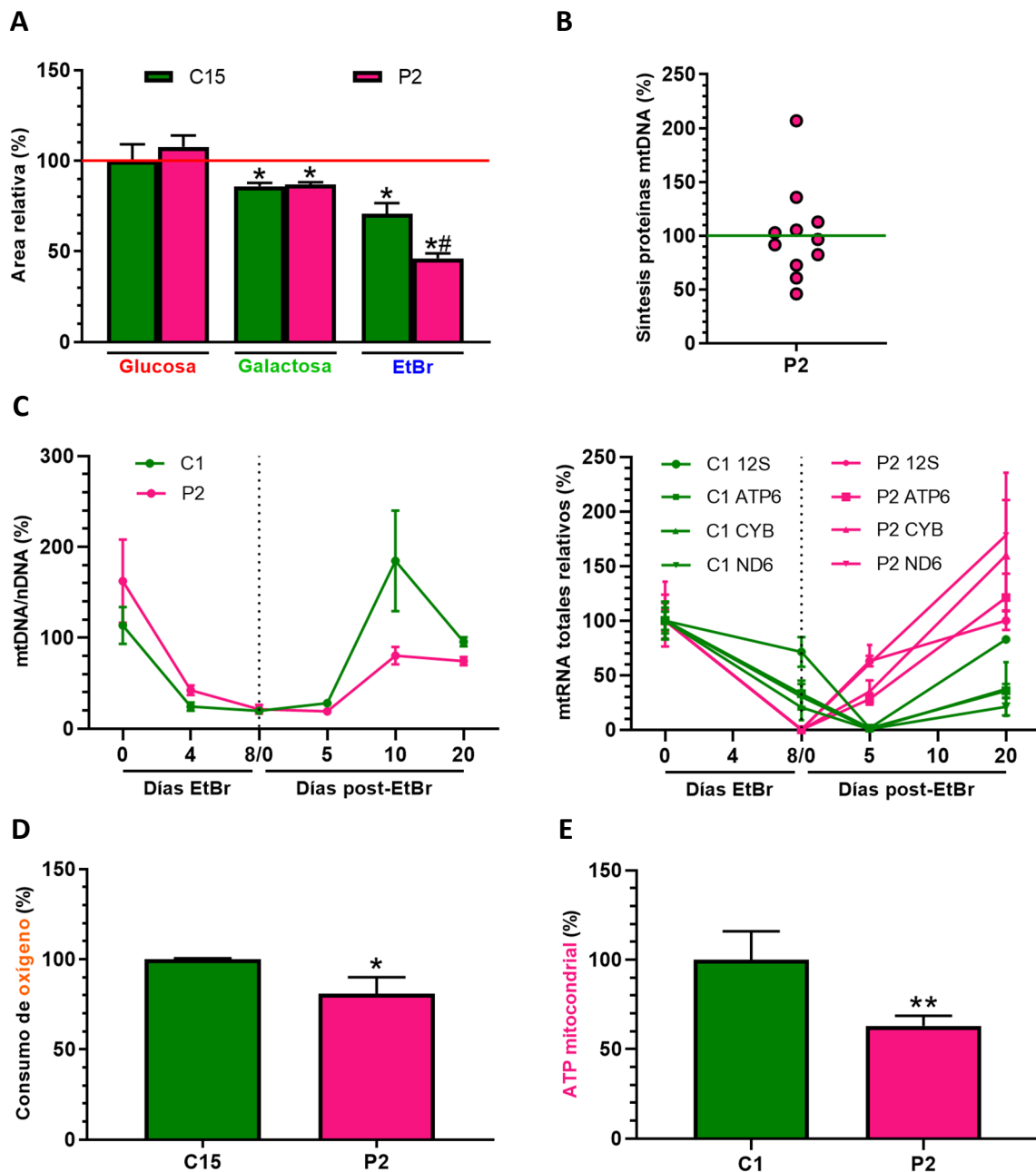


**Figura 4.19.** Cuantificación de las proteínas TEFM, POLRMT, TFB2M, PNPasa, NDUFA9, ND6 y COI en C15 y P2 por *Western blot*. En cada uno de los *blots* se empleó una cantidad de proteína total y un gel separador diferentes: *blot 1* con 60  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 8 %; *blot 2* con 40  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 10 %; *blot 3* con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 10 %; *blot 4* con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 12,5 %. En todos los *blots* los anticuerpos se añadieron de forma secuencial y se empleó la actina como control de carga, excepto en el *blot 4*, en que se usó la SDHA (subunidad del CII) en su lugar. En la gráfica se representa la media y desviación estándar en porcentaje (%) con respecto a C15 para cada una de las proteínas (los datos de TEFM son los de la [Figura 4.16B](#); mismo *blot* que el de la PNPasa: *blot 3*). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con C15).

#### 4.2.8 Crecimiento celular y estudio de la funcionalidad OXPHOS

Para establecer el estado de los fibroblastos del paciente y su actividad mitocondrial, se realizaron diferentes ensayos de carácter general y funcional. En primer lugar, se estudió el tiempo de duplicación de las células mediante el equipo Incucyte®, cultivándolas en medio DMEM con alta glucosa, DMEM con galactosa y DMEM con alta glucosa y 0,05  $\mu$ g/ml de EtBr, utilizando este último para someter a las células a un mayor estrés que con la galactosa (el EtBr inhibe la replicación y transcripción mitocondriales), ralentizando así su crecimiento y poniendo de mayor manifiesto sus posibles defectos. Como resultado se obtuvo que los fibroblastos del paciente experimentan un crecimiento similar con respecto al control en DMEM con alta glucosa, pero que éste disminuye al cultivarlas con galactosa y aún más con EtBr ([Figura 4.20A](#)). En segundo lugar, se llevó a cabo una depleción del mtDNA y mtRNA, sometiendo a las células a EtBr (de nuevo a una concentración de 0,05  $\mu$ g/ml) durante 8 días, tiempo tras el que se retiró y se valoró la cinética de repoblación de ambos ácidos nucleicos en los días posteriores. La recuperación del mtDNA es menor en el paciente, mientras que experimenta una mayor transcripción ([Figura 4.20C](#)); ambas observaciones se contradicen con el modelo anti-terminador de la transcripción propuesto por ([Agaronyan et al., 2015](#)), según el que, en ausencia de TEFM, debería promoverse la replicación y no la transcripción. En tercer lugar, se analizó la síntesis de las 13 proteínas codificadas por el mtDNA, de las que pudieron detectarse 11 y se obtuvo que 8 de ellas experimentan un descenso o un comportamiento similar al control ([Figura 4.20B](#)). Finalmente, se valoró la capacidad de consumo de oxígeno ([Figura 4.20D](#)) y los niveles de ATP mitocondrial ([Figura 4.20E](#)), obteniéndose un descenso de ambos. Todos estos

resultados, junto a los de apartados anteriores, llevan a afirmar que el paciente presenta una disfuncionalidad de la fosforilación oxidativa y que su defecto se ve incrementado ante un agente estresante, como el EtBr.



**Figura 4.20.** Análisis de la proliferación de fibroblastos del paciente y su funcionalidad mitocondrial. **(A)** Área ocupada por los fibroblastos C15 y P2 con respecto al tiempo (días) en pocillos de placas de 96 pocillos, crecidos en medio DMEM con alta glucosa, DMEM con galactosa y DMEM con alta glucosa y EtBr (0,05 µg/ml), y partiendo de 1 000 células/pocillo (n = 4; ver [Figura 3.1](#) como ejemplo). Forma parte de la [Figura 4.23F](#). **(B)** Síntesis de 11 de las 13 proteínas codificadas por el mtDNA (no se pudieron distinguir correctamente ND4 ni ATP6) en C15 y P2 (n = 1). Orden de mayor a menor síntesis: ND1 > ND5 > ND4L > COI > ND3 > COII > COIII > ND6 > ND2 > ATP8 > CYB (subrayadas en las que existe un descenso o un comportamiento similar al control). La intensidad promedio en el paciente disminuye un 7,7 % con respecto al control. **(C)** Depleción del mtDNA y de los transcritos totales de los genes *MT-RNR1* (codifica para el rRNA 12S), *MT-ATP6*, *MT-ND6* y *MT-CYB* con 0,05 µg/ml de EtBr durante 8 días y su cinética de repoblación tras 20 días post-tratamiento, todo ello cuantificado por qPCR. Los datos de mtDNA se

relativizaron con respecto al nDNA, mientras que para los transcritos se usó el 18S rRNA como *housekeeping* (n = 3). **(D)** Capacidad de consumo de oxígeno ( $[(\text{fmolO}_2/\text{ml})/\text{min}]/\text{célula}$ ) en C15 y P2, evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN (n = 3). Forma parte de la [Figura 4.23G](#). **(E)** Niveles de ATP mitocondrial (tras su síntesis durante la duración del ensayo) por célula viable en C1 y P2 (n = 6). En **(A)**, **(C)**, **(D)** y **(E)** se representa la media de los valores obtenidos y su desviación estándar. En todos los casos, los datos se muestran en porcentaje (%) con respecto a cada control: C15 en **(A)** (crecimiento en glucosa), **(B)** (línea verde; 100 %) y **(D)**; C1 en **(C)** y **(E)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos los casos en que p-valor <0,05 (\*) o <0,005 (\*\*) (comparando con el respectivo control de cada ensayo). Con el mismo test, en **(A)** también se analizó la significación en P2 (galactosa) con respecto a C15 (galactosa) y en P2 (EtBr) con respecto a C15 (EtBr), obteniéndose una diferencia significativa (#) si p-valor <0,05.

#### 4.2.9 Ensayo de complementación: sobreexpresión de TEFM, POLRMT y TEFM<sup>mut</sup>

##### 4.2.9.1 Sobreexpresión de TEFM

Con objeto de confirmar que la etiología de la patología del paciente reside en la mutación p.Q346\* de TEFM, se llevó a cabo la sobreexpresión del gen codificante mediante la transducción con partículas virales de fibroblastos control (C15; C1<sub>i</sub>) y del paciente (P2) para tratar de revertir el fenotipo patológico. Sin embargo, los primeros resultados (no ofrecidos) revelaron un efecto inesperado: sobreexpresar *TEFM* no sólo no revertía el fenotipo en los modelos celulares, sino que los perjudicaba. Para asegurar que esto no se debía a una sobreexpresión demasiado elevada, se llevó a cabo la transducción de los modelos ya citados con una dosis baja de partículas virales (3  $\mu\text{l}$ ) y con una alta (50  $\mu\text{l}$ )<sup>240</sup>. La distinta sobreexpresión se confirmó por qPCR ([Figura 4.21A](#)) y se analizó su efecto sobre varios transcritos mitocondriales por qPCR ([Figura 4.21B](#))<sup>241</sup>, subunidades OXPHOS por *Western blot* ([Figura 4.21C](#)) y niveles y ensamblaje de los distintos complejos OXPHOS mediante BN-PAGE ([Figura 4.21D](#)). En todos los casos se observó el mismo resultado: tanto en los fibroblastos control utilizados (C1<sub>i</sub>) como en los del paciente se produce un drástico descenso de las moléculas de estudio con independencia de la dosis utilizada<sup>242</sup>, lo que lleva a la conclusión de que sobreexpresar *TEFM* es tóxico para los fibroblastos<sup>243</sup>. Finalmente, se evaluó con mayor detalle el efecto sobre la transcripción, estudiando los niveles del 7S RNA ([Figura 4.21E](#)) y la extensión de los *primers R-loop* ([Figura 4.21F](#)), necesarios estos últimos para la replicación; todo ello comparado con los fibroblastos control (C15). Como resultado se obtuvo que el 7S RNA se encuentra disminuido al sobreexpresar *TEFM* y que la longitud de los *primers R-loop* es menor<sup>244</sup>. Esta observación resulta especialmente reveladora, ya que, como ya señalan (S. Jiang et al., 2019), implica que

<sup>240</sup> Las partículas virales procedieron de un mismo criotubo, previamente homogeneizado (no se titularon). Los nuevos modelos celulares se generaron a la vez.

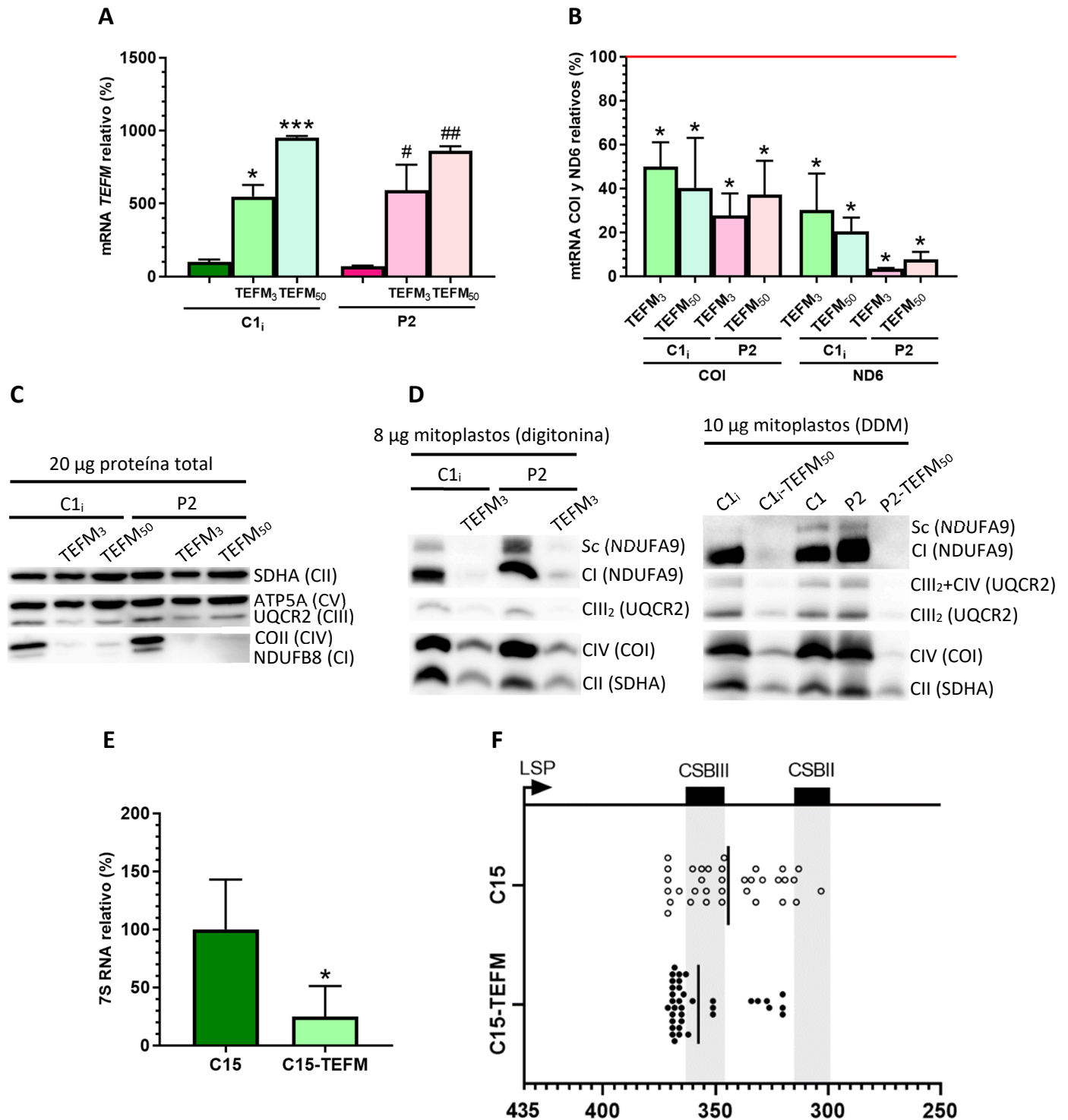
<sup>241</sup> También se evaluaron los niveles de los transcritos totales de *ATP6* y *CYB* en C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM (en concreto, en los modelos generados con 3  $\mu\text{l}$  de partículas virales). Se observó una caída drástica de los mismos (datos no ofrecidos).

<sup>242</sup> Debido a ello, para C15-TEFM, generado posteriormente, se usó una dosis baja de partículas virales.

<sup>243</sup> Esta conclusión se ve abalada tanto por los resultados del presente apartado como por los del 4.2.9.3.

<sup>244</sup> En este resultado no se detecta al 7S RNA (que llegaría hasta CSBI) puesto que las polimerasas se sueltan cuando hay muchas adeninas o timinas seguidas. Por tanto, al hacer el cDNA a partir del *anti-linker* (oligonucleótido complementario al *linker*; [Tabla 3.19](#)) se espera que los transcritos maduros poliadenilados, como el 7S RNA, no se retrotranscriban.

TEFM no es sólo un regulador de la transición entre la replicación y la transcripción mitocondrial, sino que su función es más compleja.



**Figura 4.21.** Análisis de la sobreexpresión de *TEFM* en fibroblastos por complementación genética. **(A)** Confirmación por qPCR de la sobreexpresión de *TEFM* en C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM, modelos generados utilizando diferentes dosis de partículas virales: dosis baja (3 µl) y alta (50 µl), indicadas con un subíndice (n = 2; cada n medida por duplicado técnico). **(B)** Niveles de los transcritos totales (maduros y policistrónicos sin procesar) de *COI* y *ND6* analizados por qPCR en C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM, con dosis baja y alta de partículas virales (n = 3; cada n medida por duplicado técnico). **(C)** Cantidad de diversas subunidades de los complejos OXPHOS (SDHA y las reconocidas por el cóctel comercial de anticuerpos

contra OXPHOS (Tabla 3.42), con la excepción de la SDHB<sup>245</sup> (subunidad del CII) detectadas en los fibroblastos C1<sub>i</sub>, P2, C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM (estos dos últimas con dosis baja y alta de partículas virales) y utilizando la SDHA como control de carga. **(D)** Niveles de los complejos y supercomplejos<sup>246</sup> del sistema OXPHOS analizados por BN-PAGE (1D) con la SDHA y el cóctel comercial de anticuerpos contra OXPHOS en diferentes muestras: con digitonina (1 % final) en C1<sub>i</sub>, P2, C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM (estos dos últimos con dosis baja de partículas virales); con DDM (1 % final) en C1, C1<sub>i</sub>, P2, C1<sub>i</sub>-TEFM y P2-TEFM (estos dos últimos con dosis alta de partículas virales). Los niveles del CII, detectados con el anticuerpo contra SDHA, se utilizaron como estándar interno. **(E)** Nivel del 7S RNA evaluado por qPCR en C15 y C15-TEFM, empleando la actina como *housekeeping* (n = 3; cada n medida por triplicado técnico). **(F)** Mapeo del 3' terminal de los *primers R-loop* en C15 (circunferencias con el perímetro en negro; 34 secuencias) y C15-TEFM (círculos negros; 36 secuencias) por 3'-RACE, con un *primer forward* de 30 nucleótidos (su 5' comienza 3 nucleótidos *downstream* del inicio de la transcripción de LSP, es decir, en el nucleótido 404). En el eje de abscisas se muestran las pb del mtDNA (cadena ligera 3'→5') y aparecen representados CSBIII y CSBII con su extensión, así como la longitud media de los transcritos (rectas verticales). En **(A)** y **(B)** y **(E)** se representan en porcentaje (%) la media y desviación estándar de los datos relativizados con respecto a la media de los valores del control: C1<sub>i</sub> en **(A)** y **(B)**; C15 en **(E)**. En **(A)** la significación estadística de las muestras C1<sub>i</sub> se evaluó por un lado y la de las P2 por otro, ambas con el test *t* de Student no pareado. Los resultados significativos fueron: \* (p-valor < 0,05) y \*\*\* (p-valor < 0,0005) con respecto a C1<sub>i</sub>; # (p-valor < 0,05) y ## (p-valor < 0,005) comparando con P2. En **(B)** y **(E)** la significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor < 0,05 (comparando con C1<sub>i</sub> en **(B)** o con C15 en **(E)**).

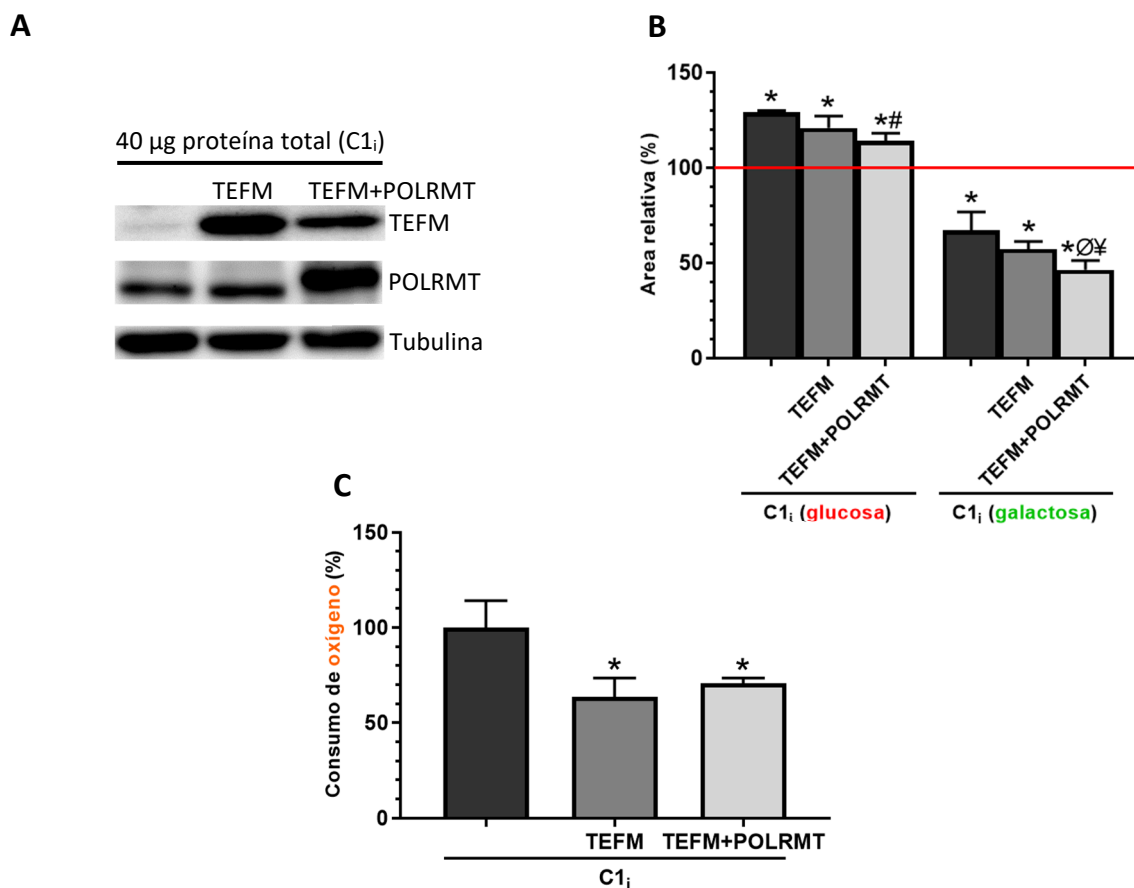
#### 4.2.9.2 Sobreexpresión de *TEFM* y *POLRMT*

*POLRMT* y *TEFM* se encuentran asociados funcionalmente, tal y como se ha indicado en apartados anteriores, y en el paciente presentan niveles similares (Figura 4.19). Además, como se muestra en diferentes resultados del apartado 4.1 y se discute en el 5.1, el fenotipo patológico de los fibroblastos se suaviza al inmortalizarlos. En consecuencia, pensamos que podrían resistir mejor el efecto tóxico de sobreexpresar *TEFM*: sobreexpresamos primero *TEFM* en fibroblastos inmortalizados (transducidos con una dosis baja de partículas virales), y posteriormente, *POLRMT* en los mismos, esto último con objeto de determinar si la doble sobreexpresión podría revertir el fenotipo patológico de sobreexpresar exclusivamente *TEFM*. La sobreexpresión de ambas proteínas se confirmó por *Western blot* (Figura 4.22A) y se estudiaron los tiempos de duplicación de los modelos generados en medio DMEM de mantenimiento con alta glucosa y en medio DMEM con galactosa. También se evaluó la capacidad de consumo de oxígeno basal. Todos los modelos celulares presentan un mayor crecimiento en glucosa en comparación con fibroblastos no inmortalizados, pero experimentan un gran descenso en su proliferación al cultivarlas en medio con galactosa (Figura 4.22B). Esto afianza la idea propuesta en la discusión del apartado 5.1 de que los fibroblastos inmortalizados adquieran un carácter más glucolítico y menos dependiente del sistema OXPHOS (Heiden et al., 2009). Además, la doble sobreexpresión provoca un menor tiempo de duplicación con respecto al de los fibroblastos inmortalizados sin transducir en glucosa, así como con respecto a este mismo modelo y a los fibroblastos que sólo sobreexpresan *TEFM* en galactosa (Figura 4.22B). Por su parte, los fibroblastos en que se

<sup>245</sup> No se ofrece el resultado de esta subunidad por obtenerse una banda muy tenue para todas las líneas de estudio y, sobre todo, por haber detectado posteriormente la SDHA, también del CII.

<sup>246</sup> La banda de supercomplejos puede corresponderse tanto a I+III<sub>2</sub> como al respirasoma. El hecho de que sólo hayamos detectado una banda puede deberse tanto a la resolución del gel, al hecho de partir de muestras humanas y/o a la cantidad de digitonina empleada (Letts & Sazanov, 2017).

sobreexpresó *TEFM* junto a *POLRMT* sufren una menor capacidad de consumo de oxígeno con respecto al control sin transducir y similar al modelo en que sólo se sobreexpresó *TEFM* (Figura 4.22C)<sup>247</sup>. Los resultados de la proliferación y del análisis de las respiraciones basales nos llevan a concluir que la sobreexpresión de *POLRMT*, junto a la de *TEFM*, no revierte el fenotipo patológico de sobreexpresar *TEFM*.



**Figura 4.22.** Efecto de la doble sobreexpresión de *TEFM* y *POLRMT* sobre fibroblastos immortalizados. **(A)** Cantidad de las proteínas *TEFM* y *POLRMT* en C<sub>1i</sub>, C<sub>1i</sub>-*TEFM* y C<sub>1i</sub>-*TEFM*+*POLRMT*, detectadas por *Western blot* con un gel separador del 8 %. Los anticuerpos se añadieron secuencialmente y la tubulina se empleó como control de carga. **(B)** Área ocupada por los fibroblastos C<sub>1i</sub>, C<sub>1i</sub>-*TEFM* y C<sub>1i</sub>-*TEFM*+*POLRMT* con respecto al tiempo (días) en pocillos de placas de 96 pocillos, crecidos en medio DMEM con alta glucosa o con galactosa y partiendo de 1 000 células/pocillo (n = 4). **(C)** Capacidad de consumo de oxígeno ([fmoO<sub>2</sub>/ml]/min)/célula en C<sub>1i</sub>, C<sub>1i</sub>-*TEFM* y C<sub>1i</sub>-*TEFM*+*POLRMT*, evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN (n = 3). En **(B)** y **(C)** se representa en porcentaje (%) la media y desviación estándar de los datos obtenidos para cada modelo celular, relativizados con respecto a cada control: C<sub>15</sub> en **(B)** (línea roja; 100 %) y C<sub>1i</sub> en **(C)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con C<sub>15</sub> en **(B)** y C<sub>1i</sub> en **(C)**). En **(B)**, además, se valoraron las diferencias significativas de los resultados obtenidos en glucosa entre sí, por un lado, y de los observados en galactosa entre sí, por otro. Se empleó el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos los casos en que p-valor < 0,05: # (comparando con C<sub>1i</sub> en glucosa), ∅ (comparando con C<sub>1i</sub> en galactosa) y ¥ (comparando con C<sub>1i</sub>-*TEFM* en galactosa).

<sup>247</sup> En los resultados de dicha figura vuelve a observarse que sobreexpresar *TEFM* es tóxico para los fibroblastos.



#### 4.2.9.3 Sobreexpresión de *TEFM* con la mutación del paciente<sup>248</sup>

La sobreexpresión de *TEFM* con la mutación p.Q346\* tuvo lugar en varios pasos: se llevó a cabo una mutagénesis dirigida de la CDS del gen *TEFM* clonada en el vector pCR™4Blunt-TOPO®; el inserto obtenido se extrajo de dicho vector y se clonó en uno lentiviral; se generaron partículas virales con las que transducir fibroblastos C15. La presencia de la mutación se confirmó por secuenciación de Sanger (Figura 4.23A) y el aumento en la cantidad del transcrito y de la proteína de *TEFM* mutados se comprobó por qPCR y *Western blot*, respectivamente (Figuras 4.23A y 4.23B). En este último destaca en C15-*TEFM*<sup>mut</sup> la presencia de una banda inferior a la de *TEFM wild-type*, ausente en otros modelos celulares y correspondiente a la proteína mutada (carece de los residuos Q346-P360 y, por tanto, le faltan en torno a 2 kDa teóricos). En C15-*TEFM*<sup>mut</sup> esta banda es más intensa que la de su *TEFM wild-type*, pero menos que la de la proteína *wild-type* en C15-*TEFM*<sup>249</sup>. Esto sugiere que, a pesar de la sobreexpresión, la mutación provoca la degradación de *TEFM*, observación que coincide con que los niveles de esta proteína en los fibroblastos del paciente sean menores que en el control (Figura 4.16B) y que en dichas células tampoco fuéramos capaces de detectar la banda de *TEFM* mutada al cargar una mayor cantidad de proteína total (Figura 4.23B). Cabe destacar que al sobreexpresar la proteína mutada en los fibroblastos C1, se obtuvo el mismo patrón de bandas que en C15-*TEFM*<sup>mut</sup> (Figura 4.23B), así como al sobreexpresarla en la línea SH-SY5Y (Figura 4.24B; blot 3).

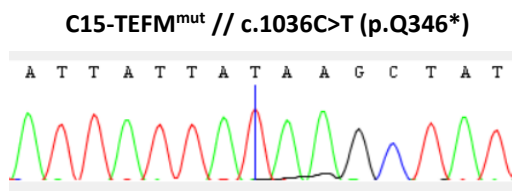
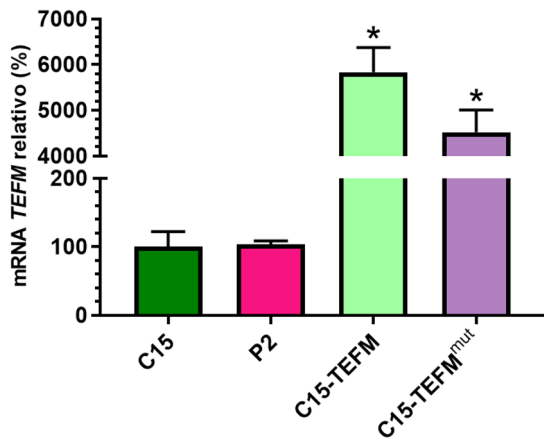
Posteriormente, se llevaron a cabo diferentes ensayos para investigar el fenotipo del modelo celular generado, comparándolo con los fibroblastos C15, P2 y C15-*TEFM*. En particular, primero se analizó el número de copias del mtDNA y los niveles de 7S DNA, obteniendo que sobreexpresar *TEFM* con la mutación p.Q346\* genera un efecto opuesto sobre la replicación a *TEFM wild-type*: la replicación se ve drásticamente disminuida al sobreexpresar *TEFM wild-type* (Figura 4.23C), mientras que aumenta si se sobreexpresa *TEFM* mutado, resultados que se ven abalados por el comportamiento inverso de sus sendos niveles del 7S DNA (Figura 4.23D). Posteriormente, se cuantificaron diversas proteínas implicadas en la replicación del nDNA, en el metabolismo del mtRNA (transcripción y degradación) y de subunidades del sistema OXPHOS (codificadas en el nDNA y mtDNA). Tanto C15-*TEFM* como C15-*TEFM*<sup>mut</sup> presentan una alteración generalizada de todas las proteínas analizadas, si bien su diferencia con respecto a C15 suele ser mayor en C15-*TEFM* (Figuras 4.23E). A continuación, se valoró el tiempo de duplicación de las células en medio DMEM con alta glucosa, DMEM con galactosa y DMEM con alta glucosa y 0,05 µg/ml de EtBr: los fibroblastos con sobreexpresión de *TEFM wild-type* y *TEFM* mutado experimentan una menor proliferación en DMEM con alta glucosa, más acentuada para *TEFM wild-type* en DMEM con galactosa y para *TEFM* mutado en DMEM con EtBr (siendo el crecimiento de esta última similar al de P2 en dicho medio de cultivo) (Figura 4.23F). Finalmente, se midió la capacidad de consumo de oxígeno, que disminuye en las C15-*TEFM*<sup>mut</sup>, aunque no significativamente ni de forma tan drástica como en C15-*TEFM* (Figura 4.23G). Todos estos resultados permiten concluir que la sobreexpresión de *TEFM* con la mutación p.Q346\* también

<sup>248</sup> En adelante *TEFM* mutado.

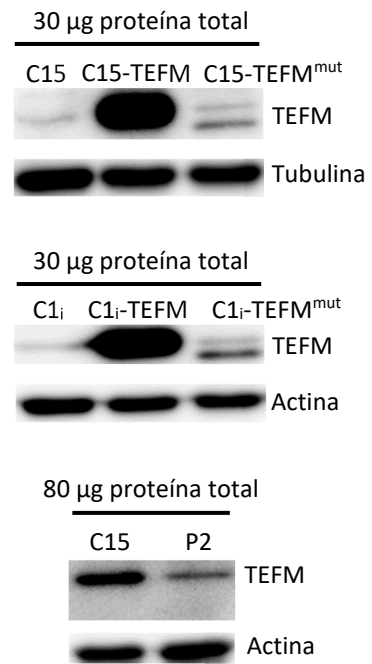
<sup>249</sup> También es menor a la intensidad de banda obtenida en otros modelos de la presente memoria que sobreexpresan una determinada proteína de interés. Por ejemplo, la sobreexpresión de POLRMT en C15-*TEFM*+POLRMT (Figura 4.22A) y de POLG en las SH-SY5Y-POLG y SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup> (Figura 4.24B; blot 2).

altera la fisiología de los fibroblastos, pero que su efecto es menos perjudicial que la sobreexpresión de la proteína *wild-type* y que, en general, se asemeja más a la del paciente.

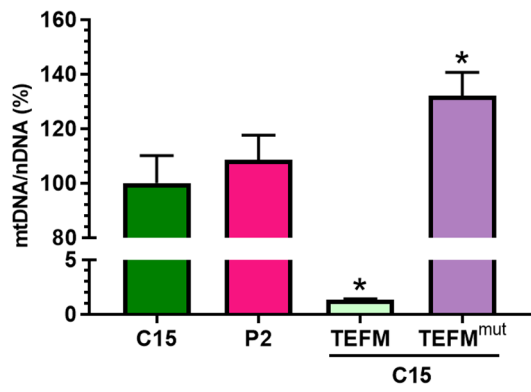
**A**



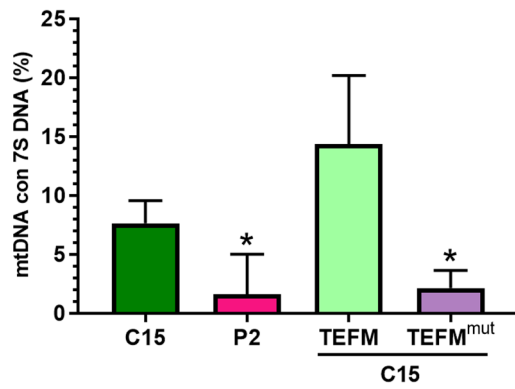
**B**



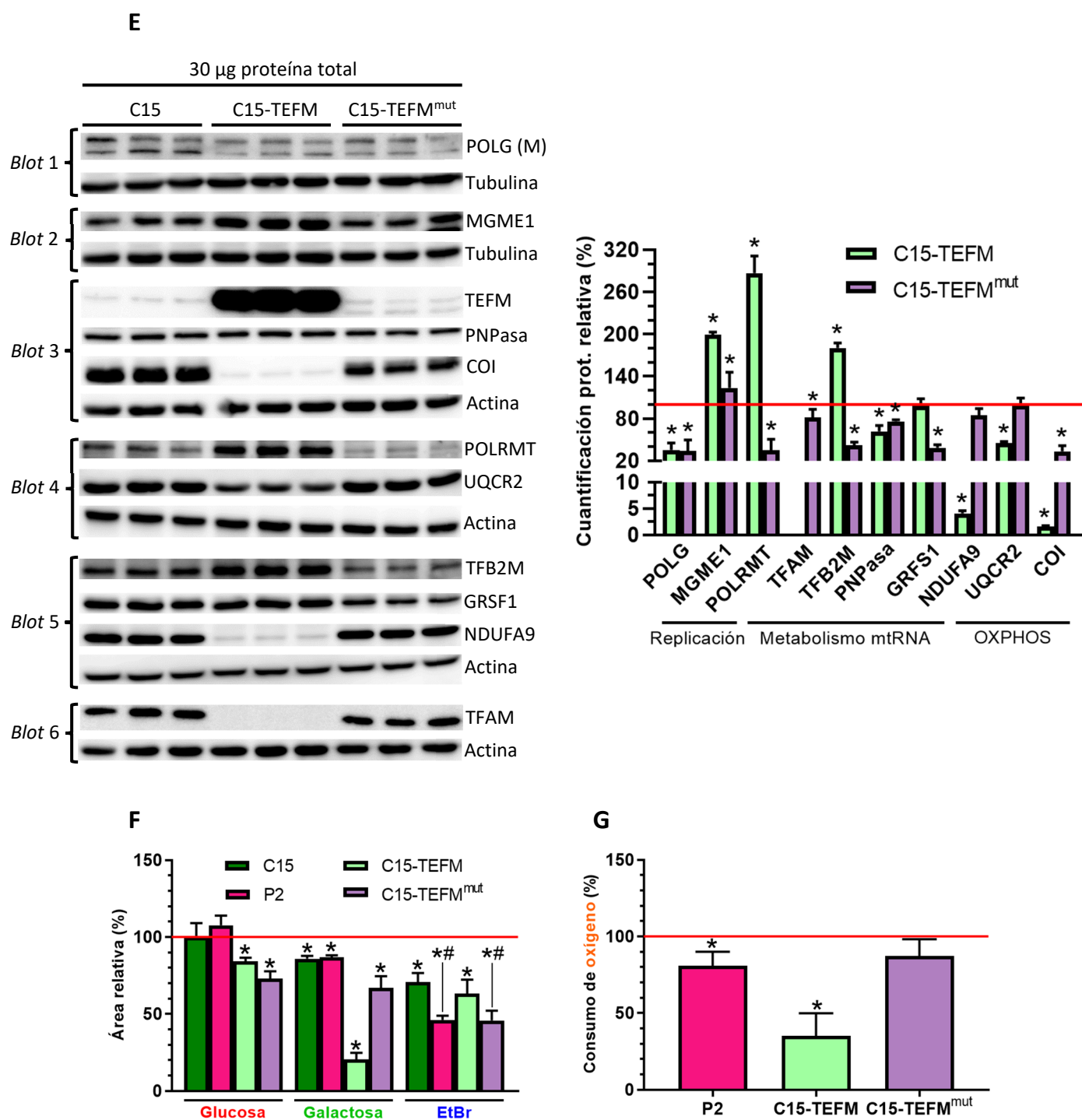
**C**



**D**







**Figura 4.23.** Estudio de la sobreexpresión de *TEFM* con la mutación p.Q436\* en fibroblastos por complementación genética (y ampliación del análisis de la sobreexpresión de *TEFM* *wild-type*, iniciado en la [Figura 4.21](#)). **(A)** Nivel del mRNA de *TEFM* detectado por qPCR de C15, P2, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup>, en que se empleó la actina como *housekeeping* (n = 3; cada n medida por triplicado técnico). Se ofrece, además, un fragmento del electroferograma de *TEFM* de C15-TEFM<sup>mut</sup>, en que aparece una timina en la posición 1 036 de la CDS (línea vertical azul); la base nitrogenada *wild-type* en esa localización es la citosina ([Figura 4.14](#)). **(B)** Cantidad de la proteína TEFM en C15, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup>, obtenida por *Western blot* y utilizando la tubulina como control de carga. En C15-TEFM<sup>mut</sup> aparecen dos bandas, siendo la inferior la proteína mutada. El mismo patrón de bandas se obtiene al analizar los niveles de TEFM en C1<sub>i</sub>, C1<sub>i</sub>-TEFM y C1<sub>i</sub>-TEFM<sup>mut</sup> por *Western blot*, usando la actina como control de carga. Finalmente, se ofrece la imagen

de un *Western blot* del TEFM de C15 y P2, en que se cargó una mayor cantidad de proteína total que en la [Figura 4.16B](#) (80  $\mu$ g frente a 30  $\mu$ g). La actina se utilizó como control de la carga. **(C)** Cuantificación del número de copias del mtDNA de C15, P2, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup> por qPCR, normalizando los valores con respecto al nDNA ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). **(D)** Cuantificación por qPCR de las copias de mtDNA que presentan 7S DNA de C15, P2, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup>, normalizando los datos con respecto al 7S DNA y teniendo en cuenta la situación en que no hay ninguna copia del 7S DNA y  $\Delta C_T = 0$  ( $n = 3$ ; cada  $n$  medida por triplicado técnico). **(E)** Cuantificación por *Western blot* de diversas proteínas relacionadas con la replicación<sup>250</sup> y la transcripción mitocondrial, así como subunidades del sistema OXPHOS, en C15, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup>. En cada uno de los *blots* se empleó una cantidad de proteína total y un gel separador diferentes: *blot* 1 con 50  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 8 %; *blot* 2 con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 8 %; *blot* 3 con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 10 %; *blot* 4 con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 8 %; *blot* 5 con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 10 %; *blot* 6 con 30  $\mu$ g de proteína total y gel separador del 12,5 %. En todos los *blots* los anticuerpos se añadieron de forma secuencial (la (M) de POLG es de monoclonal; [Tabla 3.42](#)) y se empleó la actina como control de carga, excepto en los *blots* 1 y 2, en que se usó la tubulina en su lugar. **(F)** Área ocupada por los fibroblastos C15, P2, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup> con respecto al tiempo (días) en pocillos de placas de 96 pocillos, crecidos en medio DMEM con alta glucosa, DMEM con galactosa y DMEM con alta glucosa y EtBr (0,05  $\mu$ g/ml), y partiendo de 1 000 células/pocillo ( $n = 4$ ; ver [Figura 3.1](#) como ejemplo). **(G)** Capacidad de consumo de oxígeno ( $[(\text{fmolO}_2/\text{ml})/\text{min}]/\text{célula}$ ) en C15, P2, C15-TEFM y C15-TEFM<sup>mut</sup> evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN ( $n = 3$ ). En todas las gráficas se representa la media de los valores obtenidos y su desviación estándar en porcentaje (%), datos relativizados con respecto a la media de los valores de C15 (línea roja en **(E)**, **(F)** y **(G)**; 100 %), siendo C15 en glucosa en **(F)**. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos los casos en que  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con el respectivo control de cada ensayo). Con el mismo test, en **(F)** también se analizó la significación con respecto a C15 en EtBr, marcándose como significativos (#) los resultados con  $p$ -valor  $< 0,05$ .

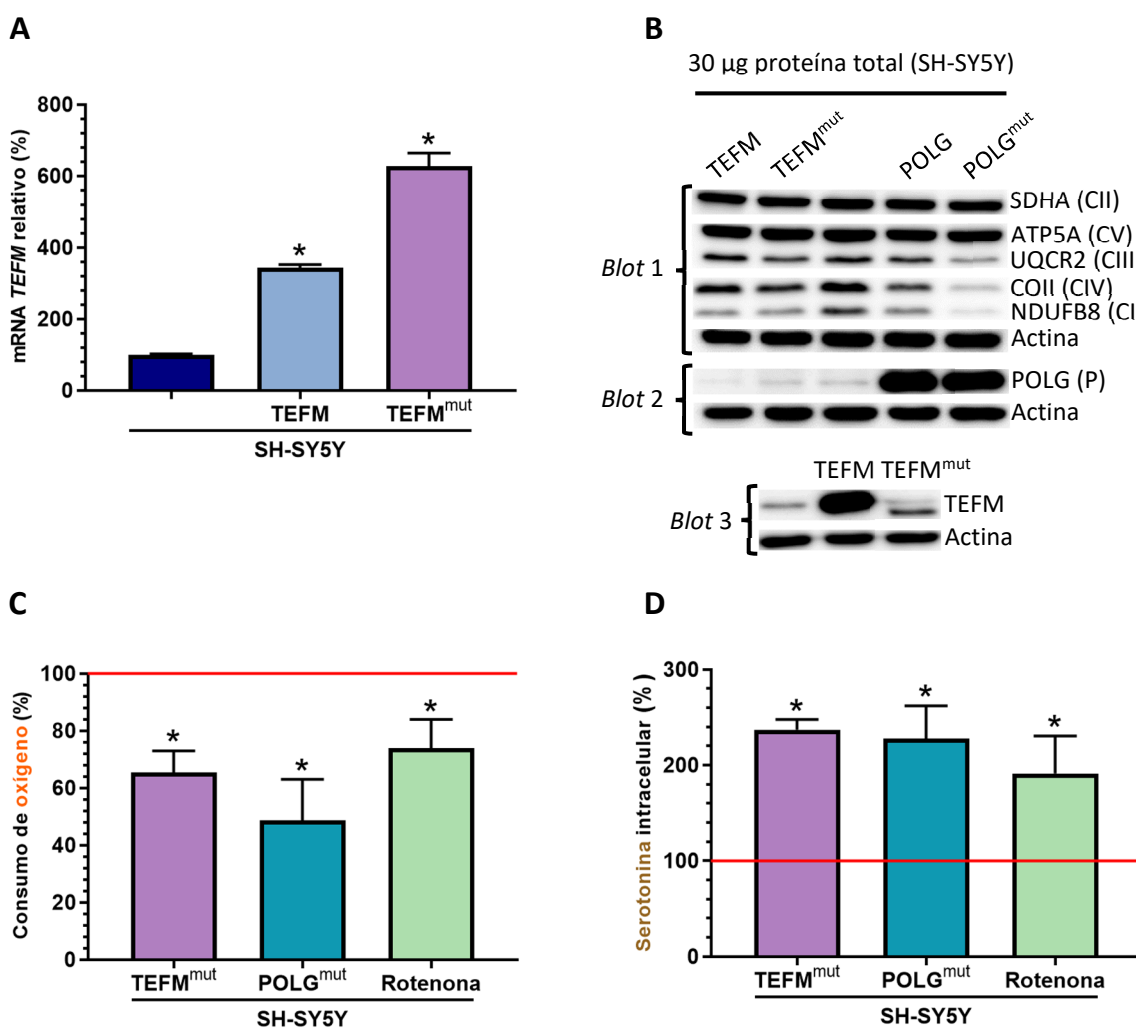
#### 4.2.10 Efecto de la funcionalidad de OXPHOS sobre los niveles de serotonina

Dado que, como se señala en el apartado 2.1, el mayor signo del paciente es un gran descenso de los niveles del 5-HIAA (producto de degradación de la serotonina; detectado a partir de un estudio del LCR), que mejora sus síntomas al administrarle 5-hidroxitriptófano (precursor de la serotonina<sup>251</sup>) y que presenta una variante *de novo* en *TEFM*, se decidió investigar la existencia de una posible relación entre la funcionalidad mitocondrial y, en particular, del sistema OXPHOS y los niveles de serotonina. Para ello, se emplearon células SH-SY5Y por ser un modelo más próximo a las neuronas serotoninérgicas que los fibroblastos, así como por su capacidad para sintetizar serotonina de manera endógena ([de la Fuente et al., 2017](#); [Tajeddinn et al., 2015](#)) y por tener receptores de serotonina en sus mitocondrias ([Tempio et al., 2020](#)). Además, se generó la línea SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup> (sobrexprende el gen *TEFM* con la mutación *de novo* del paciente, obtenido previamente por mutagénesis dirigida) mediante su transducción con partículas virales. La creación de esta línea se llevó a cabo por haber demostrado en el apartado anterior que la sobreexpresión de *TEFM* mutado en fibroblastos origina un fenotipo más similar al de las células del paciente que la sobreexpresión de *TEFM wild-type*. La sobreexpresión de *TEFM* mutado se confirmó por qPCR ([Figura 4.24A](#)) y *Western blot* ([Figura 4.24B](#); *blot* 3) y se

<sup>250</sup> Por tamaño, la banda de POLG debería ser la inferior, pero no se tuvo claro. Se realizaron las cuantificaciones de la banda superior, de la inferior y de la suma de la intensidad de ambas, llegando al mismo resultado en todos los casos. Los datos ofrecidos son los de la suma de ambas intensidades.

<sup>251</sup> Pueden encontrarse rutas sobre el metabolismo de la serotonina en ([Fanciulli et al., 2020](#); [Kroke & Dierkes, 2005](#); [Szeitz & Bandiera, 2018](#)).

llevó a cabo una primera visualización de su efecto sobre OXPPOS, también por *Western blot* (Figura 4.24B; *blot 1*), obteniendo que presenta una menor cantidad de las subunidades UQCR2, COII y NDUFB8. Por otra parte, como control genético de la disfuncionalidad del sistema OXPPOS, se estableció la línea SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup> con la mutación p.Y955C, que causa una disminución severa de la procesividad: la DNA polimerasa mitocondrial que porta esta mutación conserva menos del 1 % de su actividad polimerasa (Stumpf et al., 2013). La confirmación de la sobreexpresión de esta proteína y una primera aproximación sobre su efecto perjudicial en OXPPOS se valoraron de nuevo por *Western blot* (Figura 4.24B; *blot 2* y *blot 1*, respectivamente). La disfuncionalidad del sistema OXPPOS en las líneas SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup>, así como en SH-SY5Y tratadas con rotenona (como control farmacológico), se evaluó mediante la medida de su capacidad de consumo de oxígeno, obteniéndose que es menor en todas ellas con respecto a las SH-SY5Y control (Figura 4.24C). Finalmente, se midieron los niveles de serotonina intracelulares de los tres modelos celulares mediante HPLC y en todos se detectó un cúmulo de la misma (Figura 4.24D). Por tanto, los niveles de esta hormona/neurotransmisor están influidos por la funcionalidad del sistema OXPPOS, hecho que sugiere que mutaciones en *TEFM* podrían alterar los niveles serotoninérgicos.



**Figura 4.24.** Estudio de la funcionalidad del sistema OXPPOS y los niveles de serotonina en distintas líneas SH-SY5Y. **(A)** Nivel del mRNA de *TEFM* (*wild-type* o con la mutación *de novo* del paciente) detectado por qPCR en las líneas SH-SY5Y control, SH-SY5Y-TEFM y SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, en que se empleó la actina como *housekeeping* (n = 3). **(B)** Cantidad de diversas subunidades de los complejos OXPPOS (SDHA y las

reconocidas por el cóctel comercial de anticuerpos contra OXPHOS (Tabla 3.42), con la excepción de la SDHB<sup>252</sup> (subunidad del CII) y POLG, detectadas por *Western blot* (*blot* 1 y *blot* 2, respectivamente) en las líneas SH-SY5Y control, SH-SY5Y-TEFM, SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, SH-SY5Y-POLG y SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup>. También se ofrece la cantidad de la proteína TEFM en las líneas SH-SY5Y control, SH-SY5Y-TEFM y SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup> (*blot* 3). En la línea SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup> se detecta una banda inferior más intensa, correspondiente a la proteína TEFM mutada (tal y como se indica en el apartado 4.2.9.3). En todos los casos los anticuerpos se añadieron secuencialmente (la (P) de POLG es de policlonal; Tabla 3.42) y se empleó la actina como control de carga (en (B) la SDHA también); los *blots* 1 y 3 se obtuvieron mediante un gel separador del 12,5 %, mientras que para el *blot* 2 se usó un gel separador del 8 %. (C) Capacidad de consumo de oxígeno ( $[(\text{fmolO}_2/\text{ml})/\text{min}]/\text{célula}$ ), evaluada con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN en las líneas SH-SY5Y control, SH-SY5Y-TEFM<sup>mut</sup>, SH-SY5Y-POLG<sup>mut</sup> y SH-SY5Y tratadas con 100 nM de rotenona durante 1 hora antes de realizar las medidas (n = 3). (D) Niveles de serotonina intracelular medidos por HPLC a partir de pellets de las mismas líneas celulares que en (C) y normalizados con respecto a la concentración de proteínas totales (n = 3). En (A), (C) y (D) se representa en porcentaje (%) la media y desviación estándar de los datos obtenidos para cada línea celular, relativizados con respecto a las SH-SY5Y control (línea roja en (C) y (D); 100 %). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativos (\*) los casos en que p-valor <0,05 (comparando con las SH-SY5Y control).

---

<sup>252</sup> No se ofrece el resultado de esta subunidad por obtenerse una banda muy tenue para todas las líneas de estudio y, sobre todo, por haber detectado posteriormente la SDHA, también del CII.

## **DISCUSIÓN**

---



## 5.1 PNPasa

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo el estudio patológico de un paciente con las variantes p.A507S y p.K562\* en heterocigosis compuesta en el gen *PNPT1*, codificante para la PNPasa. Se ha demostrado que las variantes son patológicas y causan un fenotipo mitocondrial alterado, en concreto, provocan un descenso en los niveles de la PNPasa, lo que a su vez deriva en: un cúmulo de los mtRNA, consecuencia directa de que la función de la PNPasa de degradar RNA se encuentre comprometida; una alteración transcripcional y proteica de genes que están relacionados con la PNPasa y que participan en el metabolismo de los ácidos nucleicos mitocondriales; en último lugar, y como resultado de todo lo anterior, en una disfuncionalidad del sistema OXPHOS. Además, se ha llevado a cabo un estudio de la localización intramitocondrial de la PNPasa, obteniendo que esta enzima se encuentra en la matriz mitocondrial, así como del nivel transcripcional y proteico de la helicasa SUV3 (junto a la que la PNPasa constituye el degradosoma mitocondrial), siendo muy similares a los de la PNPasa.

Entrando en detalles, la investigación sobre las variantes del paciente se ha realizado tanto *in silico* como, principalmente, mediante diferentes ensayos para analizar el efecto sobre la propia proteína y la funcionalidad mitocondrial. *In silico*, ambas mutaciones se predicen como patológicas, lo que se ve afianzado por los criterios de patogenicidad del ACMG/AMP (Richards et al., 2015) que cumplen: p.A507S es una variante patógena porque, al menos, sigue los criterios PS1 y PS3<sup>253</sup>; p.K562\* es una variante patógena porque sigue el criterio PVS1 y, al menos, PM2 y PM3<sup>254</sup>. Además, la exploración estructural de la PNPasa (Figura 4.2) sugiere que la mutación p.A507S podría afectar a su entorno proteico, pero no directamente al centro activo ni a la trimerización de la proteína (algo no descrito previamente<sup>255</sup>). Esto último se ve reafirmado de nuevo por sólo haber detectado una banda (del mismo tamaño) de la PNPasa en todas las muestras analizadas por BN-PAGE 1D (Figura 4.3D), al contrario que ocurre con otras mutaciones descritas en la literatura<sup>256</sup>. Además, obtenemos que los niveles de mRNA de *PNPT1* y de la cantidad de la PNPasa son menores en el paciente (Figura 4.1, Figuras 4.3A-C y Figura 4.6) y que el homotrímero aumenta al sobreexpresar *PNPT1* (Figura 4.3D), lo que, junto a lo anterior, confirma que la caída de la PNPasa homotrimérica en el paciente (Figura 4.3D) se debe a la menor cantidad de la proteína y no a un defecto en el ensamblaje.

En cuanto a la transcripción mitocondrial, se valoraron los transcritos a diferentes niveles: maduros, policistrónicos sin procesar y totales. El hecho de que se produzca un incremento en los transcritos maduros analizados, pero no de todos ellos (Figura 4.5A), mientras que sí exista un cúmulo generalizado de los policistrones sin madurar y de los transcritos totales

<sup>253</sup> PS1: produce el mismo cambio de aminoácido que una variante descrita con anterioridad, con independencia del cambio de nucleótido; PS3: estudios funcionales *in vitro* *in vivo* apoyan que tiene un efecto dañino en el gen o producto génico (Grochowska et al., 2022).

<sup>254</sup> PVS1: variante sin sentido en un gen en que la pérdida de función es un mecanismo de enfermedad conocido (Grochowska et al., 2022; J. S. Lee et al., 2020); PM2: ausente en bases de datos (no se encuentra en gnomAD); PM3: se detecta en *trans* con una variante descrita como patológica (p.A507S) en una enfermedad recesiva (características que presenta el paciente, como se indica en el apartado 2.1).

<sup>255</sup> Ninguna de las publicaciones de la PNPasa con la mutación p.A507S analiza su efecto sobre la estructura proteica (Dhir et al., 2018; Pennisi et al., 2022; Rius et al., 2019; Slavotinek et al., 2015).

<sup>256</sup> La mutación p.E475G provoca el desplazamiento de la banda del homotrímero a la de la proteína monomérica, que aumenta (Figuras 5C y 5D de (von Ameln et al., 2012)).

analizados, así como mayor de estos últimos (Figuras 4.5B y 4.5C, respectivamente) nos lleva a afirmar, por un lado, que algunos transcritos con sentido se encuentran alterados por el déficit de la PNPasa, mientras que, sobre todo, se encuentran afectados los ncRNA, tanto antes como posteriormente a ser procesados (se acumulan por un defecto en su degradación). Esto coincide con las observaciones obtenidas por (Borowski et al., 2013), quienes distinguen entre los transcritos de una u otra cadena mediante sondas con *Northern blot* y ven que al silenciar la PNPasa se encuentran más comprometidos los ncRNA, mientras que los transcritos codificantes no se acumulan por igual. Así, consideramos que nuestros resultados pueden deberse a múltiples factores, entre los que caben destacar la propia naturaleza de los RNA y la aparente preferencia de la PNPasa por unos u otros transcritos. En el primer caso, se debe a que cada uno de los mRNA presenta características particulares con respecto al resto, como la vida media, que cambia incluso entre publicaciones para una misma línea celular (Nagao et al., 2008; Piechota et al., 2006). En el segundo caso, la PNPasa citosólica degrada preferentemente al mRNA de *c-myc* frente a otros mRNA como los de la *GAPDH* o *c-jun* (Sarkar et al., 2003), de manera que lo mismo podría estar ocurriendo en las mitocondrias. A esto se suma el hecho de que, aunque las mutaciones en *PNPT1* llevan a un cúmulo de los transcritos policistrónicos no procesados, no en todos los casos aumentan los mismos: utilizando los mismos *primers* que en la presente tesis doctoral (Tabla 3.30), el cúmulo de los transcritos sin madurar que obtienen (Matilainen et al., 2017; Rius et al., 2019) es distinto entre ellos y con respecto al nuestro, incluso entre los pacientes analizados por (Rius et al., 2019), que presentan mutaciones en *PNPT1* diferentes<sup>257</sup>. Valorando exclusivamente nuestros resultados, todo apunta a que en nuestro paciente se encuentran afectados principalmente los transcritos sobre los que más actúa la PNPasa que, en términos generales, parecen ser los que presentan una vida media menor: los ncRNA, que se degradan rápidamente en situación fisiológica (Borowski et al., 2013; Dhir et al., 2018; Grochowska et al., 2022; Pietras et al., 2018a), y los mRNA ND1, ND2, ND3<sup>258</sup>, ND5 y CYB (Nagao et al., 2008). Esto nos lleva a respaldar la propuesta de (Borowski et al., 2013) de que tal vez exista una maquinaria de degradación de los mtRNA, además del propio degradosoma, todavía por descubrir y con especial relevancia para los transcritos con sentido. Además, por lo ya expuesto en la presente discusión y la información ofrecida en el apartado 1.4.3 no consideramos adecuada la conclusión a la que llegan (Matilainen et al., 2017; Rius et al., 2019) de que la PNPasa afecte al procesamiento de los policistrones, al menos, de manera directa, ya que su actividad es la de degradar los RNA y son otras enzimas las involucradas tanto en el procesamiento canónico como no canónico (de este último, hasta donde se conoce). Creemos más apropiado señalar que la PNPasa influye sobre el procesamiento indirectamente (o de forma secundaria), ya que lo que hace es condicionar los niveles de los policistrones disponibles para su utilización en la célula y su procesamiento posterior, de lo que también se encarga SUV3 (Clemente et al., 2015). Finalmente, cabe destacar que en nuestro paciente hay un aumento del valor medio del 7S RNA, lo que coincide con que el degradosoma esté afectado, ya que se ha descrito que este complejo lleva a cabo su degradación (Zhu et al., 2022).

<sup>257</sup> El paciente dos (P2) de (Rius et al., 2019) presenta las mutaciones en heterocigosis compuesta p.A507S y p.V607Lysfs\*21 y, por tanto, sería al más parecido al nuestro. Aun así, el perfil de acumulación de sus transcritos sin madurar (Figura 5 del artículo) difiere con respecto al de nuestro paciente (Figura 4.5B).

<sup>258</sup> De este transcrito nosotros no detectamos cúmulo (Figura 4.5A).



En relación con la transcripción, también resultan relevantes de mencionar los resultados obtenidos por la RNA-seq para los genes del nDNA en los fibroblastos del paciente. Dentro de los genes con diferencias estadísticamente significativas, existe un comportamiento generalizado de haber más mRNA que aumentan sus niveles de los que disminuyen en las 16 funciones mitocondriales analizadas (datos disponibles en el anexo 8.11), lo que coincide con los datos obtenidos del panel virtual con 53 genes nucleares elaborado. Centrándonos en éste, la caída de *MTERF1* sugiere una menor síntesis de los rRNA 12S y 16S y, en su lugar, mayor transcripción del resto de genes para su posterior traducción (Kruse et al., 1989; Martin et al., 2005; Montoya et al., 2006). Además, parece haber una promoción de la traducción mitocondrial por parte de genes relacionados con la misma: el aumento de *NSUN4*, *MRPL12* y *DDX28* implica una mayor formación de los mitorribosomas (Cámara et al., 2011; Serre et al., 2013; Tu & Barrientos, 2015); los mayores niveles de *TRNT1* y de *THGL1* se encuentran directamente relacionados con un incremento en las modificaciones post-transcripcionales de los tRNA (Jedynak-Slyvka et al., 2021). Esto último, junto al aumento de *MTPAP* (que también podría estar relacionado con una mayor poliadenilación de los mRNA) y de *TRUB2* (que se espera que aumente su pseudouridinilación (Jedynak-Slyvka et al., 2021)), sugiere que también existe un incremento de las modificaciones post-transcripcionales de los mtRNA, en general. Por otra parte, detectamos un incremento en *POLG* y *mtSSB*, ambas proteínas relacionadas con la replicación del mtDNA (Figura 1.7) y que, por tanto, pueden ser las responsables del mayor número de copias del mtDNA que detectamos en el paciente<sup>259</sup> (Figura 4.4A). Esto coincide con los niveles de *MTERF1*, ya que dicho factor también se ha descrito como una contrahelicasa, es decir, que puede actuar bloqueando el desenrollamiento TWINKLE (Shi et al., 2016), de manera que el descenso de *MTERF1* que observamos también podría estar relacionado con una mayor promoción de la replicación. Otros transcritos que también se encuentran alterados son *GRSF1*, *REXO2* y el ya mencionado *MTPAP*, genes implicados en la degradación de los ncRNA, por lo que su aumento puede interpretarse como una consecuencia directa con la que los fibroblastos del paciente tratan de disminuir el cúmulo de los RNA antisentido: en ausencia de *MTPAP* se produce un aumento de los RNA antisentido y dsRNA (Pajak et al., 2019); *GRSF1* reconoce a los ncRNA y participa en la degradación de los dsRNA (Antonicka et al., 2013; Falabella et al., 2019; Pietras et al., 2018a), así como en el procesamiento de los transcritos (Jourdain et al., 2013); *REXO2* contribuye a mantener bajos los niveles de los RNA antisentido y al silenciarlo se produce un cúmulo de dsRNA, que afecta negativamente al degradosoma (Szewczyk et al., 2020). En este sentido, se ha detectado también un aumento en los niveles de los transcritos de genes de respuesta a interferón (*IFI44L*, *IFIT1* e *ISG15*), lo que podría significar que el paciente también experimenta la ruta que relaciona mutaciones en la PNPasa con la respuesta inmune, ya descrita en el apartado 1.4.4.3. No obstante, los fibroblastos no son un buen modelo para analizarla (Pennisi et al., 2022; Rius et al., 2019; van Esveld et al., 2022), sino que, en su lugar, debería seguir estudiándose en muestras de sangre (Bamborschke et al., 2021; Dhir et al., 2018; Pennisi et al., 2022; Rius et al., 2019). Esto último se ve reafirmado por el hecho de que en el paciente con la mutación *de novo* en *TEFM* también se encuentran alterados de forma significativa estos genes (junto a *IFI27*; Figura 4.18C), así como entre los controles C3 y C15 (ver panel presente en el anexo 8.10). Finalmente, observamos un descenso de *PNPT1* (coincidente con los resultados

<sup>259</sup> Tuvimos la sospecha de que este aumento fuera el causante del cúmulo de los mtRNA detectados en el paciente y no directamente las mutaciones de la PNPasa, pero el ensayo de complementación genética realizado anula esta hipótesis (Figura 4.10).

obtenidos por qPCR; [Figura 4.3A](#)) y un aumento de *SUPV3L1* (*SUV3*) y de *LONP1*. El incremento de *SUV3*, aunque no llegamos a detectarlo por qPCR ([Figura 4.11A](#)), podría ser un mecanismo compensatorio que se ve regulado posteriormente para tratar de igualar los niveles de la PNPasa y *SUV3* ([Figuras 4.11B](#) y [4.11C](#)). Precisamente, el aumento de *LONP1*, codificante para la proteasa mitocondrial Lon, podría estar relacionado con ello, así como con la mayor degradación proteica obtenida de la PNPasa en los fibroblastos del paciente ([Figuras 4.3B](#) y [4.3C](#)).

Además de todos los genes anteriores, es importante señalar que no detectamos diferencias estadísticamente significativas para *POLRMT* y *TEFM* (anexo 8.10), pero sí a nivel proteico ([Figura 4.7A](#)). En particular, observamos un descenso de *POLRMT* en los fibroblastos del paciente, que podría deberse a un mecanismo compensatorio post-transcripcional para tratar de reducir la transcripción y, por tanto, el cúmulo de los mtRNA en el paciente; vemos un aumento de *TEFM*, que, además, se incrementa más al estresar las células con genética ([Figura 4.7B](#)). Este comportamiento de *TEFM* puede deberse a diferentes causas ([S. Jiang et al., 2019](#)): se ha visto que *TEFM* no sólo es importante para la elongación de la transcripción, sino también para la formación de los *primers R-loop* para la replicación, por lo que su aumento podría producirse para promover la replicación; tratar de revertir el cúmulo de ncRNA y de transcritos policistrónicos, ya que se ha detectado que la inactivación de *TEFM* lleva a un aumento de ambos mtRNA (se ha propuesto que en este hecho podría estar implicada su interacción con diversos factores post-transcripcionales, entre ellos la PNPasa). Todo ello, junto a nuestros resultados, nos lleva a proponer a *TEFM* no tanto como una proteína anti-terminadora, sino como un sensor del metabolismo del mtDNA y mtRNA<sup>260</sup>.

En otro ámbito, y con respecto a su crecimiento, los fibroblastos del paciente presentan una proliferación menor que el control ([Figura 4.9A](#)), lo que ya ha sido descrito al disminuir los niveles de la PNPasa por silenciamiento ([Slomovic & Schuster, 2008](#)). Sin embargo, la complementación genética de *PNPT1* no revertió este fenotipo en los fibroblastos primarios del paciente, sino que lo agravó, llevando a las células a la senescencia<sup>261</sup>. Esta experiencia también ha sido obtenida por otros autores, que han visto que la sobreexpresión de *PNPT1* conduce a una inhibición del crecimiento (y apoptosis) ([Sarkar et al., 2003](#); [van Maerken et al., 2009](#)) que, a su vez, se debe a la degradación específica de la PNPasa sobre el mRNA de *c-myc* ([Sarkar et al., 2003, 2006](#)) y el miR-221 ([Das et al., 2010](#)). Precisamente, la relación entre estos dos transcritos y los niveles de la PNPasa también la hemos obtenido en el panel virtual de 53 genes del transcriptoma de los fibroblastos del paciente, en que los niveles de *MYC* (*c-myc*) y *CDKN1B* (codificante para p27<sup>Kip1</sup>) aumentan y disminuyen, respectivamente<sup>262</sup> ([Figura 4.6](#)). En consecuencia, debería promoverse la proliferación de las células del paciente, pero, como se ha indicado, observamos el efecto opuesto. Esto sugiere la existencia de, al menos, otro mecanismo más que causa el menor crecimiento, que podría tratarse del ya comentado cúmulo de los ncRNA mitocondriales (podrían causar un incremento de los dsRNA mitocondriales y que estos

---

<sup>260</sup> Ver apartados 4.2 y 5.2 para más información.

<sup>261</sup> Que tanto el defecto como el exceso de la PNPasa tenga un efecto perjudicial coincide con el carácter destructivo de todas las ribonucleasas y la necesidad de que sus niveles se encuentren controlados ([Stone et al., 2017](#)).

<sup>262</sup> No se evalúan directamente los niveles del miR-221. Sin embargo, el mRNA de *CDKN1B* es diana de miR-221 ([Das et al., 2010](#)), de modo que el descenso de *CDKN1B* sugiere una menor degradación de miR-221, coincidente con el déficit de la PNPasa que experimenta el paciente ([Figuras 4.1](#) y [4.3](#)).

pasaran al citoplasma, actuando como alarminas y derivando en una respuesta inmune (Dhir et al., 2018)). Cabe destacar que la ausencia de un menor crecimiento de los fibroblastos del paciente en galactosa con respecto a su proliferación en glucosa (Figura 4.9A) se contradice con los resultados de otros autores (Aguer et al., 2011; Robinson et al., 1992). Es posible que en las células estudiadas en dichas publicaciones el defecto en OXPHOS (fibroblastos primarios de pacientes; (Robinson et al., 1992)) sea mayor que en el de nuestro paciente y/o sean más glucolíticas (mioblastos primarios; (Aguer et al., 2011)) y, por tanto, más fácil de manifestarse ambos supuestos mediante este ensayo. El carácter más glucolítico y menos dependiente del sistema OXPHOS (Heiden et al., 2009) es precisamente lo que observamos en fibroblastos control inmortalizados al crecerlos en medio con galactosa (Figura 4.22B), obteniendo un descenso claro con respecto a su proliferación en glucosa. Este es uno de los resultados en que vemos que el fenotipo de las células inmortalizadas es en parte diferente al de las primarias, siendo, en general, más suave el de estas últimas en medio de cultivo con glucosa (tanto alta como baja, es decir, 4,5 g/l y 1 g/l, respectivamente): los defectos encontrados en los fibroblastos de nuestro paciente coinciden con los de su variante inmortalizada, pero el aumento de las copias del mtDNA en P1 (Figura 4.4A) es mayor que en P1<sub>i</sub> (Figura 4.10C), el cúmulo de los transcritos totales en P1 (Figura 4.5C) es mayor que en P1<sub>i</sub> (Figura 4.10B) y la capacidad de consumo de oxígeno en P1 (Figura 4.9E) es menor que en P1<sub>i</sub> (Figura 4.10D).

El paciente también presenta un aumento generalizado de la síntesis de proteínas mitocondriales (Figura 4.9B) que, sin embargo, parece compensado post-traduccionalmente, al menos, para COI y ND6, ya que sus niveles son similares con respecto al control (Figuras 4.7A y 4.7B). En el caso de COI, la aparente caída en sus niveles coincide con que la actividad del CIV se vea disminuida (Figura 4.9C), así como al normalizarla por cantidad de mitocondria (Figura 4.9D), si bien todos estos resultados no son estadísticamente significativos. En este contexto, también se valoró la actividad de la CS, que es similar en el paciente con respecto al control analizados (Figura 4.9C) y coincide con que sus niveles proteicos también sean semejantes (Figura 4.7A). Esto entra en conflicto con los resultados obtenidos en el Hospital Universitario 12 de Octubre, en que, como se señala en el apartado 2.1, vieron que la de la citrato sintasa aumenta en el paciente. Una posible explicación es que, en este aspecto, exista dependencia celular y de tejido, ya que nuestros resultados están generados a partir de fibroblastos primarios, mientras que, en su caso, parten de un homogenado de tejido muscular. Además, también analizamos los niveles de ATP mitocondrial y la capacidad de consumo de oxígeno de los fibroblastos del paciente. En ambos casos, obtuvimos un descenso significativo con respecto al control utilizado, lo que, por un lado, coincide con los resultados obtenidos por otros autores al silenciar la PNPasa para los niveles de ATP (Slomovic & Schuster, 2008) y, por otro, afianza que el paciente experimenta una disfuncionalidad mitocondrial. Esto último se ve especialmente confirmado por la disminución en el consumo de oxígeno, ensayo considerado altamente eficiente para detectar defectos en las mitocondrias de pacientes con una enfermedad mitocondrial genéticamente probada, así como especialmente útil en aquellos casos en que la actividad de los complejos OXPHOS no se encuentra directamente alterada (Murayama et al., 2019). En conjunto, estos resultados nos llevan a afirmar que el paciente experimenta un bucle de retroalimentación negativa mitocondrial: las variantes detectadas en *PNPT1* llevan a un fallo de la fosforilación oxidativa que, a su vez, origina una menor producción de ATP (Figura 4.9F) y, en consecuencia, el

degradosoma como tal también sufriría una disfuncionalidad, puesto que SUV3 es dependiente de ATP (Jain et al., 2022; Minczuk et al., 2002; Shu et al., 2004; D. D.-H. Wang et al., 2009).

En cuanto a la localización de la PNPasa, ésta se encuentra en debate en la comunidad científica. Por los resultados obtenidos (Figura 4.12) y el análisis bioinformático realizado (Figura 4.13), proponemos que la PNPasa se localiza en la matriz mitocondrial, en que quizá pueda encontrarse tanto soluble como anclada por su N-terminal a la IM (hasta el residuo 184; predicción). Esto último coincidiría con las múltiples alturas obtenidas para la PNPasa en la BN-PAGE 2D (resultado disponible en el anexo 8.9), que tal vez podrían deberse a restos de membranas mitocondriales a los que la proteína permanecería unida. Además, que pueda encontrarse unida a la IM no entra en conflicto con las observaciones de (Rhee et al., 2013) ni con la funcionalidad de la PNPasa. Por un lado, (Rhee et al., 2013) defienden su localización en la matriz, ya que el método que desarrollan<sup>263</sup> detecta tanto proteínas solubles de la matriz como situadas hacia la matriz: obtienen que la PNPasa es una de las proteínas de la matriz más enriquecidas, pero, en concreto, lo que detectan de ella es que su C-terminal y los residuos Y302 y Y356 se encuentran expuestos hacia la matriz. Por otro, según nuestro modelo, los dominios S1 (Figura 1.12), localizados hacia la matriz, seguirían pudiendo ser flexibles (Figura 1.13) e interactuar con SUV3 (Jain et al., 2022; Minczuk et al., 2002). No obstante, y como señala (Enríquez, 2016), *“models are intellectual frameworks built to understand reality by accommodating experimental observations. If we forget this, the oversimplifications of our models force us to reject the implications of observations. Models are dispensable; observations and data should guide research progress”*<sup>264</sup>. Más experimentos son necesarios para establecer de forma inequívoca la localización intramitocondrial de la PNPasa.

Por otra parte, la asociación entre la PNPasa y SUV3 se encuentra descrita y establecida, pero *in vitro* a partir de proteínas purificadas (Jain et al., 2022; D. D.-H. Wang et al., 2009, 2014). Mediante BN-PAGE 1D de mitoplastos (obtenidos de fibroblastos control y del paciente, así como de dichas células inmortalizadas y con sobreexpresión de *PNPT1*) sólo detectamos una única banda correspondiente a la PNPasa homotrimérica (Figura 4.3D), mientras que por BN-PAGE 2D de mitocondrias (purificadas de células HEK293T) no conseguimos visualizar el degradosoma (anexo 8.9). Ambos resultados sugieren que la interacción entre ambas subunidades del complejo es menos estable que la de los homomultímeros, lo que coincide con que ambas enzimas sean capaces de actuar por separado: la PNPasa sobre ssRNA (Golzarroshan et al., 2018; Lin et al., 2012) y SUV3 sobre dsDNA, dsRNA e híbridos DNA/RNA, con preferencia por los primeros (Minczuk et al., 2002; Peter & Falkenberg, 2020; Shu et al., 2004). No obstante, y a pesar de esta posible naturaleza de la interacción entre SUV3 y la PNPasa, nuestros resultados implican que los niveles de ambas dependen entre sí (Figura 4.11) y que, por tanto, su regulación es fundamental para el correcto ensamblaje y funcionalidad del degradosoma mitocondrial. De hecho, este efecto sinérgico ha sido detectado por otros autores: tanto al

<sup>263</sup> Se basa en combinar las fortalezas de la microscopía y la espectrometría de masas para generar un mapa proteómico espacio-temporal.

<sup>264</sup> Los modelos son marcos intelectuales contruidos para comprender la realidad, acomodando las observaciones experimentales. Si olvidamos esto, las simplificaciones excesivas de nuestros modelos nos obligan a rechazar las implicaciones de las observaciones. Los modelos son dispensables; las observaciones y los datos deberían guiar el progreso de la investigación.

silenciar a la vez *PNPT1* y *SUV3* como al sobreexpresarlos se produce un mayor cúmulo o un descenso más pronunciado de los mRNA, respectivamente, que al actuar sobre cada uno de los genes por separado ([Pajak et al., 2019](#)).

Para finalizar, y como se indicaba al principio, los resultados obtenidos, con especial relevancia las fluctuaciones en los niveles del mtDNA, de los transcritos y de las proteínas analizadas, no hacen sino confirmar lo tremendamente interrelacionado que se encuentra el metabolismo del mtRNA ([Figura 1.9](#)) y abalan la conclusión de que nuestro paciente padece una enfermedad mitocondrial, cuya etiología reside en las mutaciones p.A507S y p.K562\* en heterocigosis compuesta en el gen nuclear *PNPT1*.

## 5.2 TEFM

En este trabajo se ha investigado la patología de la variante *de novo* p.Q346\* del gen nuclear *TEFM*, codificante para la proteína homónima. La variante se ha encontrado en heterocigosis en un paciente, que, además, sólo presenta polimorfismos en su mtDNA. Se ha demostrado que la variante en *TEFM* es patológica y altera el metabolismo mitocondrial, concretamente, lleva a un descenso de los niveles de TEFM que se deriva en: una menor cantidad de mtDNA con 7S DNA; descenso de los mtRNA, como consecuencia de encontrarse afectada la elongación de la transcripción; variación transcripcional y proteica de genes relacionados con TEFM y que participan en el metabolismo de los ácidos nucleicos mitocondriales; disfuncionalidad del sistema OXPHOS, como consecuencia de todo lo previo. Además, se ha realizado un ensayo de complementación para evaluar el efecto de sobreexpresar *TEFM* en fibroblastos del paciente, obteniéndose que resulta tóxico para los fibroblastos, en general, y, por tanto, imposibilita su uso como terapia génica. Estos resultados y los obtenidos con fibroblastos del paciente en situación basal y al someterlos a un estrés con EtBr nos llevan a proponer a TEFM como un sensor del metabolismo del mtDNA y mtRNA que regula, a la vez, la replicación y la transcripción. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio de los niveles de serotonina en SH-SY5Y que sobreexpresan *TEFM* con la mutación p.Q346\*, en un control genético y en otro farmacológico, obteniéndose que la funcionalidad del sistema OXPHOS influye sobre los niveles de serotonina.

Dicho lo anterior, el estudio de la variante del paciente se ha llevado a cabo tanto *in silico* como, sobre todo, por medio de diferentes ensayos para evaluar a la propia proteína y la funcionalidad mitocondrial. *In silico*, la variante se predice como patológica, lo que coincide con los criterios de patogenicidad del ACMG/AMP (Richards et al., 2015) que cumple: p.Q346\* es una variante patógena<sup>265</sup> porque, al menos, sigue los criterios PS2, PM1, PM2 y PM4<sup>266</sup>. Además, el análisis estructural de la proteína sugiere que la pérdida ocasionada por la variante de los 15 últimos residuos de TEFM podría afectar a su interacción con el mtDNA y/o a su estabilidad (Figura 4.15). Esto último, se ve reafirmado por el hecho de que los niveles del mRNA de *TEFM* no los detectamos alterados en el paciente ni por qPCR (Figura 4.16A) ni por RNA-seq (Figura 4.18C), mientras que los de la proteína se reducen un 43 % de media (Figura 4.16B).

En cuanto a la replicación, el número de copias del mtDNA no se encuentra alterado en el paciente o, en todo caso, ligeramente incrementado (Figura 4.17A), pero sí experimenta un descenso significativo en los niveles del 7S DNA (Figura 4.17B). Esto implica que la replicación del mtDNA se encuentra comprometida en el paciente y coincide con las observaciones de (S. Jiang et al., 2019): al inactivar *TEFM* obtienen una caída en los niveles del 7S DNA (y, en su caso, también del mtDNA). La alteración en la síntesis de mtDNA que experimenta el paciente se ve respaldada por los datos de RNA-seq, ya que vemos un incremento de *POLG* y descenso de

---

<sup>265</sup> También podría ser probablemente patógena. Al evaluar los criterios que cumple la variante con respecto a la información presente en la literatura se encontró que algunos podían dar lugar a ambigüedad en su interpretación. Esto incluye los criterios indicados por los que se decidió señalar como patológica en la presente discusión.

<sup>266</sup> PS2: variante *de novo* no encontrada en la madre ni en el padre; PM1: se localiza en un dominio funcional bien establecido y crítico (Figura 1.11), que es el C-terminal (Hillen, Parshin, et al., 2017); PM2: presente un único caso en gnomAD (ID de la variante: 17-29226234-G-A); PM4: causa una longitud de la proteína diferente por una delección en el ORF.



*POLG2* (Figura 4.18C), y por los resultados obtenidos al someter a los fibroblastos del paciente a una situación de estrés con EtBr. En particular, sólo con este tratamiento obtuvimos una diferencia de crecimiento con respecto al control, ya que ni en glucosa ni en galactosa se observa una proliferación diferente entre el control utilizado y el paciente (estando ambos sometidos al mismo agente<sup>267</sup>) (Figura 4.20A). Este efecto indirecto sobre la proliferación por parte del EtBr se ve confirmado con el estudio de la depleción del mtDNA y los mtRNA y su cinética de repoblación, en que detectamos que la repoblación del mtDNA es menor en los fibroblastos del paciente (Figura 4.20C) y que los niveles de los mtRNA analizados (12S RNA, ATP6, CYB y ND6) se recuperan más en el paciente que en el control (Figura 4.20C), mientras que en situación basal los niveles de dichos transcritos (y COI) disminuyen en el paciente (Figura 4.18A). De todo ello, pueden extraerse varias conclusiones. En primer lugar, en situación basal obtenemos el comportamiento esperado del modelo anti-terminador propuesto por (Agaronyan et al., 2015), es decir, que en ausencia de TEFM se promueva más la replicación que la transcripción, descendiendo esta última. Sin embargo, y en segundo lugar, los resultados obtenidos en situación de estrés con EtBr implican que la función de TEFM en las mitocondrias es más compleja, como ya exponen (S. Jiang et al., 2019). En base a nuestros resultados, TEFM parece que no sólo participa en la replicación como un interruptor y que, al contar con menos cantidad de TEFM y someterse a un mayor estrés, los fibroblastos del paciente priorizan un programa de mantenimiento, disminuyendo la replicación del mtDNA y su propia proliferación.

Continuando con la transcripción, obtenemos un perfil similar al de (Minczuk et al., 2011), ya que estos autores ven que al silenciar *TEFM* disminuyen los niveles de todos los transcritos que analizan, encontrándose más afectados los más alejados de los promotores. En nuestro caso, y como se ha indicado anteriormente, también descienden los niveles de los mtRNA estudiados y, entre ellos, el CYB es el transcrito que más se encuentra comprometido, coincidiendo con que sea el más distante de los promotores<sup>268</sup> (Figura 4.18A). Estas observaciones reafirman el déficit de TEFM que experimenta el paciente, ya que implican que se ve disminuida la transcripción mitocondrial y, en particular, su elongación. Por otra parte, observamos que el valor medio de los niveles del 7S RNA aumentan en el paciente (Figura 4.18B), al contrario que el de los demás transcritos estudiados (Figura 4.18A). Esta diferencia de niveles entre el 7S RNA y el resto de los mtRNA encaja con los resultados de (Reyes et al., 2020) y con el modelo ofrecido por (Zhu et al., 2022), según el que el 7S RNA inhibe la transcripción provocando la dimerización de POLRMT (estado en que la polimerasa no es activa<sup>269</sup>). En concreto, influye sobre el inicio de la transcripción, ya que, una vez empezada, POLRMT no se encuentra inhibida por el 7S RNA. Los autores especulan que esto puede deberse a la conformación que adopta la polimerasa junto a TEFM y el mtDNA molde, de lo que puede extraerse que TEFM ejerce un efecto protector, que es precisamente lo que indican nuestros datos: como se ha señalado, en el paciente los niveles proteicos de TEFM disminuyen (Figura 4.16B) y el nivel medio del 7S RNA aumenta (Figura 4.18B), mientras que al sobreexpresar *TEFM* el 7S RNA cae de manera significativa (Figura 4.21E).

<sup>267</sup> La presencia de un agente estresante puede desenmascarar el fenotipo deficiente de un paciente.

<sup>268</sup> El gen *CYB* se encuentra próximo a LSP, pero se expresa bajo HSP2 (Figura 1.4).

<sup>269</sup> Un exceso de 7S RNA lleva a una inhibición, mientras que un defecto de dicho transcrito promueve la transcripción (Zhu et al., 2022).

En cuanto a los resultados obtenidos por RNA-seq, destaca la alteración de los niveles de los genes de la familia *MTERF* y de *FASTKD2* (Figura 4.18C), ya que sus niveles parecen consecuencia de un mecanismo adaptativo: por un lado, presentan un efecto sinérgico con el déficit de TEFM (promueven un descenso de la transcripción) y, por otro, influyen sobre la traducción mitocondrial. En particular, el descenso de *MTERF1* se espera que lleve a una menor síntesis de los rRNA mitocondriales (que es lo que obtenemos para el 12S rRNA; Figura 4.18A); (Wenz et al., 2009) ven que inactivar *MTERF2* provoca la caída de los mRNA mitocondriales y en nuestro paciente *MTERF2* disminuye; el aumento de *MTERF3* que observamos se espera que provoque una menor transcripción, ya que actúa como represor de este proceso (Park et al., 2007); los niveles de *MTERF4*, gen necesario para formar los mitorribosomas, disminuyen (Cámara et al., 2011); en nuestro paciente *FASTKD2* disminuye y (Popow et al., 2015) obtienen que tanto al silenciar *FASTKD2* como al inactivarlo por CRISPR, caen los niveles del mRNA de *ND6* y su síntesis proteica, que es compatible con lo que nosotros observamos (Figuras 4.18A y 4.20B, respectivamente). Dicho esto, otros resultados a destacar de la RNA-seq son los menores niveles de *CDKN1B*, que estarían relacionados con el ligero (y no significativo) incremento de la proliferación de los fibroblastos del paciente con respecto al control en medio con glucosa (Figura 4.20A); el aumento de *DHX30*, que codifica para una helicasa que interactúa con TEFM en presencia de RNA (Minczuk et al., 2011); el aumento de *LONP1*, que podría ser la responsable de degradar las copias de TEFM con la mutación p.Q346\* y, por tanto, de los menores niveles detectados de la proteína (Figura 4.16B); el descenso de *TFB2M* y el aumento de *PNPT1*, no correspondientes con sus niveles proteicos, ya que TFB2M no se encuentra alterado en el paciente, mientras que la PNPasa disminuye (Figura 4.19). Esto último sugiere que los niveles de ambas proteínas se regulan post-transcripcionalmente y, en el caso de la PNPasa, reafirma su relación con TEFM (expuesta con anterioridad entre los apartados 4.1 y 5.1), por la que una se adapta a los niveles y funcionalidad de la otra, posiblemente por ser dos de las principales proteínas implicadas en la síntesis de los mtRNA (TEFM) y en su degradación (PNPasa)<sup>270</sup>. En este sentido, también cabe mencionar el descenso de los niveles proteicos de POLRMT<sup>271</sup> (Figura 4.19), que tal vez se produzca con objeto de igualar los niveles entre dicha proteína y TEFM, dada la estrecha interdependencia funcional en la síntesis de los mtRNA que mantienen.

Por su parte, a pesar del descenso en la transcripción y en la síntesis proteica de *ND6* (Figuras 4.18A y 4.20B, respectivamente), los niveles proteicos de *ND6* se ven incrementados en los fibroblastos del paciente (Figura 4.19), lo que sugiere la existencia de algún mecanismo post-traduccional por el que aumenta la estabilidad de *ND6*. Además, en el paciente también se produce un aumento (no significativo) de los niveles proteicos de *NDUFA9* (Figura 4.19), de *NDUFB8* (datos no ofrecidos), así como del CI y del CI en supercomplejos (Figura 4.21D). En particular, en la BN-PAGE con DDM detectamos el doble de cantidad de CI libre en P2 con respecto a la media de la intensidad de la señal de los controles (207 % de CI libre en P2, considerando C1 y C1<sub>i</sub> como el 100 %); en la BN-PAGE con digitonina un 28 % del CI se encuentra

<sup>270</sup> Además, el degradosoma está implicado en la eliminación de los *R-loop* que pueden formarse durante la transcripción (Silva et al., 2018), por lo que influye positivamente sobre la maquinaria de la transcripción del mtDNA, de la que forma parte TEFM (Figura 1.10).

<sup>271</sup> (Kühl et al., 2016) proponen un modelo por el que la propia POLRMT, según sus niveles, puede regular la transcripción/replicación, lo que coincide con el hecho de que la enzima interviene en ambos procesos. Según estos autores, a mayores niveles de POLRMT se promueve la transcripción, mientras que a menores la replicación. Su descenso en el paciente podría tener relación con esto último.



en supercomplejos y un 72 % libre en P2, mientras que sólo un 15 % de la señal es de supercomplejos y un 85 % de CI libre en fibroblastos control C1<sub>i</sub> (considerando que el 100 % es la suma de las intensidades del CI libre y de los supercomplejos). Todas estas observaciones implican que se está produciendo una comunicación núcleo-mitocondria por la que se promueve la menor degradación/mayor síntesis de las subunidades del CI, tanto codificadas en el nDNA como en el mtDNA<sup>272</sup>, para así incrementar los niveles de este complejo y de los supercomplejos que constituye, con el fin de tratar de llevar a cabo un mecanismo compensatorio<sup>273</sup>. Sin embargo, éste no llega a ser suficiente, ya que en los fibroblastos del paciente detectamos tanto una menor capacidad de consumo de oxígeno (Figura 4.20D), compatible con los resultados de (S. Jiang et al., 2019) en sus ratones KO para *Tefm* condicionales, como una menor producción de ATP mitocondrial (Figura 4.20E). Estos resultados, a su vez, confirman que el paciente presenta una disfuncionalidad mitocondrial y, en particular, del sistema OXPHOS, que deriva de las alteraciones de la replicación y transcripción expuestas con anterioridad. Por tanto, junto a los resultados previos, permiten establecer que el paciente presenta una patología mitocondrial, cuya etiología reside en la mutación p.Q346\* *de novo* en heterocigosis en el gen nuclear *TEFM*.

Por otro lado, la complementación de la deficiencia genética para tratar de restaurar el fenotipo original se considera la técnica *gold-standard* para confirmar la patogenicidad de una mutación, por lo que se evaluó el efecto de sobreexpresar *TEFM wild-type* en los fibroblastos. Los resultados obtenidos a partir de este ensayo han sido unos de los más sorprendentes de la presente tesis doctoral y llevan a la misma conclusión: la sobreexpresión de *TEFM* en los fibroblastos es tóxica para las células (con independencia de las dosis virales empleadas (Figuras 4.21A-D)). Entre todos ellos, posiblemente los más destacables son el análisis de la longitud de *primers R-loop* por 3'-RACE (Figura 4.21F), ya que proporciona un punto de partida para la interpretación de los demás, y los niveles proteicos de TFAM (Figura 4.23E), por sus implicaciones metabólicas sobre el mtDNA. En primer lugar, al sobreexpresar *TEFM* detectamos que la longitud de los *primers R-loop* se encuentra disminuida, siendo la mayoría de ellos más cortos que CSBIII (Figura 4.21F). Dado que para que actúe la RNasa H1 y pueda originarse el extremo 3' para que se inicie la replicación son necesarios *primers* de mayor tamaño (Posse et al., 2019)<sup>274</sup>, es de esperar que las copias del mtDNA se encuentren alteradas, que es precisamente lo que obtenemos: una caída del mtDNA (Figura 4.23C), en contraposición con un incremento del 7S DNA (Figura 4.23D) en las células C15-TEFM y que encaja con que los niveles proteicos de POLG disminuyan (Figura 4.23E). Esto podría coincidir con el modelo anti-terminador de la transcripción de (Agaronyan et al., 2015), pero de la misma forma que la menor

---

<sup>272</sup> En este orden, la síntesis de ND1, ND5 y ND4L aumenta, la de ND3 es similar al control y la de ND6 y ND2 disminuye en los fibroblastos del paciente (Figura 4.20B).

<sup>273</sup> La comunicación núcleo-mitocondria para tratar de paliar el déficit en OXPHOS podría estar produciéndose por un posible incremento de las ROS, derivado, a su vez, de esta deficiencia del sistema, tal y como señalan (Anwar et al., 2018). Además, que se vea especialmente influido el CI coincide con que sea el complejo más afectado en los niños con enfermedades mitocondriales (Murayama et al., 2019).

<sup>274</sup> El tamaño de los *primers R-loop* en C15-TEFM no es lo suficientemente largo como para iniciar la replicación: muchos de los transcritos terminan antes de las dos AA que hay inmediatamente antes de CSBIII y que constituyen dos de las posiciones que encuentran (Posse et al., 2019) en que más se produce el inicio de la replicación (todas las demás son posteriores a las dos AA citadas, es decir, a las pares de bases 364 y 365 del mtDNA).

elongación de los *primers R-loop* se encuentra disminuida y afecta a la replicación, su menor longitud proporciona la idea de que la transcripción también se encuentra afectada, lo que confirmamos mediante diferentes ensayos: observamos un descenso drástico de los niveles de transcritos totales de COI y ND6 por qPCR (Figura 4.21B), así como del 7S RNA (Figura 4.21E). Que tanto la replicación como la transcripción mitocondriales en los fibroblastos que sobreexpresan *TEFM* se encuentren muy comprometidas concuerda con que al someter a estas células a EtBr no sean las más afectadas, y que, de hecho, sus niveles no difieran significativamente con respecto al control tratado con EtBr, ya que, a la concentración empleada (0,05 µg/ml), es posible que el efecto del EtBr sea menor que el de la propia sobreexpresión de *TEFM* (Figura 4.23F). Además, y de nuevo por el hecho de que tanto la replicación como la transcripción de los fibroblastos se encuentran muy afectadas al sobreexpresar *TEFM*, el sistema OXPHOS también está alterado, lo que observamos tanto por *Western blot* como por BN-PAGE: en general, las diversas subunidades estudiadas están disminuidas (Figuras 4.21C y 4.23E), mientras que los niveles de todos los complejos y supercomplejos analizados caen drásticamente (Figura 4.21D). Todo ello lleva a una reducción media de un 65 % en la capacidad de consumo de oxígeno de estas líneas (Figura 4.23G) y a que desarrollen un fenotipo mucho más glucolítico, lo que puede deducirse de que sea el modelo celular que experimenta un mayor descenso en su crecimiento en medio con galactosa<sup>275</sup> (Figura 4.23F). Esto último, a su vez, coincide con el comportamiento que hemos observado y analizado del mitotranscriptoma de C15-TEFM (disponible en el anexo 8.11) y con que se haya detectado una elevada expresión de *TEFM* en dos tipos de cáncer: en células y tejidos de HCC y en tejidos de LGG<sup>276</sup>, se ha visto que cuanto mayor sea la expresión de *TEFM* peor es el pronóstico de los pacientes (Fei et al., 2020; S. Li et al., 2020). En concreto, en el caso del HCC lo que ocurre es que la mayor expresión de *TEFM*, causada por la represión de miR-149-5p<sup>277</sup>, promueve la transición de la etapa G1 a la S del ciclo celular, la transición epitelio-mesénquima (en cáncer relacionada con la invasión y migración, es decir, con la metástasis) y la supresión de la apoptosis<sup>278</sup>, lo que sugiere que *TEFM* puede funcionar como un oncogén vital en este tipo de cáncer y lleva a los autores a proponerlo como un biomarcador para el HCC, así como una diana terapéutica (Wan et al., 2021). Finalmente, en relación a los niveles de los transcritos de otros genes nucleares y de sus proteínas, sobreexpresar *TEFM* en los fibroblastos causa un efecto dispar y, en cierto modo, inesperado: en comparación con los dos pacientes, C15-TEFM son los fibroblastos que menos alterados presentan los genes analizados en el panel virtual (ver anexo 8.10). Entre los genes

<sup>275</sup> Los fibroblastos inmortalizados no presentan tanta disminución en su crecimiento (Figura 4.22B).

<sup>276</sup> El HCC es uno de los cánceres más comunes, concretamente, el quinto más abundante (Fei et al., 2020; Wan et al., 2021). Por su parte, el LGG es un cáncer de las células gliales del sistema nervioso central; la OMS clasifica a los gliomas en 4 grados, según su agresividad, siendo los glioblastomas los de grado IV.

<sup>277</sup> miR-149-5p es un miRNA cuya función propuesta es la de ser un supresor de tumores, ya que actúa sobre diferentes oncogenes (Wan et al., 2021).

<sup>278</sup> Todo ello lo lleva a cabo parcialmente incrementando la producción de ROS y, en consecuencia, la activación de la señalización ERK (señalización ROS/ERK). Esto coincide con nuestras observaciones de que la sobreexpresión de *TEFM* en fibroblastos lleva a un defecto en OXPHOS, ya que puede que sea también lo que ocurre en el HCC: que el defecto en OXPHOS por sobreexpresión de *TEFM* derive en una mayor producción de ROS y éstas a su vez en la activación de la ruta ERK (los propios autores, es decir, (Wan et al., 2021) señalan que las mitocondrias son la mayor fuente de ROS y éstas se producen, sobre todo, al fallar el sistema OXPHOS). En particular, lo que detectan los autores es que las isoformas ERK1/2 no se encuentran aumentadas por los niveles de *TEFM*, pero sí las formas fosforiladas de las mismas, es decir, p-ERK1/2, que son precisamente las activas.

que tienen una diferencia de niveles significativa, destacan *MYC*, que se encuentra disminuido y justifica que el modelo celular crezca peor que los fibroblastos control en glucosa (Figura 4.23F), y genes que, junto a la sobreexpresión de *TEFM*, producen un efecto sinérgico sobre la caída de la transcripción mitocondrial observada (Figura 4.21B): *MTERF2* disminuye; *MTRES1* desciende, cuando se ha descrito que aumenta en situaciones de estrés para promover la transcripción (Kotrys et al., 2019); los niveles de *LRPPRC* bajan, de manera que es de esperar que los transcritos sintetizados sean menos estables (Chujo et al., 2012; Gohil et al., 2010; Jacobs & Turnbull, 2005; Pajak et al., 2019; Ruzzenente et al., 2012). En cuanto a los niveles proteicos, destaca el incremento significativo de *MGME1*, *TFB2M* y *POLRMT*, especialmente de esta última (Figura 4.23E). En el caso de *MGME1*, su aumento puede deberse a un mecanismo compensatorio para tratar de disminuir los niveles de 7S DNA y promover la replicación, ya que mutaciones en *MGME1* se ha visto que provocan un descenso en el número de copias del mtDNA y aumento del 7S DNA (Kornblum et al., 2013)<sup>279</sup>. Por su parte, la mayor cantidad de *TFB2M* y de *POLRMT* podría producirse para tratar de incrementar la funcionalidad de *POLRMT*. De hecho, tratamos de revertir el fenotipo patológico causado por sobreexpresar *TEFM* en fibroblastos sobreexpresando también *POLRMT*, sin embargo, el defecto en OXPHOS no se recuperó (Figura 4.22C) e incluso resultó más perjudicial para su proliferación, tanto en glucosa como en galactosa (Figura 4.22B).

Continuando con los resultados de la 3-RACE, el hecho de que en C15-TEFM los *primers R-loop* sean de menor tamaño que en el control no sólo es relevante para la replicación y la transcripción, en general, sino para el propio mecanismo de inicio de la transcripción y la funcionalidad de *TEFM*. La transcripción comienza mediante el reclutamiento de *POLRMT* por parte de *TFAM*, sigue con la unión de *TFB2M* y, en un momento dado, *TFAM* y *TFB2M* se separan de *POLRMT* y *TEFM* se asocia con la polimerasa. *TFAM*, además, es la unidad básica que permite la organización del mtDNA en nucleoides y cuanto menor sea la cantidad de esta proteína más accesibles serán las moléculas de mtDNA tanto para la transcripción como la replicación (Figura 1.6). Por tanto, la caída proteica desmesurada de *TFAM*<sup>280</sup> al sobreexpresar *TEFM* (Figura 4.23E) puede interpretarse de dos formas: que sea la principal responsable de la gran alteración transcripcional observada, y ya comentada previamente, y/o que su degradación se esté produciendo para liberar el mtDNA de la estructura de los nucleoides y así intentar promover tanto la transcripción como la replicación, aunque sin éxito. Además, (Lyonnais et al., 2017) observan que *TFAM* es capaz de unirse a estructuras G4 de DNA y RNA, incluida la del CSBII, por lo que tal vez también podría actuar como un represor de la elongación de la transcripción mitocondrial, estando así en contraposición con *TEFM*. Por su parte, la localización en que se produce la unión de *TEFM* al EC no se encuentra descrita en la literatura y es precisamente la propuesta que realizamos en base a nuestros resultados, comentados previamente (Figura 4.21F), los de (S. Jiang et al., 2019) y los de (Blumberg et al., 2017). Por un lado, (S. Jiang et al., 2019) obtienen un perfil de la longitud de los *primers R-loop* muy similar al nuestro, lo que resulta muy llamativo, dado que, en su caso, analizan muestras en que *TEFM* se encuentra inactivado (ratones KO para *Tefm* condicionales) y no sobreexpresado. Por otro, (Blumberg et

<sup>279</sup> Estos autores también comprueban que al sobreexpresar *MGME1* disminuye la cantidad de 7S DNA, pero también del mtDNA, por lo que concluyen que *MGME1* debe estar en los niveles adecuados.

<sup>280</sup> Coincide con el incremento de *LONP1* (Figura 4.18C), ya que *TFAM* es sustrato de dicha proteasa en caso de no estar unida al mtDNA (Lu et al., 2013).

al., 2017), utilizando técnicas de secuenciación especializadas (GRO-seq y PRO-seq<sup>281</sup>), identifican la presencia de dos pausas importantes durante la transcripción: una en las posiciones del mtDNA 361-355, es decir, en CSBIII y otra adyacente a O<sub>L</sub> y proponen que ambas se producen para dotar del tiempo suficiente al replisoma para ensamblarse. La localización de la primera pausa coincide con el extremo 3' de la mayoría de los *primers R-loop* detectados por (S. Jiang et al., 2019) al inactivar *TEFM* y con el de nuestros propios transcritos en C15-TEFM (la gran mayoría de nuestros *primers R-loop* tiene su extremo 3' entre las posiciones del mtDNA 370-360). En consecuencia, todo ello sugiere que la primera pausa no sólo se produce para que se ensamble el replisoma, sino también (o en lugar de) para que se pueda reclutar TEFM. Esto implicaría que, junto a CSBII, CSBIII también es importante para la transición entre la replicación y la transcripción mitocondrial: TEFM se uniría en CSBIII y prolongaría la transcripción hasta, al menos, CSBII, en que, en caso de permanecer unido continuaría con la transcripción, mientras que, de lo contrario, intervendría la RNasa H1 para que se iniciara la replicación (Figura 1.8). De cumplirse todo lo anterior, este modelo justificaría los resultados obtenidos por (S. Jiang et al., 2019)<sup>282</sup>, ya que al inactivar *TEFM* en sus ratones apenas hay proteína disponible para reclutarse en CSBIII. Para nuestros resultados al sobreexpresar *TEFM* existen diferentes interpretaciones, no excluyentes entre sí: al haber tanta proteína (Figuras 4.23A y 4.23B), TEFM podría formar agregados entre sus monómeros que imposibilitasen la presencia de un homodímero funcional; sería posible que TEFM interactuase con POLRMT de forma externa a la transcripción, secuestrándolo<sup>283</sup>; (Posse et al., 2015) obtienen un patrón de DNA *footprinting* diferente al añadir TEFM, a raíz de lo que proponen que esta proteína podría influir sobre las interacciones de la maquinaria de inicio de la transcripción con los promotores. Toda esta interferencia de TEFM con la transcripción coincide con que, a pesar de que los niveles detectados del 7S RNA caigan (Figura 4.21E), la transcripción se encuentre disminuida al sobreexpresar *TEFM* (Figura 4.21B), como ya se ha indicado. Por su parte, que los niveles del 7S DNA aumenten en C15-TEFM, cuando el inicio de la replicación también se encuentra comprometido, podría ser por la siguiente explicación: (Reyes et al., 2015) ven que mutaciones en la RNasa H1 conducen a un aumento del 7S DNA y a un menor número de copias del mtDNA y, por su parte, (Posse et al., 2019) señalan que esto puede deberse a que, según sus propios datos, el déficit de la actividad de la RNasa H1 provoca que se pierda la iniciación de la síntesis de mtDNA específica y, en su lugar, comience desde múltiples puntos; al sobreexpresar *TEFM* se imposibilita el inicio de la replicación habitual, por lo que éste también podría suceder desde diferentes localizaciones, dando lugar a un cúmulo de 7S DNA. Finalmente, cabe destacar que toda esta ruta propuesta en la NCR del mtDNA para justificar los resultados de la literatura y los nuestros propios, no hace sino coincidir con el hecho de que esta región no codificante se trata de una localización esencial en la regulación de la replicación y la transcripción mitocondriales (Figuras 1.4, 1.5 y 1.8).

---

<sup>281</sup> La ventaja de ellas frente a otras como la qPCR o la RNA-seq es que permiten estudiar los RNA nacientes. En otras palabras, no toman una foto de la cantidad de transcritos que hay en un momento dado, sino que permiten analizar la síntesis como tal. Esto las convierte en técnicas con las que poder estudiar el inicio de la transcripción, las pausas y los sitios de terminación (Blumberg et al., 2017; Kwak & Lis, 2013).

<sup>282</sup> Entre otros, observan también una caída generalizada de los transcritos mitocondriales y de la actividad de los complejos OXPHOS.

<sup>283</sup> Esto, a su vez, justificaría el aumento de POLRMT y TFB2M en C15-TEFM (Figura 4.23E): de POLRMT para tratar de reducir el número de polimerasas no disponibles; de TFB2M con objeto de liberar moléculas de POLRMT, ya que la unión de TFB2M a POLRMT es mutuamente excluyente a la de TEFM (Figura 1.10).

Dicho todo lo anterior, por nuestros resultados con el paciente, al sobreexpresar *TEFM* en fibroblastos y los datos disponibles en la literatura, podemos concluir que la presencia de *TEFM* en los niveles adecuados resulta fundamental tanto para la replicación como para la transcripción mitocondrial. Esto nos lleva, en última instancia, a proponer a *TEFM* no sólo como un elongador de la transcripción mitocondrial, sino como un sensor del metabolismo del mtDNA y mtRNA (tal y como se adelantaba en el apartado 5.1) y cuya alteración regula la degradación de la proteína *TFAM*. Así, según las necesidades mitocondriales los niveles de *TEFM* pueden variar (Figuras 4.7A y 4.7B)<sup>284</sup> y, de igual forma, la cantidad de proteína presente influye sobre la replicación y la transcripción: al inactivarse *TEFM* no se desarrolla con éxito ninguno de los dos procesos (S. Jiang et al., 2019); ante un déficit de *TEFM* y condición de estrés se promueve la transcripción (Figura 4.20C), mientras que en ausencia de dicho estrés se prioriza la replicación (Figuras 4.17A, 4.17B, 4.18A y 4.18B); en situación fisiológica *TEFM* se espera que se comporte según el modelo anti-terminador propuesto (Agaronyan et al., 2015); la sobreexpresión de *TEFM* causa un efecto similar a su ausencia, ya que origina un descenso drástico tanto de la replicación (Figura 4.23C) como de la transcripción (Figura 4.21B) mitocondriales.

Siguiendo con el paciente, se quiso llevar a cabo una mayor aproximación entre su genotipo y fenotipo, tratando de evaluar si uno de sus mayores signos, que es una caída del 5-HIAA (producto de degradación de la serotonina) está relacionado con la mutación *de novo* detectada en *TEFM*. Para ello, en primer lugar, se analizó la sobreexpresión de *TEFM* con la mutación del paciente (p.Q346\*) en el modelo generado C15-*TEFM*<sup>mut</sup>. Como resultado, se obtuvo que el fenotipo bioquímico de dichas células difiere con respecto a las células con el mismo fondo genético (C15) que sobreexpresan la proteína *wild-type*, es decir, los fibroblastos C15-*TEFM*, tanto en cuanto al número de copias del mtDNA (Figura 4.23C), niveles de 7S DNA (Figura 4.23D), cantidad de proteínas<sup>285</sup> (Figura 4.23E), crecimiento celular (Figura 4.23F) y capacidad de consumo de oxígeno (Figura 4.23G). En cambio, en estos mismos resultados, junto a los niveles de las proteínas analizadas en los fibroblastos del paciente (Figura 4.19), puede comprobarse que su fenotipo bioquímico se asemeja más al del paciente. Por ello, y dado que los síntomas y signos del paciente implican que hay una dependencia de tejido, se llevó a cabo la síntesis de la línea SH-SY5Y con sobreexpresión de *TEFM* con la mutación p.Q346\*, es decir, SH-SY5Y-*TEFM*<sup>mut</sup>, se confirmó su déficit OXPHOS analizando diversas subunidades por *Western blot* (Figura 4.24B) y, sobre todo, evaluando su capacidad de consumo de oxígeno<sup>286</sup> (Figura 4.24C) y se midieron sus niveles de serotonina intracelulares, junto a dos controles con disfuncionalidad de la fosforilación oxidativa: un control genético (SH-SY5Y con sobreexpresión de *POLG* con la mutación p.Y955C) y un control farmacológico (SH-SY5Y tratadas con rotenona). En las tres líneas celulares hay una mayor cantidad de serotonina con respecto a las SH-SY5Y

<sup>284</sup> Como se discute en el apartado 5.1, el incremento de *TEFM* en situación basal, así como su mayor aumento al tratar los fibroblastos de estudio con geneticina, podrían deberse a que, como proponen (S. Jiang et al., 2019), la proteína participe también de alguna forma en el metabolismo de los ncRNA y de los transcritos policistrónicos.

<sup>285</sup> Algunas de las proteínas analizadas en C15-*TEFM* y C15-*TEFM*<sup>mut</sup> presentan niveles semejantes, pero, en general, o bien el comportamiento de los niveles es opuesto (ambos relativizados con respecto a C15) o si en ambas hay un incremento/descenso para una misma proteína, éste es mayor en C15-*TEFM*.

<sup>286</sup> En relación a sus respectivos controles, el descenso en la capacidad de consumo de oxígeno en las SH-SY5Y al sobreexpresar *TEFM* con la mutación p.Q346\* es mayor que en los fibroblastos C15, en que no llega a ser significativo (Figura 4.23G). Esto puede deberse precisamente a la dependencia de tejido que la sintomatología del paciente parece indicar (ver apartado 2.1 para más información).

control (Figura 4.24D), lo que fue una sorpresa, ya que por la historia clínica del paciente esperábamos que un déficit en OXPHOS se relacionase con una menor cantidad de serotonina. No obstante, este hecho implica que, efectivamente, la funcionalidad OXPHOS y los niveles de serotonina se encuentran relacionados y que, por tanto, la mutación p.Q346\* en TEFM no sólo es responsable del fenotipo mitocondrial, sino que también puede serlo del cuadro clínico del paciente. Estas observaciones no son inusuales, dado que se han descrito numerosos metabolitos cuyos niveles se alteran ante una patología mitocondrial (Esterhuizen et al., 2017; Thompson Legault et al., 2015), se ha detectado que las mitocondrias poseen diversos receptores de serotonina (Fanibunda et al., 2019; Tempio et al., 2020; Q. Wang et al., 2016) y que la melatonina, sintetizada a partir de la serotonina (Fanciulli et al., 2020; Szeitz & Bandiera, 2018), es capaz de disminuir los niveles transcripcionales y proteicos de *TFAM* y los transcripcionales de *TFB1M* y *TFB2M*, interfiriendo así con la transcripción del mtDNA (Franco et al., 2018).

Para finalizar, y de forma generalizada, todos nuestros resultados implican que TEFM se trata de una proteína mucho más compleja de lo que se propuso inicialmente y que resulta esencial para la correcta funcionalidad de la replicación y la transcripción mitocondriales. Nuestras observaciones abren las puertas a la necesidad de seguir investigando esta proteína tan fascinante, tanto para poder confirmar los modelos propuestos como para terminar por esclarecer los mecanismos implicados en su relación con el metabolismo de la serotonina.

## **CONCLUSIONES**

---





## 6.1 PNPasa

Las conclusiones que pueden extraerse en base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. Los fibroblastos del paciente presentan las variantes p.A507S y p.K562\* en heterocigosis compuesta en el gen nuclear *PNPT1*. Por métodos bioinformáticos, ambas se predicen como patológicas.
2. El paciente experimenta un déficit de la PNPasa: no se detecta el transcrito canónico del alelo paterno, los niveles transcripcionales de *PNPT1* disminuyen, la PNPasa es degradada y el homotrímero funcional se encuentra en menor cantidad.
3. El déficit de la PNPasa causa un cúmulo generalizado de los transcritos mitocondriales y deriva en la aparición de múltiples mecanismos compensatorios y adaptativos, destacando un incremento de la replicación y un aumento elevado de los niveles proteicos de TEFM, acentuado en situación de estrés con genética.
4. El paciente padece disfuncionalidad del sistema OXPHOS: sus fibroblastos experimentan una menor proliferación en medio con glucosa (que es similar a su propio crecimiento en medio con galactosa), presentan un aumento generalizado de la síntesis de proteínas mitocondriales, menor capacidad de consumo de oxígeno y menores niveles de ATP mitocondrial.
5. La sobreexpresión de *PNPT1* en fibroblastos es perjudicial, si bien en fibroblastos inmortalizados revierte el cúmulo de los transcritos mitocondriales. Además, inmortalizar fibroblastos suaviza el fenotipo de las células primarias.
6. En base a las conclusiones 1-5, el paciente sufre una enfermedad mitocondrial cuya etiología reside en las mutaciones p.A507S y p.K562\* en heterocigosis compuesta en el gen nuclear *PNPT1*.
7. La PNPasa y la helicasa SUV3, componentes del degradosoma, están reguladas para que sus niveles transcripcionales y proteicos se adapten entre sí, especialmente estos últimos.
8. La PNPasa se localiza en la matriz mitocondrial, si bien son necesarios más experimentos para establecer si en forma soluble, anclada a la IM por su N-terminal o ambos.

## 6.2 TEFM

El desarrollo de este trabajo permite establecer las siguientes conclusiones relativas al paciente con la variante *de novo* en *TEFM* y a la funcionalidad de la proteína homónima:

1. Los fibroblastos del paciente presentan la variante *de novo* p.Q346\* en heterocigosis en el gen nuclear *TEFM*. Por métodos bioinformáticos, dicha variante se predice como patológica.
2. El mtDNA del paciente carece de mutaciones, pertenece al haplogrupo H1j2 y la secuencia de la G4 del CSBII es G6AG9.
3. El paciente presenta un déficit de TEFM: las proteínas sintetizadas a partir del alelo mutado se degradan.
4. El déficit de TEFM afecta tanto a la replicación como a la transcripción mitocondriales. En el primer caso, destaca un descenso del 7S DNA y, en el segundo, una pérdida en los mtRNA, que indica que la elongación de la transcripción está comprometida.
5. El déficit de TEFM deriva en la aparición de mecanismos compensatorios y adaptativos, destacando los menores niveles proteicos de POLRMT, así como la mayor cantidad del CI: de subunidades del mismo, del propio complejo y de la proporción del CI que forma parte de supercomplejos.
6. El paciente padece disfuncionalidad del sistema OXPHOS: presenta una menor capacidad de consumo de oxígeno y menores niveles de ATP mitocondrial.
7. Someter a los fibroblastos a un estrés con EtBr pone de mayor manifiesto el fenotipo deficiente causado por la variante en *TEFM*, tanto en la proliferación celular como sobre la cinética de replicación y transcripción mitocondriales.
8. No es posible realizar un ensayo de complementación para *TEFM*, pero la sobreexpresión de *TEFM* con la variante p.Q346\* en fibroblastos causa un fenotipo bioquímico similar al obtenido en los fibroblastos del paciente.
9. Células SH-SY5Y que sobreexpresan *TEFM* con la variante p.Q346\* presentan una disfuncionalidad del sistema OXPHOS y experimentan un incremento en sus niveles intracelulares de serotonina.
10. En base a las conclusiones 1-9, el paciente sufre una alteración mitocondrial cuya etiología reside en la mutación p.Q346\* en heterocigosis en el gen nuclear *TEFM*.
11. La sobreexpresión de *TEFM* es tóxica para los fibroblastos. Entre sus efectos, destaca un descenso desmesurado de los niveles proteicos de TFAM y un tamaño insuficiente de los transcritos de LSP, tanto para la transcripción como para actuar como *primers R-loop* para la replicación mitocondrial, llevando ambos a una deficiencia profunda del sistema OXPHOS. Además, la sobreexpresión de *POLRMT* no recupera el fenotipo.
12. TEFM actúa como un sensor del metabolismo del mtDNA y mtRNA. Su función es más compleja que la propuesta en el modelo anti-terminador, siendo especialmente importante la regulación de sus niveles, y más estudios son necesarios para terminar de establecerla.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Acin-Perez, R., & Enriquez, J. A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1837*(4), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.12.009>
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, *32*(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Anikin, M., & Temiakov, D. (2015). Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science*, *347*(6221), 548–551. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0986>
- Aguer, C., Gambarotta, D., Mailloux, R. J., Moffat, C., Dent, R., McPherson, R., & Harper, M.-E. (2011). Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS ONE*, *6*(12), e28536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028536>
- Albring, M., Griffith, J., & Attardi, G. (1977). Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(4), 1348–1352. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.4.1348>
- Almannai, M., Wang, J., Dai, H., El-Hattab, A. W., Faqeih, E. A., Saleh, M. A., Al Asmari, A., Alwadei, A. H., Aljadhari, Y. I., AlHashem, A., Tabarki, B., Lines, M. A., Grange, D. K., Benini, R., Alsaman, A. S., Mahmoud, A., Katsonis, P., Lichtarge, O., & Wong, L.-J. C. (2018). FARS2 deficiency; new cases, review of clinical, biochemical, and molecular spectra, and variants interpretation based on structural, functional, and evolutionary significance. *Molecular Genetics and Metabolism*, *125*(3), 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.07.014>
- Amalric, F., Merkel, C., Gelfand, R., & Attardi, G. (1978). Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by high-resolution electrophoresis under strongly denaturing conditions. *Journal of Molecular Biology*, *118*(1), 1–25. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90241-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90241-3)
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2015). The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science*, *348*(6230), 528–531. <https://doi.org/10.1126/science.aal2415>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V., & Shoubridge, E. A. (2013). The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell Metabolism*, *17*(3), 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.006>
- Antonicka, H., & Shoubridge, E. A. (2015). Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Reports*, *10*(6), 920–932. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.030>
- Anwar, M. R., Saldana-Caboverde, A., Garcia, S., & Diaz, F. (2018). The organization of mitochondrial supercomplexes is modulated by oxidative stress in vivo in mouse models of mitochondrial encephalopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061582>

- Ast, T., & Mootha, V. K. (2019). Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr. Ox? *Nature Metabolism*, 1(9), 858–860. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0105-0>
- Aylett, S.-B., Neergheen, V., Hargreaves, I. P., Eaton, S., Land, J. M., Rahman, S., & Heales, S. J. R. (2013). Levels of 5-methyltetrahydrofolate and ascorbic acid in cerebrospinal fluid are correlated: Implications for the accelerated degradation of folate by reactive oxygen species. *Neurochemistry International*, 63(8), 750–755. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.002>
- Bacman, S. R., Kauppila, J. H. K., Pereira, C. V., Nissanka, N., Miranda, M., Pinto, M., Williams, S. L., Larsson, N.-G., Stewart, J. B., & Moraes, C. T. (2018). MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA<sup>Ala</sup> levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature Medicine*, 24(11), 1696–1700. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0166-8>
- Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M., Peralta, S., & Moraes, C. T. (2013). Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nature Medicine*, 19(9), 1111–1113. <https://doi.org/10.1038/nm.3261>
- Bamborschke, D., Kreutzer, M., Koy, A., Koerber, F., Lucas, N., Huenseler, C., Herkenrath, P., Lee-Kirsch, M. A., & Cirak, S. (2021). PNPT1 mutations may cause Aicardi-Goutières-Syndrome. *Brain and Development*, 43(2), 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.10.005>
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y., & Beckmann, J. S. (1983). G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 741(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(83\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0167-4781(83)90018-0)
- Bayona-Bafaluy, M. P., Iglesias, E., López-Gallardo, E., Emperador, S., Pacheu-Grau, D., Labarta, L., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2020). Genetic aspects of the oxidative phosphorylation dysfunction in dilated cardiomyopathy. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 786(2019), 108334. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108334>
- Bayona-Bafaluy, M. P., Manfredi, G., & Moraes, C. T. (2003). A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 98e – 98. <https://doi.org/10.1093/nar/gng100>
- Becquet, D., Francois-Bellan, A.-M., Boudouresque, F., Faudon, M., Hery, F., Guillaume, V., & Hery, M. (1990). Serotonin synthesis from tryptophan by hypothalamic cells in serum-free medium culture. *Developmental Brain Research*, 54(1), 142–146. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90075-a](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90075-a)
- Bellusci, M., Paredes-Fuentes, A. J., Ruiz-Pesini, E., Gómez, B., Martín, M. A., Montoya, J., & Artuch, R. (2021). The Genetic Landscape of Mitochondrial Diseases in Spain: A Nationwide Call. *Genes*, 12(10), 1590. <https://doi.org/10.3390/genes12101590>
- Bereiter-Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells. *Microscopy Res. and Technique.*, 27(3), 198–219. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270303>
- Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W., & Clayton, D. A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26(2 Pt 2), 167–180. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90300-7)
- Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J. P., & Namy, O. (2012). Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 18(11), 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.09.008>
- Blondin, N. A. (2014). Diagnosis and management of periodic hypothermia. *Neurol Clin Pract*,

- 4(1), 26–33. <https://doi.org/10.1212/01.CPJ.0000437350.47610.3a>
- Blumberg, A., Rice, E. J., Kundaje, A., Danko, C. G., & Mishmar, D. (2017). Initiation of mtDNA transcription is followed by pausing, and diverges across human cell types and during evolution. *Genome Research*, *27*(3), 362–373. <https://doi.org/10.1101/gr.209924.116>
- Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, *11*(4), 719–727. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90286-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90286-0)
- Bonekamp, N. A., & Larsson, N.-G. (2018). SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell*, *172*(1–2), 388–388.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.039>
- Borowski, L. S., Dziembowski, A., Hejnowicz, M. S., Stepień, P. P., & Szczesny, R. J. (2013). Human mitochondrial RNA decay mediated by PNPase-hSuv3 complex takes place in distinct foci. *Nucleic Acids Research*, *41*(2), 1223–1240. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1130>
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Bujan, N., Morén, C., García-García, F. J., Blázquez, A., Carnicer, C., Cortés, A. B., González, C., López-Gallardo, E., Lozano, E., Moliner, S., Gort, L., Tobías, E., Delmiro, A., Martín, M. Á., Fernández-Moreno, M. Á., Ruiz-Pesini, E., García-Arumí, E., Rodríguez-Aguilera, J. C., & Garrabou, G. (2022). Multicentric Standardization of Protocols for the Diagnosis of Human Mitochondrial Respiratory Chain Defects. *Antioxidants*, *11*(4), 741. <https://doi.org/10.3390/antiox11040741>
- Calvo, S. E., & Mootha, V. K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *11*, 25–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720>
- Cámara, Y., Asin-Cayuela, J., Park, C. B., Metodiev, M. D., Shi, Y., Ruzzenente, B., Kukat, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K., Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, B. M., Gustafsson, C. M., & Larsson, N.-G. (2011). MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metabolism*, *13*(5), 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.002>
- Cameron, T. A., Matz, L. M., & De Lay, N. R. (2018). Polynucleotide phosphorylase : Not merely an RNase but a pivotal post-transcriptional regulator. *PLoS Genetics*, *14*(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007654>
- Cantó-Santos, J., Grau-Junyent, J. M., & Garrabou, G. (2020). The Impact of Mitochondrial Deficiencies in Neuromuscular Diseases. *Antioxidants*, *9*(10), 964. <https://doi.org/10.3390/antiox9100964>
- Cantor, J. R. (2019). The Rise of Physiologic Media. *Trends in Cell Biology*, *29*(11), 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.08.009>
- Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(2), 351–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.351>
- Chen, H.-W., Rainey, R. N., Balatoni, C. E., Dawson, D. W., Troke, J. J., Wasiak, S., Hong, J. S., McBride, H. M., Koehler, C. M., Teitell, M. A., & French, S. W. (2006). Mammalian Polynucleotide Phosphorylase Is an Intermembrane Space RNase That Maintains Mitochondrial Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(22), 8475–8487.

- <https://doi.org/10.1128/mcb.01002-06>
- Cho, S.-I., Lee, S., Mok, Y. G., Lim, K., Lee, J., Lee, J. M., Chung, E., & Kim, J.-S. (2022). Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, *185*(10), 1764-1776.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.039>
- Chomyn, A. (1996). In Vivo Labeling and Analysis of Human Mitochondrial Translation Products. *Methods in Enzymology*, *264*(1995), 197–211. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)64020-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)64020-8)
- Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A., & Suzuki, T. (2012). LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Research*, *40*(16), 8033–8047. <https://doi.org/10.1093/nar/gks506>
- Clemente, P., Pajak, A., Laine, I., Wibom, R., Wedell, A., Freyer, C., & Wredenberg, A. (2015). SUV3 helicase is required for correct processing of mitochondrial transcripts. *Nucleic Acids Research*, *43*(15), 7398–7413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv692>
- Coble, M. D., Loreille, O. M., Wadhams, M. J., Edson, S. M., Maynard, K., Meyer, C. E., Niederstätter, H., Berger, C., Berger, B., Falsetti, A. B., Gill, P., Parson, W., & Finelli, L. N. (2009). Mystery solved: The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS ONE*, *4*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004838>
- Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *18*, 257–275. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>
- Craven, L., Murphy, J., Turnbull, D. M., Taylor, R. W., Gorman, G. S., & McFarland, R. (2018). Scientific and Ethical Issues in Mitochondrial Donation. *New Bioethics*, *24*(1), 57–73. <https://doi.org/10.1080/20502877.2018.1440725>
- D'Souza, A. R., & Minczuk, M. (2018). Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays in Biochemistry*, *62*(3), 309–320. <https://doi.org/10.1042/EBC20170102>
- Danhauser, K., Iuso, A., Haack, T. B., Freisinger, P., Brockmann, K., Mayr, J. A., Meitinger, T., & Prokisch, H. (2011). Cellular rescue-assay aids verification of causative DNA-variants in mitochondrial complex I deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, *103*(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.03.004>
- Das, S. K., Sokhi, U. K., Bhutia, S. K., Azab, B., Su, Z. Z., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2010). Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(26), 11948–11953. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914143107>
- de la Fuente, C., Burke, D. G., Eaton, S., & Heales, S. J. R. (2017). Inhibition of neuronal mitochondrial complex I or lysosomal glucocerebrosidase is associated with increased dopamine and serotonin turnover. *Neurochemistry International*, *109*, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.013>
- Dhir, A., Dhir, S., Borowski, L. S., Jimenez, L., Teitell, M., Rötig, A., Crow, Y. J., Rice, G. I., Duffy, D., Tamby, C., Nojima, T., Munnich, A., Schiff, M., de Almeida, C. R., Rehwinkel, J., Dziembowski, A., Szczesny, R. J., & Proudfoot, N. J. (2018). Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. *Nature*, *560*(7717), 238–242. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0363-0>
- Distelmaier, F., Haack, T. B., Wortmann, S. B., Mayr, J. A., & Prokisch, H. (2017). Treatable



- mitochondrial diseases: cofactor metabolism and beyond. *Brain*, 140(2), e11. <https://doi.org/10.1093/brain/aww303>
- dos Santos, R. F., Quendera, A. P., Boavida, S., Seixas, A. F., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2018). Major 3'–5' Exoribonucleases in the Metabolism of Coding and Non-coding RNA. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 159, 101–155. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.005>
- Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 578(7794), 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
- Dudek, J., Rehling, P., & van der Laan, M. (2013). Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(2), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.028>
- Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H. P., & Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>
- Ebert, K. M., Liem, H., & Hecht, N. B. (1988). Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82, 145–149. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820145>
- Emperador, S., Garrido-Pérez, N., Amezcua-Gil, J., Gaudó, P., Andrés-Sanz, J. A., Yubero, D., Fernández-Marmiesse, A., O'Callaghan, M. M., Ortigoza-Escobar, J. D., Iriando, M., Ruiz-Pesini, E., García-Cazorla, A., Gil-Campos, M., Artuch, R., Montoya, J., & Bayona-Bafaluy, M. P. (2020). Molecular Characterization of New FBXL4 Mutations in Patients With mtDNA Depletion Syndrome. *Frontiers in Genetics*, 10, 1300. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01300>
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, 78, 533–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>
- Enríquez, J. A., Fernández-Silva, P., Pérez-Martos, A., López-Pérez, M. J., & Montoya, J. (1996). The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP. *European Journal of Biochemistry*, 237(3), 601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0601p.x>
- Esterhuizen, K., van der Westhuizen, F. H., & Louw, R. (2017). Metabolomics of mitochondrial disease. *Mitochondrion*, 35(May), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.05.012>
- Falabella, M., Kolesar, J. E., Wallace, C., de Jesus, D., Sun, L., Taguchi, Y. V., Wang, C., Wang, T., Xiang, I. M., Alder, J. K., Maheshan, R., Horne, W., Turek-Herman, J., Pagano, P. J., St. Croix, C. M., Sondheimer, N., Yatsunyk, L. A., Johnson, F. B., & Kaufman, B. A. (2019). G-quadruplex dynamics contribute to regulation of mitochondrial gene expression. *Scientific Reports*, 9(1), 5605. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41464-y>
- Falchi, F. A., Pizzoccheri, R., & Briani, F. (2022). Activity and Function in Human Cells of the Evolutionary Conserved Exonuclease Polynucleotide Phosphorylase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1652. <https://doi.org/10.3390/ijms23031652>
- Fanciulli, G., Ruggeri, R. M., Grossrubatscher, E., Calzo, F. Lo, Wood, T. D., Faggiano, A., Isidori, A., & Colao, A. (2020). Serotonin pathway in carcinoid syndrome: Clinical, diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21(4), 599–612. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09547-8>
- Fang, F., Liu, Z., Fang, H., Wu, J., Shen, D., Sun, S., Ding, C., Han, T., Wu, Y., Lv, J., Yang, L., Li, S.,

- Lv, J., & Shen, Y. (2017). The clinical and genetic characteristics in children with mitochondrial disease in China. *Science China Life Sciences*, *60*(7), 746–757. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9080-y>
- Fanibunda, S. E., Deb, S., Maniyadath, B., Tiwari, P., Ghai, U., Gupta, S., Figueiredo, D., Weisstaub, N., Gingrich, J. A., Vaidya, A. D. B., Kolthur-Seetharam, U., & Vaidya, V. A. (2019). Serotonin regulates mitochondrial biogenesis and function in rodent cortical neurons via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and SIRT1–PGC-1 $\alpha$  axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *166*(22), 11028–11037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821332116>
- Farge, G., Mehmedovic, M., Baclayon, M., VandenWildenberg, S. M. J. L., Roos, W. H., Gustafsson, C. M., Wuite, G. J. L., & Falkenberg, M. (2014). In vitro-reconstituted nucleoids can block mitochondrial DNA replication and transcription. *Cell Reports*, *8*(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.046>
- Fei, Z.-Y., Wang, W.-S., Li, S.-F., Zi, J.-J., Yang, L., Liu, T., Ao, S., Liu, Q.-Q., Cui, Q.-H., Yu, M., & Xiong, W. (2020). High expression of the TEFM gene predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *11*(6), 1291–1304. <https://doi.org/10.21037/JGO-20-120>
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V., & Attardi, G. (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO Journal*, *16*(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1066>
- Fernández-Vizarra, E., Fernández-Silva, P., & Enríquez, J. A. (2006). Isolation of mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Cell Biology* (3a. ed., vol. 2, pp. 69–77). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50082-4>
- Fiala, G. J., Schamel, W. W. A., & Blumenthal, B. (2011). Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for Analysis of Multiprotein Complexes from Cellular Lysates. *Journal of Visualized Experiments*, *48*, 2164.
- Franco, D. G., Moretti, I. F., & Marie, S. K. N. (2018). Mitochondria Transcription Factor A: A Putative Target for the Effect of Melatonin on U87MG Malignant Glioma Cell Line. *Molecules*, *23*(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules23051129>
- Frazier, A. E., Thorburn, D. R., & Compton, A. G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(14), 5386–5395. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.809194>
- Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiumi, T., Jacobs, H. T., & Kang, D. (2009). DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes to Cells*, *14*(8), 1029–1042. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01328.x>
- Fusté, J. M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C. E., Cluett, T. J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I. J., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA Polymerase Is Needed for Activation of the Origin of Light-Strand DNA Replication. *Molecular Cell*, *37*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.021>
- Gallardo, M. E., García-Pavía, P., Chamorro, R., Vázquez, M. E., Gómez-Bueno, M., Millán, I., Almoquera, B., Domingo, V., Segovia, J., Vilches, C., Alonso-Pulpón, L., Garesse, R., & Bornstein, B. (2012). Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *European Heart Journal*, *33*(3), 346–353. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr280>

- Gammage, P. A., Moraes, C. T., & Minczuk, M. (2018). Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-ized. *Trends in Genetics*, 34(2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.001>
- Gammage, P. A., Rorbach, J., Vincent, A. I., Rebar, E. J., & Minczuk, M. (2014). Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Molecular Medicine*, 6(4), 458–466. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303672>
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace aD., C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
- Gohil, V. M., Nilsson, R., Belcher-Timme, C. A., Luo, B., Root, D. E., & Mootha, V. K. (2010). Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13742–13747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098400>
- Goldfarb, K. C., & Cech, T. R. (2017). Targeted CRISPR disruption reveals a role for RNase MRP RNA in human preribosomal RNA processing. *Genes and Development*, 31(1), 59–71. <https://doi.org/10.1101/gad.286963.116>
- Golzarroshan, B., Lin, C.-L., Li, C.-L., Yang, W.-Z., Chu, L.-Y., Agrawal, S., & Yuan, H. S. (2018). Crystal structure of dimeric human PNPase reveals why disease-linked mutants suffer from low RNA import and degradation activities. *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8630–8640. <https://doi.org/10.1093/nar/gky642>
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- Gorman, G. S., Schaefer, A. M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E. L., Alston, C. L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P. F., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., & McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*, 77(5), 753–759. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., Boutant, M., Wang, X., Conde, S. A., Ofori, E., Auwerx, J., Cantó, C., & Amati, F. (2017). Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, 25(2), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.004>
- Grier, J., Hirano, M., Karaa, A., Shepard, E., & Thompson, J. L. P. (2018). Diagnostic odyssey of patients with mitochondrial disease: Results of a survey. *Neurology: Genetics*, 4(2), e230. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000230>
- Grochowska, J., Czerwinska, J., Borowski, L. S., & Szczesny, R. J. (2022). Mitochondrial RNA, a new trigger of the innate immune system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 13(3), e1690. <https://doi.org/10.1002/wrna.1690>
- Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J., & Ochoa, S. (1955). Enzymatic Synthesis of Nucleic Acidlike Polynucleotides. *Science*, 122(3176), 907–910. <https://doi.org/10.1126/science.122.3176.907>
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N.-G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 133–160.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>
- Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants and Redox Signaling*, *16*(11), 1323–1367. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4123>
- Hasegawa, H., & Nakamura, K. (2010). Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, *21*, 183–202. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70078-3](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70078-3)
- Hauenstein, S., Zhang, C.-M., Hou, Y.-M., & Perona, J. J. (2004). Shape-selective RNA recognition by cysteinyl-tRNA synthetase. *Nature Structural and Molecular Biology*, *11*(11), 1134–1141. <https://doi.org/10.1038/nsmb849>
- Hedlund, P. B., Kelly, L., Mazur, C., Lovenberg, T., Sutcliffe, J. G., & Bonaventure, P. (2004). 8-OH-DPAT acts on both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors to induce hypothermia in rodents. *European Journal of Pharmacology*, *487*(1–3), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.01.031>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, *324*(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Hillen, H. S., Morozov, Y. I., Sarfallah, A., Temiakov, D., & Cramer, P. (2017). Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation. *Cell*, *171*(5), 1072.e10-1081.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.036>
- Hillen, H. S., Parshin, A. V., Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Graber, J. J., Chernev, A., Schwinghammer, K., Urlaub, H., Anikin, M., Cramer, P., & Temiakov, D. (2017). Mechanism of Transcription Anti-termination in Human Mitochondria. *Cell*, *171*(5), 1082-1093.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.035>
- Hillen, H. S., Temiakov, D., & Cramer, P. (2018). Structural basis of mitochondrial transcription. *Nature Structural and Molecular Biology*, *25*(9), 754–765. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0122-9>
- Hodges, M. R., Tattersall, G. J., Harris, M. B., McEvoy, S. D., Richerson, D. N., Deneris, E. S., Johnson, R. L., Chen, Z. F., & Richerson, G. B. (2008). Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *Journal of Neuroscience*, *28*(10), 2495–2505. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4729-07.2008>
- Hofhaus, G., Shakeley, R. M., & Attardi, G. (1996). Use of Polarography to Detect Respiration Defects in Cell Cultures. *Methods in Enzymology*, *264*, 476–483. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)64043-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)64043-9)
- Holt, I. J., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, *331*(6158), 717–719. <https://doi.org/10.1038/331717a0>
- Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C., & Rossmannith, W. (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*, *135*(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.013>
- Honarmand, S., & Shoubridge, E. A. (2020). Poly (A) tail length of human mitochondrial mRNAs is tissue-specific and a mutation in LRPPRC results in transcript-specific patterns of deadenylation. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *25*, 100687.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100687>

- Hudson, G., Carelli, V., Spruijt, L., Gerards, M., Mowbray, C., Achilli, A., Pyle, A., Elson, J., Howell, N., La Morgia, C., Valentino, M. L., Huoponen, K., Savontaus, M.-L., Nikoskelainen, E., Sadun, A. A., Salomao, S. R., Belfort, R., Griffiths, P., Man, P. Y. W., ... Chinnery, P. F. (2007). Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *American Journal of Human Genetics*, *81*(2), 228–233. <https://doi.org/10.1086/519394>
- Ishiwata, T. (2014). Role of serotonergic system in thermoregulation in rats. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, *3*(4), 445–450. <https://doi.org/10.7600/jpfs.3.445>
- Jacobs, H. T., & Turnbull, D. M. (2005). Nuclear genes and mitochondrial translation: A new class of genetic disease. *Trends in Genetics*, *21*(6), 312–314. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.04.003>
- Jacobson, M. R., Cao, L.-G., Wang, Y.-L., & Pederson, T. (1995). Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *Journal of Cell Biology*, *131*(6 Pt 2), 1649–1658. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1649>
- Jain, M., Golzarroshan, B., Lin, C.-L., Agrawal, S., Tang, W.-H., Wu, C.-J., & Yuan, H. S. (2022). Dimeric assembly of human Suv3 helicase promotes its RNA unwinding function in mitochondrial RNA degradosome for RNA decay. *Protein Science*, *31*(5), 1–17. <https://doi.org/10.1002/pro.4312>
- Jeandard, D., Smirnova, A., Tarassov, I., Barrey, E., Smirnov, A., & Entelis, N. (2019). Import of Non-Coding RNAs into Human Mitochondria: A Critical Review and Emerging Approaches. *Cells*, *8*(3), 286. <https://doi.org/10.3390/cells8030286>
- Jedynak-Slyvka, M., Jabczynska, A., & Szczesny, R. J. (2021). Human mitochondrial RNA Processing and Modifications: Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 7999. <https://doi.org/10.3390/ijms22157999>
- Jemt, E., Persson, Ö., Shi, Y., Mehmedovic, M., Uhler, J. P., López, M. D., Freyer, C., Gustafsson, C. M., Samuelsson, T., & Falkenberg, M. (2015). Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element. *Nucleic Acids Research*, *43*(19), 9262–9275. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv804>
- Ježek, P., Špaček, T., Tauber, J., & Pavluch, V. (2019). Mitochondrial Nucleoids: Superresolution microscopy analysis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *106*(75), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.10.012>
- Jiang, M., Xie, X., Zhu, X., Jiang, S., Milenkovic, D., Misic, J., Shi, Y., Tandukar, N., Li, X., Atanassov, I., Jenninger, L., Hoberg, E., Albarran-Gutierrez, S., Szilagyi, Z., Macao, B., Siira, S. J., Carelli, V., Griffith, J. D., Gustafsson, C. M., ... Falkenberg, M. (2021). The mitochondrial single-stranded DNA binding protein is essential for initiation of mtDNA replication. *Science Advances*, *7*(27), eabf8631. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8631>
- Jiang, S., Koolmeister, C., Misic, J., Siira, S., Kühl, I., Silva Ramos, E., Miranda, M., Jiang, M., Posse, V., Lytovchenko, O., Atanassov, I., Schober, F. A., Wibom, R., Hultenby, K., Milenkovic, D., Gustafsson, C. M., Filipovska, A., & Larsson, N. (2019). TEFM regulates both transcription elongation and RNA processing in mitochondria. *EMBO Reports*, *20*(6), e48101. <https://doi.org/10.15252/embr.201948101>
- Jourdain, A. A., Boehm, E., Maundrell, K., & Martinou, J.-C. (2016). Mitochondrial RNA granules: Compartmentalizing mitochondrial gene expression. *Journal of Cell Biology*, *212*(6), 611–

614. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507125>
- Jourdain, A. A., Koppen, M., Wydro, M., Rodley, C. D., Lightowers, R. N., Chrzanowska-Lightowers, Z. M., & Martinou, J.-C. (2013). GRSF1 regulates RNA processing in mitochondrial RNA granules. *Cell Metabolism*, 17(3), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.005>
- Kaneda, H., Hayashi, J.-I., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. F., & Yonekawa, H. (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4542–4546. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4542>
- Kartvelishvili, E., Tworowski, D., Vernon, H., Moor, N., Wang, J., Wong, L.-J., Chrzanowska-Lightowers, Z., & Safro, M. (2017). Kinetic and structural changes in HsmtPheRS, induced by pathogenic mutations in human FARS2. *Protein Science*, 26(8), 1505–1516. <https://doi.org/10.1002/pro.3176>
- Kauppila, T. E. S., Kauppila, J. H. K., & Larsson, N.-G. (2017). Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metabolism*, 25(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.017>
- Kim, H. J., & Winge, D. R. (2013). Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(5), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.012>
- Kiss, T., & Filipowicz, W. (1992). Evidence against a Mitochondrial Location of the 7-2/MRP RNA in Mammalian Cells. *Cell*, 70(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90528-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90528-k)
- Klipcan, L., Levin, I., Kessler, N., Moor, N., Finarov, I., & Safro, M. (2008). The tRNA-Induced Conformational Activation of Human Mitochondrial Phenylalanyl-tRNA Synthetase. *Structure*, 16(7), 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.03.020>
- Kohda, M., Tokuzawa, Y., Kishita, Y., Nyuzuki, H., Moriyama, Y., Mizuno, Y., Hirata, T., Yatsuka, Y., Yamashita-Sugahara, Y., Nakachi, Y., Kato, H., Okuda, A., Tamaru, S., Borna, N. N., Banshoya, K., Aigaki, T., Sato-Miyata, Y., Ohnuma, K., Suzuki, T., ... Okazaki, Y. (2016). A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genetics*, 12(1), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005679>
- Koppen, M., Metodiev, M. D., Casari, G., Rugarli, E. I., & Langer, T. (2007). Variable and Tissue-Specific Subunit Composition of Mitochondrial m<sup>-</sup>AAA Protease Complexes Linked to Hereditary Spastic Paraplegia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2), 758–767. <https://doi.org/10.1128/mcb.01470-06>
- Kornblum, C., Nicholls, T. J., Haack, T. B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., Wieland, T., Sciacco, M., Ronchi, D., Comi, G. P., Moggio, M., Quinzii, C. M., Dimauro, S., Calvo, S. E., Mootha, V. K., ... Prokisch, H. (2013). Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature Genetics*, 45(2), 214–219. <https://doi.org/10.1038/ng.2501>
- Kotrys, A. V., Cysewski, D., Czarnomska, S. D., Pietras, Z., Borowski, L. S., Dziembowski, A., & Szczesny, R. J. (2019). Quantitative proteomics revealed C6orf203/MTRES1 as a factor preventing stress-induced transcription deficiency in human mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 47(14), 7502–7517. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz542>
- Kroke, A., & Dierkes, J. (2005). Urinary Markers of Alcohol Consumption. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology*, 3, 1445–1458. <https://doi.org/10.1016/B978->

012564370-2/50109-4

- Kruse, B., Narasimhan, N., & Attardi, G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*, *58*(2), 391–397. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90853-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90853-2)
- Kühl, I., Miranda, M., Posse, V., Milenkovic, D., Mourier, A., Siira, S. J., Bonekamp, N. A., Neumann, U., Filipovska, A., Polosa, P. L., Gustafsson, C. M., & Larsson, N.-G. (2016). POLRMT regulates the switch between replication primer formation and gene expression of mammalian mtDNA. *Science Advances*, *2*(8), e1600963. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600963>
- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., Spähr, H., Bonekamp, N. A., Kühl, I., Joos, F., Polosa, P. L., Park, C. B., Posse, V., Falkenberg, M., Jakobs, S., Kühlbrandt, W., & Larsson, N.-G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(36), 11288–11293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512131112>
- Kurosaki, T., Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(7), 406–420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>
- Kuschal, C., DiGiovanna, J. J., Khan, S. G., Gatti, R. A., & Kraemer, K. H. (2013). Repair of UV photolesions in xeroderma pigmentosum group C cells induced by translational readthrough of premature termination codons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(48), 19483–19488. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312088110>
- Kwak, H., & Lis, J. T. (2013). Control of transcriptional elongation. *Annual Review of Genetics*, *47*, 483–508. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155440>
- Lapuate Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., & Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, *340*(6140), 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Leary, S. C., & Sasarman, F. (2009). Oxidative Phosphorylation: Synthesis of Mitochondrially Encoded Proteins and Assembly of Individual Structural Subunits into Functional Holoenzyme Complexes. *Methods in Molecular Biology*, *554*, 143–162. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-521-3>
- Lee, J. S., Yoo, T., Lee, M., Lee, Y., Jeon, E., Kim, S. Y., Lim, B. C., Kim, K. J., Choi, M., & Chae, J.-H. (2020). Genetic heterogeneity in Leigh syndrome: Highlighting treatable and novel genetic causes. *Clinical Genetics*, *97*(4), 586–594. <https://doi.org/10.1111/cge.13713>
- Lee, S. R., & Han, J. (2017). Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 8060949. <https://doi.org/10.1155/2017/8060949>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., ... MacArthur, D. G. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, *536*(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>

- Leszczyniecka, M., Kang, D., Sarkar, D., Su, Z. zhong, Holmes, M., Valerie, K., & Fisher, P. B. (2002). Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16636–16641. <https://doi.org/10.1073/pnas.252643699>
- Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural and Molecular Biology*, *24*(10), 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>
- Li, S., Wang, W., Zi, J., Sun, M., Mei, W., Yang, N., Zhang, R., Yu, M., & Xiong, W. (2020). Elevated expression of mitochondrial transcription elongation factor (TEFM) predicts poor prognosis in low grade glioma - an analysis of the Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset. *Translational Cancer Research*, *9*(5), 3610–3622. <https://doi.org/10.21037/tcr.2020.04.16>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lightowers, R. N., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science*, *349*(6255), 1494–1499. <https://doi.org/10.1126/science.aac7516>
- Lin, C. L., Wang, Y.-T., Yang, W.-Z., Hsiao, Y.-Y., & Yuan, H. S. (2012). Crystal structure of human polynucleotide phosphorylase : insights into its domain function in RNA binding and degradation. *Nucleic Acids Research*, *40*(9), 4146–4157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1281>
- Linder, T., Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N.-G., Falkenberg, M., Samuelsson, T., & Gustafsson, C. M. (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Current Genetics*, *48*(4), 265–269. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0022-5>
- Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., & Temiakov, D. (2010). Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18129–18133. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.128918>
- Liu, X., Fu, R., Pan, Y., Meza-Sosa, K. F., Zhang, Z., & Lieberman, J. (2018). PNPT1 Release from Mitochondria during Apoptosis Triggers Decay of Poly(A) RNAs. *Cell*, *174*(1), 187–201.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.017>
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, *86*(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9)
- Lodeiro, M. F., Uchida, A., Bestwick, M., Moustafa, I. M., Arnold, J. J., Shadel, G. S., & Cameron, C. E. (2012). Transcription from the second heavy-strand promoter of human mtDNA is repressed by transcription factor A in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(17), 6513–6518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118710109>
- López-Pérez, M. J., & Montoya, J. (2012). Sistema genético mitocondrial humano. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 31–46.
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Michael Xie, H., Chalkia, D., Sarmady, M., Procaccio, V.,



- & Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current Protocols in Bioinformatics*, 44(123), 1.23.1-26. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44>
- Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y. I., Venkatesh, S., Bogenhagen, D. F., Temiakov, D., & Suzuki, C. K. (2013). Phosphorylation of Human TFAM in Mitochondria Impairs DNA Binding and Promotes Degradation by the AAA+ Lon Protease. *Molecular Cell*, 49(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.023>
- Lyonnais, S., Tarrés-Soler, A., Rubio-Cosials, A., Cuppari, A., Brito, R., Jaumot, J., Gargallo, R., Vilaseca, M., Silva, C., Granzhan, A., Teulade-Fichou, M.-P., Eritja, R., & Solà, M. (2017). The human mitochondrial transcription factor A is a versatile G-quadruplex binding protein. *Scientific Reports*, 7, 43992. <https://doi.org/10.1038/srep43992>
- Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research*, 100(4), 460–473. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258450.44413.96>
- Majorek, K. A., Dunin-Horkawicz, S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Nowotny, M., Ginalski, K., & Bujnicki, J. M. (2014). The RNase H-like superfamily: new members, comparative structural analysis and evolutionary classification. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4160–4179. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1414>
- Martin, M., Cho, J., Cesare, A. J., Griffith, J. D., & Attardi, G. (2005). Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell*, 123(7), 1227–1240. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.040>
- Masruha, M. R., Lin, J., Arita, J. H., De Castro Neto, E. F., Scerni, D. A., Cavalheiro, E. A., Mazzacoratti, M. D. G. N., & Vilanova, L. C. P. (2011). Spontaneous periodic hypothermia and hyperhidrosis: a possibly novel cerebral neurotransmitter disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 53(4), 378–380. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2010.03854.x>
- Matilainen, S., Carroll, C. J., Richter, U., Euro, L., Pohjanpelto, M., Paetau, A., Isohanni, P., & Suomalainen, A. (2017). Defective mitochondrial RNA processing due to PNPT1 variants causes Leigh syndrome. *Human Molecular Genetics*, 26(17), 3352–3361. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx221>
- McCormick, E. M., Lott, M. T., Dulik, M. C., Shen, L., Attimonelli, M., Vitale, O., Karaa, A., Bai, R., Pineda-Alvarez, D. E., Singh, L. N., Stanley, C. M., Wong, S., Bhardwaj, A., Merkurjev, D., Mao, R., Sondheimer, N., Zhang, S., Procaccio, V., Wallace, D. C., ... Falk, M. J. (2020). Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Human Mutation*, 41(12), 2028–2057. <https://doi.org/10.1002/humu.24107>
- Mercer, T. R., Neph, S., Dinger, M. E., Crawford, J., Smith, M. A., Shearwood, A.-M. J., Haugen, E., Bracken, C. P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J. A., Filipovska, A., & Mattick, J. S. (2011). The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, 146(4), 645–658. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.051>
- Metodiev, M. D., Lesko, N., Park, C. B., Cámara, Y., Shi, Y., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C. M., & Larsson, N. G. (2009). Methylation of 12S rRNA Is Necessary for In Vivo Stability of the Small Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Cell Metabolism*, 9(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.03.001>
- Metodiev, M. D., Spähr, H., Loguercio Polosa, P., Meharg, C., Becker, C., Altmueller, J.,

- Habermann, B., Larsson, N.-G., & Ruzzenente, B. (2014). NSUN4 Is a Dual Function Mitochondrial Protein Required for Both Methylation of 12S rRNA and Coordination of Mitoribosomal Assembly. *PLoS Genetics*, *10*(2), e1004110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004110>
- Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., Nijtmans, L. G. J., Huynen, M. A., & Holt, I. J. (2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(10), 4284–4299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1224>
- Minczuk, M., Piwowarski, J., Papworth, M. A., Awiszus, K., Schalinski, S., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Bartnik, E., Tokatlidis, K., Stepien, P. P., & Borowski, P. (2002). Localisation of the human hSuv3p helicase in the mitochondrial matrix and its preferential unwinding of dsDNA. *Nucleic Acids Research*, *30*(23), 5074–5086. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf647>
- Mitchell, S. L., Goodloe, R., Brown-Gentry, K., Pendergrass, S. A., Murdock, D. G., & Crawford, D. C. (2014). Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Human Genetics*, *133*(7), 861–868. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1421-9>
- Mok, B. Y., de Moraes, M. H., Zeng, J., Bosch, D. E., Kotrys, A. V., Raguram, A., Hsu, F. S., Radey, M. C., Peterson, S. B., Mootha, V. K., Mougous, J. D., & Liu, D. R. (2020). A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, *583*(7817), 631–637. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2477-4>
- Montoya, J. (2005). Biogénesis y Patología Mitocondrial. *Revista de La Real Academia de Ciencias de Zaragoza*, *60*, 7–28.
- Montoya, J. (2010). *Del Genoma Mitocondrial a la Enfermedad* (1a. ed.). Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., & Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(23), 7195–7199. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.23.7195>
- Montoya, J., Gaines, G. L., & Attardi, G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*, *34*(1), 151–159. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90145-9)
- Montoya, J., López-Pérez, M. J., & Ruiz-Pesini, E. (2006). Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1757*(9–10), 1179–1189. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.023>
- Montoya, J., Ojala, D., & Attardi, G. (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, *290*(5806), 465–470. <https://doi.org/10.1038/290465a0>
- Morava, E., van Den Heuvel, L., Hol, F., de Vries, M. C., Hogeveen, M., Rodenburg, R. J., & Smeitink, J. A. M. (2006). Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology*, *67*(10), 1823–1826. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244435.27645.54>
- Mossmann, D., Meisinger, C., & Vögtle, F. N. (2012). Processing of mitochondrial presequences. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9–10), 1098–1106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.11.007>
- Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., & Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis,

- molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *Journal of Human Genetics*, 64(2), 113–125. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0528-6>
- Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., & Ueda, T. (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19721–19727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500804200>
- Nagao, A., Hino-Shigi, N., & Suzuki, T. (2008). Measuring mRNA Decay in Human Mitochondria. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 447). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02223-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02223-4)
- Nass, M. M., & Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers With DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *Journal of Cell Biology*, 19(3), 593–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>
- Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega.
- Nesbitt, V., Pitceathly, R. D. S., Turnbull, D. M., Taylor, R. W., Sweeney, M. G., Mudanohwo, E. E., Rahman, S., Hanna, M. G., & McFarland, R. (2013). The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation - implications for diagnosis and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 84(8), 936–938. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-303528>
- Newberry, K. J., Hou, Y.-M., & Perona, J. J. (2002). Structural origins of amino acid selection without editing by cysteinyl-tRNA synthetase. *EMBO Journal*, 21(11), 2778–2787. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2778>
- Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>
- Nicholls, T. J., Nadalutti, C. A., Motori, E., Sommerville, E. W., Gorman, G. S., Basu, S., Hoberg, E., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F., Larsson, N.-G., Larsson, E., Falkenberg, M., Taylor, R. W., Griffith, J. D., & Gustafsson, C. M. (2018). Topoisomerase 3 $\alpha$  Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. *Molecular Cell*, 69(1), 9-23.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.033>
- Nicholls, T. J., Spåhr, H., Jiang, S., Siira, S. J., Koolmeister, C., Sharma, S., Kauppila, J. H. K., Jiang, M., Kaefer, V., Rackham, O., Chabes, A., Falkenberg, M., Filipovska, A., Larsson, N.-G., & Gustafsson, C. M. (2019). Dinucleotide Degradation by REXO2 Maintains Promoter Specificity in Mammalian Mitochondria. *Molecular Cell*, 76(5), 784-796.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.010>
- Nicholls, T. J., Zsurka, G., Peeva, V., Schöler, S., Szczesny, R. J., Cysewski, D., Reyes, A., Kornblum, C., Sciacco, M., Moggio, M., Dziembowski, A., Kunz, W. S., & Minczuk, M. (2014). Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6147–6162. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu336>
- Ohkubo, A., van Haute, L., Rudler, D. L., Stentenbach, M., Steiner, F. A., Rackham, O., Minczuk, M., Filipovska, A., & Martinou, J.-C. (2021). The FASTK family proteins fine-tune mitochondrial RNA processing. *PLoS Genetics*, 17(11), e1009873. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009873>
- Ojala, D., Crews, S., Montoya, J., Gelfand, R., & Attardi, G. (1981). A Small Polyadenylated RNA (7

- S RNA), Containing a Putative Ribosome Attachment Site, Maps Near the Origin of Human Mitochondrial DNA Replication. *Journal of Molecular Biology*, 150(2), 303–314. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90454-x)
- Ojala, D., Montoya, J., & Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290(5806), 470–474. <https://doi.org/10.1038/290470a0>
- Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>
- Oláhová, M., Peter, B., Szilagyi, Z., Diaz-Maldonado, H., Singh, M., Sommerville, E. W., Blakely, E. L., Collier, J. J., Hoberg, E., Stránecký, V., Hartmannová, H., Bleyer, A. J., McBride, K. L., Bowden, S. A., Korandová, Z., Pecinová, A., Ropers, H. H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., ... Taylor, R. W. (2021). POLRMT mutations impair mitochondrial transcription causing neurological disease. *Nature Communications*, 12(1), 1135. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21279-0>
- Pacheu-Grau, D., Gómez-Durán, A., López-Gallardo, E., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2012). Read-through therapy for mitochondrial DNA nonsense mutations. *Drug Discovery Today*, 17(19–20), 1063–1067. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.04.012>
- Pacheu-Grau, D., Gómez-Durán, A., López-Pérez, M. J., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2010). Mitochondrial pharmacogenomics: barcode for antibiotic therapy. *Drug Discovery Today*, 15(1–2), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.008>
- Pajak, A., Laine, I., Clemente, P., El-Fissi, N., Schober, F. A., Maffezzini, C., Calvo-Garrido, J., Wibom, R., Filograna, R., Dhir, A., Wedell, A., Freyer, C., & Wredenberg, A. (2019). Defects of mitochondrial RNA turnover lead to the accumulation of double-stranded RNA in vivo. *PLoS Genetics*, 15(7), e1008240. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008240>
- Parikh, S., Karaa, A., Goldstein, A., Bertini, E. S., Chinnery, P. F., Christodoulou, J., Cohen, B. H., Davis, R. L., Falk, M. J., Fratter, C., Horvath, R., Koenig, M. K., Mancuso, M., McCormack, S., McCormick, E. M., McFarland, R., Nesbitt, V., Schiff, M., Steele, H., ... Rahman, S. (2019). Diagnosis of “possible” mitochondrial disease: an existential crisis. *Journal of Medical Genetics*, 56(3), 123–130. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105800>
- Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Cámara, Y., Shi, Y., Pellegrini, M., Gaspari, M., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., & Larsson, N.-G. (2007). MTERF3 Is a Negative Regulator of Mammalian mtDNA Transcription. *Cell*, 130(2), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.046>
- Peeva, V., Blei, D., Trombly, G., Corsi, S., Szukszto, M. J., Rebelo-Guiomar, P., Gammage, P. A., Kudin, A. P., Becker, C., Altmüller, J., Minczuk, M., Zsurka, G., & Kunz, W. S. (2018). Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery. *Nature Communications*, 9(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04131-w>
- Pennisi, A., Rötig, A., Roux, C.-J., Lévy, R., Henneke, M., Gärtner, J., Teke Kisa, P., Sarioglu, F. C., Yiş, U., Konczal, L. L., Burkardt, D. D., Wu, S., Gaignard, P., Besmond, C., Hubert, L., Rio, M., Barcia, G., Munnich, A., Boddaert, N., & Schiff, M. (2022). Heterogeneity of PNPT1 neuroimaging: Mitochondriopathy, interferonopathy or both? *Journal of Medical Genetics*, 59(2), 204–208. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2020-107367>
- Pesini, A., Iglesias, E., Garrido, N., Bayona-Bafaluy, M. P., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2014). OXPPOS, Pyrimidine Nucleotides, and Alzheimer’s Disease: A Pharmacogenomics Approach. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 42(1), 87–96. <https://doi.org/10.3233/JAD->

140384

- Peter, B., & Falkenberg, M. (2020). TWINKLE and Other Human Mitochondrial DNA Helicases: Structure, Function and Disease. *Genes*, *11*(4), 408. <https://doi.org/10.3390/genes11040408>
- Piechota, J., Tomecki, R., Gewartowski, K., Szczęsny, R., Dmochowska, A., Kudła, M., Dybczyńska, L., Stepień, P. P., & Bartnik, E. (2006). Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells. *Acta Biochimica Polonica*, *53*(1), 157–167. [https://doi.org/10.18388/abp.2006\\_3374](https://doi.org/10.18388/abp.2006_3374)
- Pietras, Z., Wojcik, M. A., Borowski, L. S., Szewczyk, M., Kulinski, T. M., Cysewski, D., Stepień, P. P., Dziembowski, A., & Szczęsny, R. J. (2018a). Controlling the mitochondrial antisense–role of the SUV3-PNPase complex and its co-factor GRSF1 in mitochondrial RNA surveillance. *Molecular and Cellular Oncology*, *5*(6), e1516452. <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1516452>
- Pietras, Z., Wojcik, M. A., Borowski, L. S., Szewczyk, M., Kulinski, T. M., Cysewski, D., Stepień, P. P., Dziembowski, A., & Szczęsny, R. J. (2018b). Dedicated surveillance mechanism controls G-quadruplex forming non-coding RNAs in human mitochondria. *Nature Communications*, *9*(1), 2558. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05007-9>
- Pitceathly, R. D. S., Keshavan, N., Rahman, J., & Rahman, S. (2021). Moving towards clinical trials for mitochondrial diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *44*(1), 22–41. <https://doi.org/10.1002/jimd.12281>
- Popow, J., Alleaume, A.-M., Curk, T., Schwarzl, T., Sauer, S., & Hentze, M. W. (2015). FASTKD2 is an RNA-binding protein required for mitochondrial RNA processing and translation. *RNA*, *21*(11), 1873–1884. <https://doi.org/10.1261/rna.052365.115>
- Posse, V., Al-Behadili, A., Uhler, J. P., Clausen, A. R., Reyes, A., Zeviani, M., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2019). RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. *PLoS Genetics*, *15*(1), e1007781. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007781>
- Posse, V., Shahzad, S., Falkenberg, M., Hällberg, B. M., & Gustafsson, C. M. (2015). TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Research*, *43*(5), 2615–2624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv105>
- Prieto-Martín, A., Montoya, J., & Martínez-Azorín, F. (2004). Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA. *Nucleic Acids Research*, *32*(7), 2059–2068. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh528>
- Prokhorova, I., Altman, R. B., Djumagulov, M., Shrestha, J. P., Urzhumtsev, A., Ferguson, A., Chang, C.-W. T., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Yusupova, G., & Puglisi, J. D. (2017). Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(51), E10899–E10908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715501114>
- Pronicka, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Ciara, E., Trubicka, J., Rokicki, D., Karkucinska-Wieckowska, A., Pajdowska, M., Jurkiewicz, E., Halat, P., Kosinska, J., Pollak, A., Rydzanicz, M., Stawinski, P., Pronicki, M., Krajewska-Walasek, M., & Płoski, R. (2016). New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0930-9>

- Pyle, A., Hudson, G., Wilson, I. J., Coxhead, J., Smertenko, T., Herbert, M., Santibanez-Koref, M., & Chinnery, P. F. (2015). Extreme-Depth Re-sequencing of Mitochondrial DNA Finds No Evidence of Paternal Transmission in Humans. *PLoS Genetics*, *11*(5), e1005040. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005040>
- Qian, Z., & Wilusz, J. (1994). GRSF-1: a poly(A)+ mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element. *Nucleic Acids Research*, *22*(12), 2334–2343. <https://doi.org/10.1093/nar/22.12.2334>
- Rahman, S. (2020). Mitochondrial disease in children. *Journal of Internal Medicine*, *287*(6), 609–633. <https://doi.org/10.1111/joim.13054>
- Ramos, E. S., Motori, E., Brüser, C., Kühl, I., Yeroslaviz, A., Ruzzenente, B., Kauppila, J. H. K., Busch, J. D., Hultenby, K., Habermann, B. H., Jakobs, S., Larsson, N.-G., & Mourier, A. (2019). Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. *PLoS Genetics*, *15*(6), e1008085. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008085>
- Rath, S., Sharma, R., Gupta, R., Ast, T., Chan, C., Durham, T. J., Goodman, R. P., Grabarek, Z., Haas, M. E., Hung, W. H. W., Joshi, P. R., Jourdain, A. A., Kim, S. H., Kotrys, A. V., Lam, S. S., McCoy, J. G., Meisel, J. D., Miranda, M., Panda, A., ... Mootha, V. K. (2021). MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1541–D1547. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>
- Ravanidis, S., & Doxakis, E. (2020). RNA-Binding Proteins Implicated in Mitochondrial Damage and Mitophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 372. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00372>
- Ray, R. S., Corcoran, A. E., Brust, R. D., Kim, J. C., Richerson, G. B., Nattie, E., & Dymecki, S. M. (2011). Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science*, *333*(6042), 637–642. <https://doi.org/10.1126/science.1205295>
- Reinauer, C., Meissner, T., Roden, M., Thon, A., Holterhus, P.-M., Haberland, H., Binder, E., Marg, W., Bollow, E., & Holl, R. (2016). Low prevalence of patients with mitochondrial disease in the German/Austrian DPV diabetes registry. *European Journal of Pediatrics*, *175*(5), 613–622. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2675-5>
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., & Yao, X. (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Research*, *19*(2), 271–273. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.6>
- Rey, T., Zaganelli, S., Cuillery, E., Vartholomaiou, E., Croisier, M., Martinou, J.-C., & Manley, S. (2020). Mitochondrial RNA granules are fluid condensates positioned by membrane dynamics. *Nature Cell Biology*, *22*(10), 1180–1186. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00584-8>
- Reyes, A., Melchionda, L., Nasca, A., Carrara, F., Lamantea, E., Zanolini, A., Lamperti, C., Fang, M., Zhang, J., Ronchi, D., Bonato, S., Fagiolari, G., Moggio, M., Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2015). RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, *97*(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.05.013>
- Reyes, A., Rusecka, J., Tońska, K., & Zeviani, M. (2020). RNase H1 Regulates Mitochondrial Transcription and Translation via the Degradation of 7S RNA. *Frontiers in Genetics*, *10*, 1393. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01393>
- Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013).

- Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y. I., Litonin, D., Cramer, P., & Temiakov, D. (2011). Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, 478(7368), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature10435>
- Rius, R., Van Bergen, N. J., Compton, A. G., Riley, L. G., Kava, M. P., Balasubramaniam, S., Amor, D. J., Fanjul-Fernandez, M., Cowley, M. J., Fahey, M. C., Koenig, M. K., Enns, G. M., Sadedin, S., Wilson, M. J., Tan, T. Y., Thorburn, D. R., & Christodoulou, J. (2019). Clinical spectrum and functional consequences associated with bi-allelic pathogenic PNPT1 variants. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm8112020>
- Robberson, D. L., Kasamatsu, H., & Vinograd, J. (1972). Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(3), 737–741. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.3.737>
- Robinson, B. H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J. R., & Wallace, D. C. (1992). Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 48(2), 122–126. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(92\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0885-4505(92)90056-5)
- Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., & Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*, 27(21), R1177–R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Rorbach, J., Gao, F., Powell, C. A., D'Souza, A., Lightowlers, R. N., Minczuk, M., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2016). Human mitochondrial ribosomes can switch their structural RNA composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), 12198–12201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609338113>
- Rorbach, J., & Minczuk, M. (2012). The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochemical Journal*, 444(3), 357–373. <https://doi.org/10.1042/BJ20112208>
- Røyrvik, E. C., & Johnston, I. G. (2020). MtDNA sequence features associated with “selfish genomes” predict tissue-specific segregation and reversion. *Nucleic Acids Research*, 48(15), 8290–8301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa622>
- Rusecka, J., Kaliszewska, M., Bartnik, E., & Tońska, K. (2018). Nuclear genes involved in mitochondrial diseases caused by instability of mitochondrial DNA. *Journal of Applied Genetics*, 59(1), 43–57. <https://doi.org/10.1007/s13353-017-0424-3>
- Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Cámara, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hulthenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J. B., Gustafsson, C. M., & Larsson, N.-G. (2012). LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO Journal*, 31(2), 443–456. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.392>
- Ryan, M. T., Wolfgang, V., & Pfanner, N. (2001). Assaying Protein Import into Mitochondria.

- Methods in Cell Biology*, 65(65), 189–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00203-6>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255–274. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Salmon, P., Oberholzer, J., Occhiodoro, T., Morel, P., Lou, J., & Trono, D. (2000). Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Molecular Therapy*, 2(4), 404–414. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0141>
- Sanchez, M. I. G. L., Mercer, T. R., Davies, S. M. K., Shearwood, A. M. J., Nygård, K. K. A., Richman, T. R., Mattick, J. S., Rackham, O., & Filipovska, A. (2011). RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle*, 10(17), 2904–2916. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.17060>
- Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2006). Human polynucleotide phosphorylase (hPNPase old-35): an RNA degradation enzyme with pleiotropic biological effects. *Cell Cycle*, 5(10), 1080–1084. <https://doi.org/10.4161/cc.5.10.2741>
- Sarkar, D., Leszczyniecka, M., Kang, D., Lebedeva, I. V., Valerie, K., Dhar, S., Pandita, T. K., & Fisher, P. B. (2003). Down-regulation of Myc as a Potential Target for Growth Arrest Induced by Human Polynucleotide Phosphorylase (hPNPaseold-35) in Human Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24542–24551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302421200>
- Sarkar, D., Park, E. S., Emdad, L., Randolph, A., Valerie, K., & Fisher, P. B. (2005). Defining the Domains of Human Polynucleotide Phosphorylase (hPNPaseOLD-35) Mediating Cellular Senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7333–7343. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.16.7333-7343.2005>
- Sarkar, D., Park, E. S., & Fisher, P. B. (2006). Defining the mechanism by which IFN- $\beta$  downregulates c-myc expression in human melanoma cells: pivotal role for human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35). *Cell Death and Differentiation*, 13(9), 1541–1553. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401829>
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schon, K. R., Ratnaik, T., van den Amele, J., Horvath, R., & Chinnery, P. F. (2020). Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. *Trends in Genetics*, 36(9), 702–717. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.06.009>
- Serre, V., Rozanska, A., Beinat, M., Chretien, D., Boddaert, N., Munnich, A., Rötig, A., & Chrzanoska-Lightowlers, Z. M. (2013). Mutations in mitochondrial ribosomal protein MRPL12 leads to growth retardation, neurological deterioration and mitochondrial translation deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1304–1312. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.014>
- Shapiro, W. R., Williams, G. H., & Plum, F. (1969). Spontaneous recurrent hypothermia accompanying agenesis of the corpus callosum. *Brain*, 92(2), 423–436. <https://doi.org/10.1093/brain/92.2.423>
- Shi, Y., Posse, V., Zhu, X., Hyvärinen, A. K., Jacobs, H. T., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2016). Mitochondrial transcription termination factor 1 directs polar replication fork pausing. *Nucleic Acids Research*, 44(12), 5732–5742. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw302>
- Shokolenko, I. N., & Alexeyev, M. F. (2017). Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience*, 22(5), 835–853. <https://doi.org/10.2741/4520>



- Shu, Z., Vijayakumar, S., Chen, C.-F., Chen, P. L., & Lee, W. H. (2004). Purified Human SUV3p Exhibits Multiple-Substrate Unwinding Activity upon Conformational Change. *Biochemistry*, *43*(16), 4781–4790. <https://doi.org/10.1021/bi0356449>
- Signes, A., Cerutti, R., Dickson, A. S., Benincá, C., Hinchy, E. C., Ghezzi, D., Carrozzo, R., Bertini, E., Murphy, M. P., Nathan, J. A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2019). APOPT1/COA8 assists COX assembly and is oppositely regulated by UPS and ROS. *EMBO Molecular Medicine*, *11*(1), e9582. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809582>
- Siira, S. J., Spåhr, H., Shearwood, A. M. J., Ruzzenente, B., Larsson, N.-G., Rackham, O., & Filipovska, A. (2017). LRPPRC-mediated folding of the mitochondrial transcriptome. *Nature Communications*, *8*(1), 1532. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01221-z>
- Silva, S., Camino, L. P., & Aguilera, A. (2018). Human mitochondrial degradosome prevents harmful mitochondrial R loops and mitochondrial genome instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(43), 11024–11029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807258115>
- Sirey, T. M., & Ponting, C. P. (2016). Insights into the post-transcriptional regulation of the mitochondrial electron transport chain. *Biochemical Society Transactions*, *44*(5), 1491–1498. <https://doi.org/10.1042/BST20160100>
- Sissi, C., Gatto, B., & Palumbo, M. (2011). The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: A medicinal chemist's perspective. *Biochimie*, *93*(8), 1219–1230. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.04.018>
- Slavotinek, A. M., Garcia, S. T., Chandratillake, G., Bardakjian, T., Ullah, E., Wu, D., Umeda, K., Lao, R., Tang, P. L.-F., Wan, E., Madireddy, L., Lyalina, S., Mendelsohn, B. A., Dugan, S., Tirsch, J., Tischler, R., Harris, J., Clark, M. J., Chervitz, S., ... Chen, R. O. (2015). Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects. *Clinical Genetics*, *88*(5), 468–473. <https://doi.org/10.1111/cge.12543>
- Slomovic, S., & Schuster, G. (2008). Stable PNPase RNAi silencing: Its effect on the processing and adenylation of human mitochondrial RNA. *RNA*, *14*(2), 310–323. <https://doi.org/10.1261/rna.697308>
- Smeitink, J., van Den Heuvel, L., & DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Reviews Genetics*, *2*(5), 342–352. <https://doi.org/10.1038/35072063>
- Steward, C. A., Parker, A. P. J., Minassian, B. A., Sisodiya, S. M., Frankish, A., & Harrow, J. (2017). Genome annotation for clinical genomic diagnostics: strengths and weaknesses. *Genome Medicine*, *9*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0441-1>
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*, *16*(9), 530–542. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
- Stewart, J. D., Schoeler, S., Sitarz, K. S., Horvath, R., Hallmann, K., Pyle, A., Yu-Wai-Man, P., Taylor, R. W., Samuels, D. C., Kunz, W. S., & Chinnery, P. F. (2011). POLG mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1812*(3), 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.012>
- Stone, C. M., Butt, L. E., Bufton, J. C., Lourenco, D. C., Gowers, D. M., Pickford, A. R., Cox, P. A., Vincent, H. A., & Callaghan, A. J. (2017). Inhibition of homologous phospholytic

- ribonucleases by citrate may represent an evolutionarily conserved communicative link between RNA degradation and central metabolism. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 4655–4666. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx114>
- Stumpf, J. D., Saneto, R. P., & Copeland, W. C. (2013). Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a011395. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011395>
- Sultana, S., Solotchi, M., Ramachandran, A., Patel, S. S., & Wek, R. C. (2017). Transcriptional fidelities of human mitochondrial POLRMT, yeast mitochondrial Rpo41, and phage T7 single-subunit RNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 292(44), 18145–18160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797480>
- Surovtseva, Y. V., Shutt, T. E., Cotney, J., Cimen, H., Chen, S. Y., Koc, E. C., & Shadel, G. S. (2011). Mitochondrial ribosomal protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 17921–17926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108852108>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402(6760), 371–372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction*, 63(2), 582–590. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.582>
- Szczesny, R. J., Hejnowicz, M. S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Borowski, L. S., Ginalski, K., & Dziembowski, A. (2013). Identification of a novel human mitochondrial endo-/exonuclease Ddk1/c20orf72 necessary for maintenance of proper 7S DNA levels. *Nucleic Acids Research*, 41(5), 3144–3161. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt029>
- Szczesny, R. J., Wojcik, M. A., Borowski, L. S., Szewczyk, M. J., Skrok, M. M., Golik, P., & Stepień, P. P. (2013). Yeast and human mitochondrial helicases. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(8), 842–853. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.009>
- Szeitz, A., & Bandiera, S. M. (2018). Analysis and measurement of serotonin. *Biomedical Chromatography*, 32(1). <https://doi.org/10.1002/bmc.4135>
- Szewczyk, M., Malik, D., Borowski, L. S., Czarnomska, S. D., Kotrys, A. V., Klosowska-Kosicka, K., Nowotny, M., & Szczesny, R. J. (2020). Human REXO2 controls short mitochondrial RNAs generated by mtRNA processing and decay machinery to prevent accumulation of double-stranded RNA. *Nucleic Acids Research*, 48(10), 5572–5590. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA302>
- Tajeddinn, W., Persson, T., Maioli, S., Calvo-Garrido, J., Parrado-Fernandez, C., Yoshitake, T., Kehr, J., Francis, P., Winblad, B., Höglund, K., Cedazo-Minguez, A., & Aarsland, D. (2015). 5-HT1B and other related serotonergic proteins are altered in APP<sup>swe</sup> mutation. *Neuroscience Letters*, 594, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.064>
- Talaei, F., Bouma, H., van der Graaf, A., Strijkstra, A., Schmidt, M., & Henning, R. (2011). Serotonin and dopamine protect from hypothermia/rewarming damage through the CBS/H2S pathway. *PLoS ONE*, 6(7), e22568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022568>

- Tan, B. G., Wellesley, F. C., Savery, N. J., & Szczelkun, M. D. (2016). Length heterogeneity at conserved sequence block 2 in human mitochondrial DNA acts as a rheostat for RNA polymerase POLRMT activity. *Nucleic Acids Research*, *44*(16), 7817–7829. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw648>
- Tapper, D. P., & Clayton, D. A. (1981). Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(10), 5109–5115. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)69373-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)69373-7)
- Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(6–7), 1081–1085. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.036>
- Tempio, A., Niso, M., Laera, L., Trisolini, L., Favia, M., Ciranna, L., Marzulli, D., Petrosillo, G., Pierri, C. L., Lacivita, E., & Leopoldo, M. (2020). Mitochondrial Membranes of human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Express Serotonin 5-HT7 Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9629. <https://doi.org/10.3390/ijms21249629>
- Thompson, K., Collier, J. J., Glasgow, R. I. C., Robertson, F. M., Pyle, A., Blakely, E. L., Alston, C. L., Oláhová, M., McFarland, R., & Taylor, R. W. (2020). Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *43*(1), 36–50. <https://doi.org/10.1002/jimd.12104>
- Thompson Legault, J., Strittmatter, L., Tardif, J., Sharma, R., Tremblay-Vaillancourt, V., Aubut, C., Boucher, G., Clish, C. B., Cyr, D., Daneault, C., Waters, P. J., Morin, C., Laprise, C., Rioux, J. D., Mootha, V. K., Des Rosiers, C., Aliskashani, A., Allen, B. G., Beauchamp, C., ... Villeneuve, J. (2015). A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Reports*, *13*(5), 981–989. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.054>
- Timón-Gómez, A., Pérez-Pérez, R., Nyvltova, E., Ugalde, C., Fontanesi, F., & Barrientos, A. (2020). Protocol for the Analysis of Yeast and Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes and Supercomplexes by Blue Native Electrophoresis. *STAR Protocols*, *1*(2), 100089. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100089>
- Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A., & Stepień, P. P. (2004). Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Research*, *32*(20), 6001–6014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh923>
- Toompuu, M., Tuomela, T., Laine, P., Paulin, L., Dufour, E., & Jacobs, H. T. (2018). Polyadenylation and degradation of structurally abnormal mitochondrial tRNAs in human cells. *Nucleic Acids Research*, *46*(10), 5209–5226. <https://doi.org/10.1093/nar/gky159>
- Tu, Y. T., & Barrientos, A. (2015). The Human Mitochondrial DEAD-Box Protein DDX28 Resides in RNA Granules and Functions in Mitochondrial Assembly. *Cell Reports*, *10*(6), 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.033>
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1797*(2), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
- Tynnismaa, H., & Suomalainen, A. (2009). Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO Reports*, *10*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.242>

- van Esveld, S. L., Rodenburg, R. J., Al-Murshedi, F., Al-Ajmi, E., Al-Zuhaibi, S., Huynen, M. A., & Spelbrink, J. N. (2022). Mitochondrial RNA processing defect caused by a SUPV3L1 mutation in two siblings with a novel neurodegenerative syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 45(2), 292–307. <https://doi.org/10.1002/jimd.12476>
- van Maerken, T., Sarkar, D., Speleman, F., Dent, P., Weiss, W. A., & Fisher, P. B. (2009). Adenovirus-mediated hPaseold-35 gene transfer as a therapeutic strategy for neuroblastoma. *Journal of Cellular Physiology*, 219(3), 707–715. <https://doi.org/10.1002/jcp.21719>
- Vantroys, E., Larson, A., Friederich, M., Knight, K., Swanson, M. A., Powell, C. A., Smet, J., Vergult, S., De Paepe, B., Seneca, S., Roeyers, H., Menten, B., Minczuk, M., Vanlander, A., Van Hove, J., & Van Coster, R. (2017). New insights into the phenotype of FARS2 deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 122(4), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.10.004>
- Vedrenne, V., Gowher, A., De Lonlay, P., Nitschke, P., Serre, V., Boddaert, N., Altuzarra, C., Mager-Heckel, A. M., Chretien, F., Entelis, N., Munnich, A., Tarassov, I., & Rötig, A. (2012). Mutation in PNPT1, which encodes a polyribonucleotide nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.001>
- Vereas, A. M., Recio, V. P., Higaldo, J. G., Diego, P. G., & Biatricia, I. M. (2017). Hipotermia periódica espontánea con hiperhidrosis: a propósito de un caso y revisión de la literatura. *Rev Pediatr Aten Primaria*, 19, e63–e65.
- von Ameln, S., Wang, G., Boulouiz, R., Rutherford, M. A., Smith, G. M., Li, Y., Pogoda, H.-M., Nürnberg, G., Stiller, B., Volk, A. E., Borck, G., Hong, J. S., Goodyear, R. J., Abidi, O., Nürnberg, P., Hofmann, K., Richardson, G. P., Hammerschmidt, M., Moser, T., ... Kubisch, C. (2012). A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.002>
- Wan, L., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, J., Niu, M., Wu, Y., Yang, Y., Dang, Y., Hui, S., Ni, M., Wan, B., & Bao, D. (2021). Elevated TEFM expression promotes growth and metastasis through activation of ROS/ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*, 12(4), 325. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03618-7>
- Wang, D. D.-H., Guo, X. E., Modrek, A. S., Chen, C.-F., Chen, P.-L., & Lee, W.-H. (2014). Helicase SUV3, polynucleotide phosphorylase, and mitochondrial polyadenylation polymerase form a transient complex to modulate mitochondrial mRNA polyadenylated tail lengths in response to energetic changes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 16727–16735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536540>
- Wang, D. D.-H., Shu, Z., Lieser, S. A., Chen, P.-L., & Lee, W.-H. (2009). Human mitochondrial SUV3 and polynucleotide phosphorylase form a 330-kDa heteropentamer to cooperatively degradedouble-stranded RNA with a 3'-to-5' directionality. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20812–20821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009605>
- Wang, G., Chen, H.-W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E. L., Smith, G. M., Fan, K. C., Hong, J. S., French, S. W., McCaffery, J. M., Lightowlers, R. N., Morse, H. C., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*, 142(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.035>
- Wang, G., Shimada, E., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2012). PNPASE and RNA trafficking into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9–10),

- 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.001>
- Wang, Q., Zhang, H., Xu, H., Guo, D., Shi, H., Li, Y., Zhang, W., & Gu, Y. (2016). 5-HTR3 and 5-HTR4 located on the mitochondrial membrane and functionally regulated mitochondrial functions. *Scientific Reports*, *6*, 37336. <https://doi.org/10.1038/srep37336>
- Wang, W.-S., Zi, J.-J., Sun, M.-T., Mei, W., Li, S.-F., Yang, N., Fei, Z.-Y., Zhang, R.-P., Yu, M., & Xiong, W. (2020). Expression of MTERF3 gene in breast carcinoma and the relationship with clinicopathological characteristics. *Translational Cancer Research*, *9*(1), 173–186. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.12.65>
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2012). A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop. *Nucleic Acids Research*, *40*(20), 10334–10344. <https://doi.org/10.1093/nar/gks802>
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Simonsson, T., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2010). G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(37), 16072–16077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006026107>
- Wei, W., Gomez-Duran, A., Hudson, G., & Chinnery, P. F. (2017). Background sequence characteristics influence the occurrence and severity of disease-causing mtDNA mutations. *PLoS Genetics*, *13*(12), e1007126. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007126>
- Wenz, T., Luca, C., Torraco, A., & Moraes, C. T. (2009). mTERF2 Regulates Oxidative Phosphorylation by Modulating mtDNA Transcription. *Cell Metabolism*, *9*(6), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.04.010>
- Wilkins, H. M., Carl, S. M., & Swerdlow, R. H. (2014). Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox Biology*, *2*(1), 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.03.006>
- Wilson, D. N. (2009). The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *44*(6), 393–433. <https://doi.org/10.3109/10409230903307311>
- Wittig, I., Braun, H.-P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, *1*(1), 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>
- Wong, T. W., & Clayton, D. A. (1985). In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell*, *42*(3), 951–958. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90291-0)
- Wortmann, S. B., Koolen, D. A., Smeitink, J. A., van den Heuvel, L., & Rodenburg, R. J. (2015). Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(3), 437–443. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9823-y>
- Wright Muelas, M., Ortega, F., Breitling, R., Bendtsen, C., & Westerhoff, H. V. (2018). Rational cell culture optimization enhances experimental reproducibility in cancer cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 3029. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21050-4>
- Wu, J., & Li, Z. (2008). Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *372*(2), 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.058>
- Wyatt, H. D. M., & West, S. C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harbor*

- Perspectives in Biology*, 6(9), a023192. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023192>
- Xavier, V. J., & Martinou, J.-C. (2021). RNA granules in the mitochondria and their organization under mitochondrial stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9502. <https://doi.org/10.3390/ijms22179502>
- Xu, B., & Clayton, D. A. (1995). A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 580–589. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.1.580>
- Xu, B., & Clayton, D. A. (1996). RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO Journal*, 15(12), 3135–3143. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00676.x>
- Xu, J., Li, Y., Lv, Y., Bian, C., You, X., Endoh, D., Teraoka, H., & Shi, Q. (2019). Molecular Evolution of Tryptophan Hydroxylases in Vertebrates: A Comparative Genomic Survey. *Genes*, 10(3), 203. <https://doi.org/10.3390/genes10030203>
- Xuan, H. P., Farge, G., Shi, Y., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2006). Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24647–24652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602429200>
- Yu, H., Xue, C., Long, M., Jia, H., Xue, G., Du, S., Coello, Y., & Ishibashi, T. (2018). TEFM Enhances Transcription Elongation by Modifying mtRNAP Pausing Dynamics. *Biophysical Journal*, 115(12), 2295–2300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.004>
- Yu, Z., O'Farrell, P. H., Yakubovich, N., & DeLuca, S. Z. (2017). The Mitochondrial DNA Polymerase Promotes Elimination of Paternal Mitochondrial Genomes. *Current Biology*, 27(7), 1033–1039. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.014>
- Yue, C.-T., & Liu, Y.-L. (2005). Fluoxetine increases extracellular levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in cultured COLO320 DM cells. *Cell Biochemistry and Function*, 23(2), 109–114. <https://doi.org/10.1002/cbf.1193>
- Zeviani, M., & Viscomi, C. (2022). Mitochondrial Neurodegeneration. *Cells*, 11(4), 637. <https://doi.org/10.3390/cells11040637>
- Zhou, Q., Li, H., Li, H., Nakagawa, A., Lin, J. L. J., Lee, E. S., Harry, B. L., Skeen-Gaar, R. R., Suehiro, Y., William, D., Mitani, S., Yuan, H. S., Kang, B. H., & Xue, D. (2016). Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*, 353(6297), 394–399. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>
- Zhu, X., Xie, X., Das, H., Tan, B. G., Shi, Y., Al-Behadili, A., Peter, B., Motori, E., Valenzuela, S., Posse, V., Gustafsson, C. M., Hällberg, B. M., & Falkenberg, M. (2022). Non-coding 7S RNA inhibits transcription via mitochondrial RNA polymerase dimerization. *Cell*, 185(13), 2309–2323.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.006>
- Zi, J., Wang, W., Sun, M., Mei, W., Li, S., Li, B., Xiao, Y., Fei, Z., Zhang, R., Yu, M., & Xiong, W. (2019). A high expression of MTERF3 correlates with tumor progression and predicts poor outcomes in patients with brain glioma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(5), 1909–1920.
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.-J., Ackenheil, M., & Bondy, B. (2007). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *Journal of Psychiatric Research*, 41(1–2), 168–173.

---

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2005.05.004>

Zollo, O., Tiranti, V., & Sondheimer, N. (2012). Transcriptional requirements of the distal heavy-strand promoter of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(17), 6508–6512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118594109>

Zsurka, G., Baron, M., Stewart, J. D., Kornblum, C., Börs, M., Sassen, R., Taylor, R. W., Elger, C. E., Chinnery, P. F., & Kunz, W. S. (2008). Clonally expanded mitochondrial DNA mutations in epileptic individuals with mutated DNA polymerase  $\gamma$ . *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *67*(9), 857–866. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181839b2d>





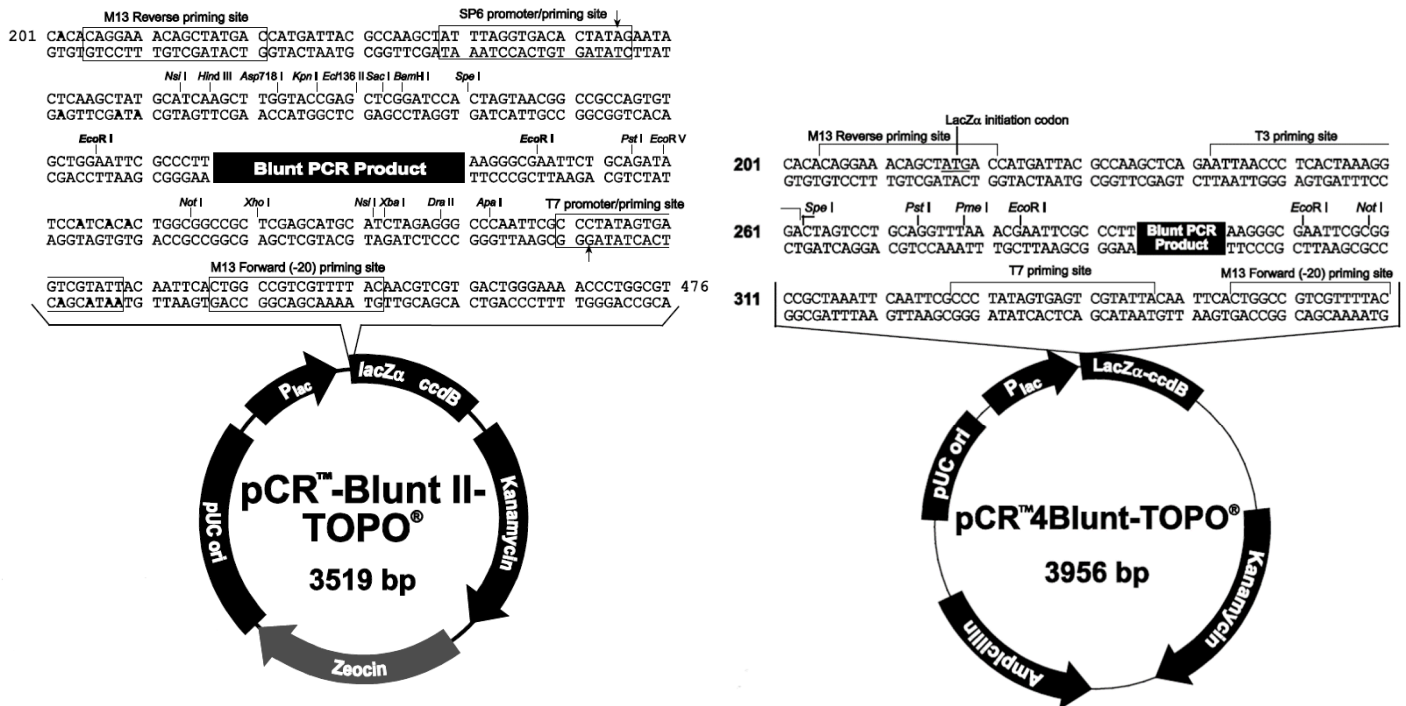
**ANEXOS**

---



## 8.1 Vectores utilizados en este trabajo

### 8.1.1 pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™4Blunt-TOPO®



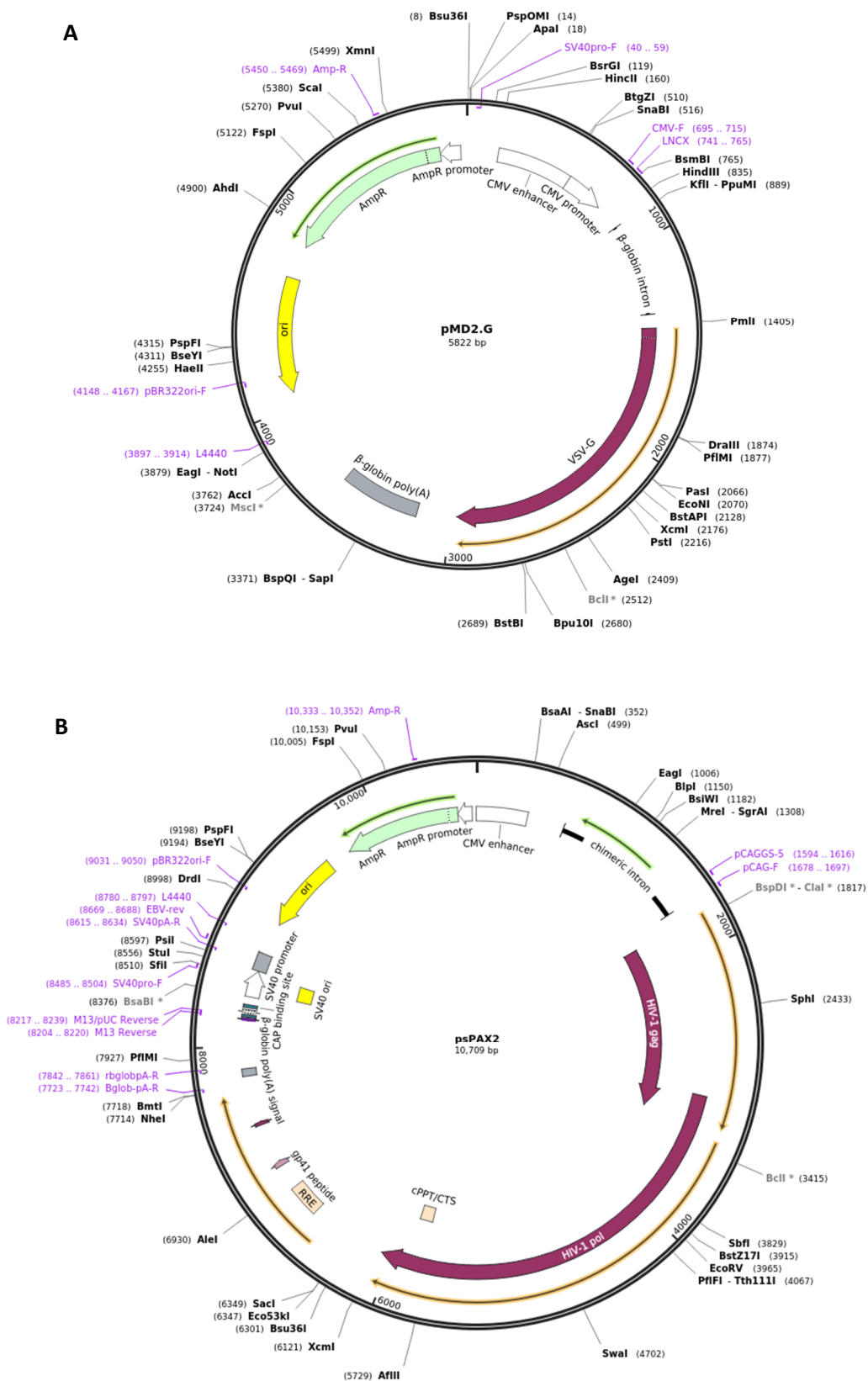
**Figura S1.** Mapa de genético de los vectores pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™4Blunt-TOPO®. Presentan un origen de replicación pUC; promotor del operón lac; el fragmento α del gen lacZ, codificante para β-galactosidasa en caso de estar completo y que, por tanto, permite la selección por α-complementación si la cepa de trabajo posee la delección ΔM15 en su genoma; el gen letal ccdB, que permite llevar a cabo una selección positiva (la proteína resultante secuestra a la DNA girasa de *E. coli*); las secuencias SP6 y T7 de los fagos homónimos que permiten la síntesis de RNA directo o antisentido *in vitro*, respectivamente; presenta dos secuencias del fago M13 (con las que puede secuenciarse el inserto de interés utilizando los primers F17 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y R19 (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')); gen de resistencia a kanamicina, un antibiótico aminoglucósido y, por tanto, capaz de actuar tanto sobre bacterias gram positivas como gram negativas. pCR™-Blunt II-TOPO® contiene, además, un gen de resistencia a zeomicina, que permite llevar a cabo una selección tanto en células procariontas como en eucariotas, mientras que pCR™4Blunt-TOPO® tiene un gen de resistencia a ampicilina, antibiótico betalactámico que, como la kanamicina, puede actuar sobre bacterias gram positivas y gram negativas.

### 8.1.2 pWPXLd y pLOX-Ttag-iresTK

**Figura S2** (página siguiente). Mapa genético de los vectores pWPXLd y pLOX-Ttag-iresTK. **(A)** pWPXLd contiene, entre otros elementos, el promotor fuerte EF-1α, bajo el que se transcribe el gen reportero que codifica para la EGFP (proteínas fluorescente verde potenciada), el gen AmpR (otorga resistencia a ampicilina) y secuencias LTR, que delimitan la secuencia que se integra en el genoma de la célula diana. El vector pWPXLd utilizado en el laboratorio fue modificado mediante cortes con enzimas de restricción para sustituir el gen codificante para EGFP por las secuencias IRES y NeoR (originales del vector comercial pQCXI-Neo) o por IRES y PuroR (procedentes del vector comercial pIRESpuro3), ganando así resistencia a neomicina o puromicina, respectivamente. **(B)** pLOX-Ttag-iresTK presenta el gen codificante para el antígeno T grande del SV40, responsable de conseguir immortalizar células primarias y situado entre secuencias LTR. Además, el vector tiene el gen AmpR, de manera que puede realizarse su expansión en cultivo bacteriano con ampicilina.



### 8.1.3 pMD2.G y psPAX2



**Figura S3.** Mapa genético de los vectores pMD2.G y psPAX2. **(A)** pMD2.G contiene el gen VSV-G, que da lugar a la glicoproteína de la espícula del virus de la estomatitis vesicular. **(B)** psPAX2 tiene la secuencia HIV-1 pol, crítica para la replicación viral: codifica para una proteasa, retrotranscriptasa e integrasa. Además, ambos vectores presentan el gen AmpR y, por tanto, pueden seleccionarse con ampicilina.

## 8.2 Supervivencia de fibroblastos con puromicina

En general, el ensayo de complementación se llevó a cabo a partir del vector pWPXLd modificado para que tuviera resistencia a geneticina. Sin embargo, para la generación de los fibroblastos C1<sub>i</sub>-TEFM+POLRMT, que se realizó a partir de los fibroblastos C1<sub>i</sub>-TEFM, fue necesario el uso del vector pWPXLd modificado con resistencia a puromicina y, por tanto, establecer una dosis con la que llevar a cabo la selección con dicho antibiótico.

En primer lugar, se sembraron fibroblastos C1<sub>i</sub> en pocillos de placas de 6 pocillos al 60-70 % de confluencia. 24 horas después, se añadió a cada uno de los pocillos medio DMEM con alta glucosa y diferentes dosis de puromicina, partiendo de una dilución intermedia de 1,5 µg/ml. Finalmente, se fue observando el comportamiento celular a lo largo de 10 días mediante el microscopio invertido y registrando los resultados (Tabla 8.1).

**Tabla 8.1.** Dosis de puromicina y su efecto sobre fibroblastos inmortalizados<sup>287</sup>

Puromicina (µg/ml)	Día 1	Día 2	Día 5	Día 10
1 ug/ml	-	xx	xxx	xxx
0,5 ug/ml	-	x	xx	xxx
0,4 ug/ml	-	x	xx	xxx
0,3 ug/ml	-	x	xx	xxx
0,25 ug/ml	-	x	xx	xxx
0,2 ug/ml	-	x	xx	xx

La concentración de interés de un antibiótico para el ensayo de complementación siempre es aquella en que las células control se mueran completamente tras los 10 días de selección, mientras que las células transducidas consigan sobrevivir y proliferar. La menor dosis a la que no murieron en su totalidad las células tratadas fue 0,2 µg/ml, de manera que, para poder llevar a cabo el ensayo de complementación con puromicina en los fibroblastos inmortalizados de interés, se escogió la dosis inmediatamente superior a la que sí murieron por completo, esto es, la concentración de 0,25 µg/ml de puromicina.

<sup>287</sup> Significado de la simbología utilizada: “-“ ausencia de muerte celular y “x” muerte celular. A mayor cantidad de “x” más muerte, con “xxx” muerte de todas las células del pocillo.

### 8.3 Tratamiento de fibroblastos con EtBr y actinomicina D

Se quiso estudiar el efecto de un inhibidor de la transcripción sobre diferentes fibroblastos primarios, para lo que previamente debía establecerse una dosis a la que trabajar. Como potenciales fármacos, se seleccionaron el EtBr y la actinomicina D; las dosis tomadas como referencia fueron 2,5  $\mu\text{g/ml}$  para el EtBr (Toompuu et al., 2018) y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para la actinomicina D (Bayona-Bafaluy et al., 2003); se sembraron 10 000 células/pocillo de fibroblastos de 15 años y al día siguiente (día 0) se cambió el medio de cada pocillo, sustituyéndolo por medio con diferentes dosis de cada fármaco (Tablas 8.2), excepto en los pocillos control; los medios de tratamiento (volumen de 2 ml) no se cambiaron durante la duración del ensayo; el comportamiento de los pocillos fue analizándose cualitativamente por observación de los mismos mediante un microscopio invertido.

**Tablas 8.2.** Dosis de actinomicina D, EtBr y su efecto sobre fibroblastos primarios<sup>288</sup>

Actinomicina D ( $\mu\text{g/ml}$ )	Día 1	Día 2	Día 3	Días 5 y 6
0,5	-	++XX	+++XXX	XXX
0,25	-	++XX	+++XX	XXX
0,1	-	++X	++X	XXX
0,05	-	+X	++X	XX
0,01	-	+X	++X	XX

EtBr ( $\mu\text{g/ml}$ )	Día 1	Día 2	Día 3	Días 5 y 6
2,5	-	XX	XXX	XXX
1	-	X	XX	XXX
0,5	-	+X	++XX	XX
0,25	-	+	++X	+++X
0,05	-	+	+	++

En el caso de la actinomicina D, resultó muy agresiva para las células, incluso a las dosis más bajas: se detectó pronto un menor crecimiento con respecto al control, pero también una mayor muerte celular en todas las dosis. Por su parte, con el EtBr el efecto sí fue más progresivo según la dosis empleada: en las dosis más altas rápidamente las células se empezaron a morir, mientras que en las dosis más bajas el mayor efecto fue el de la inhibición del crecimiento e incluso sin llegar a experimentar muerte celular para la concentración de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Dado que el efecto buscado era ralentizar el crecimiento celular, pero no matar a las células, el fármaco escogido fue el EtBr a la dosis de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ .

Cabe destacar que, además de este ensayo, se probaron en un Incucyte® las dosis 0,1, 0,05 y 0,03  $\mu\text{g/ml}$  de EtBr, pero se llegó a la misma conclusión: la mejor dosis fue 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , ya que la de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  terminaba por matar a las células y con la de 0,03  $\mu\text{g/ml}$  las células experimentaban un comportamiento muy similar al control (datos no ofrecidos).

<sup>288</sup> Significado de la simbología utilizada: “-” crecimiento similar al control, “+” menor crecimiento con respecto al control y “x” muerte celular. A mayor cantidad de “+” y “x” (hasta 3) implica una mayor diferencia de crecimiento o de muerte celular, respectivamente.

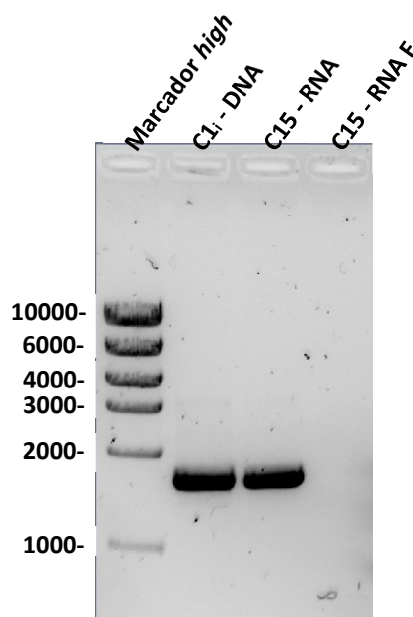
### 8.4 Tratamiento de RNA total con DNasa I para eliminar DNA contaminante

Para comprobar si las muestras de RNA total extraídas con TRIzol® contenían DNA contaminante, una de las pruebas que se realizó fue amplificar por PCR el fragmento 8 del mtDNA (F8), tal y como aparece explicado en el apartado 3.3.12, aunque con la diferencia de utilizar la PHS II polimerasa de ThermoFisher Scientific. En concreto, los reactivos empleados aparecen en la [Tabla 8.3](#).

**Tabla 8.3.** Reactivos para la PCR de prueba del tratamiento con DNasa I

Reactivo	Concentración stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
PHS II polimerasa	2 U/ $\mu$ l	1	0,04 U/ $\mu$ l
Tampón HF	5 X	10	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 $\mu$ M
Primer L	25 $\mu$ M	1	0,5 $\mu$ M
Primer H	25 $\mu$ M	1	0,5 $\mu$ M
Muestra	150 ng	1	150 ng
H <sub>2</sub> O comercial	-	35	-
Volumen final		50	

Una vez obtenidos los productos de PCR de las muestras de interés ([Figura S4](#)), se corrieron en un gel de agarosa del 1 % de porosidad, a 100 V y durante 40-45 minutos.



**Figura S4.** Gel de agarosa (1 %) de los productos de la PCR de prueba del tratamiento con DNasa I. Las muestras que se amplificaron por PCR fueron DNA de fibroblastos inmortalizados de 1 mes (C1<sub>i</sub> - DNA), cDNA obtenido de RNA total de fibroblastos de 15 años (C15 - RNA) y cDNA retotranscrito de RNA total de fibroblastos de 15 años tratados con DNasa I (C15 - RNA F). F8 amplificó en la muestra de DNA, en la de RNA extraído con TRIzol® (sin tratar con DNasa I), pero no en la de RNA tratado con DNasa I.



## 8.5 Comparación entre realizar la qPCR en uno o dos pasos

Con el kit *TaqMan™ RNA-to-C<sub>T</sub>™ 1-Step* se utiliza el RNA como material de partida, ya que en el mismo pocillo de la placa de 96 pocillos se lleva a cabo la retrotranscripción y PCR cuantitativa posterior. En cambio, el kit *TaqMan® Gene Expression Master Mix* requiere de DNA como sustrato, de forma que el cDNA debe obtenerse de forma previa al ensayo mediante RT-PCR. Por tanto, la diferencia entre ambos kits consiste en realizar la qPCR en uno o dos pasos, respectivamente. Experimentalmente se comprobó que los C<sub>T</sub> de los estándares internos variaban mucho más entre sondas con el kit *1-Step*, tal y como aparece en la [Tabla 8.4](#).

**Tabla 8.4.** Variabilidad en el C<sub>T</sub> del 18S rRNA y la actina en una qPCR de uno o dos pasos

Fibroblastos	StepOne™	ViiA7		
	1-Step (18S)	1-Step (actina)	RT-PCR+qPCR (18S)	RT-PCR+qPCR (actina)
Control-1	15,90 (ND6)	18,91 (ND6)	15,27 (CYTB)	21,95 (COIII)
	21,77 (CYTB)	37,16 (CYTB)	16,12 (COIII)	22,86 (COII)
	<b>Diferencia: 5,87</b>	<b>Diferencia: 18,25</b>	<b>Diferencia: 0,85</b>	<b>Diferencia: 0,91</b>
Control-2	15,01 (ND6)	18,88 (CYTB)	15,085 (CYTB)	23,13 (COIII)
	22,29 (CYTB)	34,81 (CYTB)	16,593 (ATP6)	23,81 (ND5)
	<b>Diferencia: 7,28</b>	<b>Diferencia: 15,93</b>	<b>Diferencia: 1,51</b>	<b>Diferencia: 0,68</b>
Control-3	13,95 (ND6)	26,81 (12S)	14,83 (CYTB)	25,56 (COIII)
	19,49 (CYTB)	35,91 (CYTB)	15,90 (ATP6)	26,05 (ND5)
	<b>Diferencia: 5,54</b>	<b>Diferencia: 9,1</b>	<b>Diferencia: 1,07</b>	<b>Diferencia: 0,5</b>

Los valores ofrecidos en la tabla anterior son el mínimo y máximo de los C<sub>T</sub> detectados al cuantificar el rRNA 18S y la actina, junto a distintas sondas TaqMan® mitocondriales, para diferentes réplicas biológicas, que a su vez fueron añadidas en distintas placas por triplicado técnico. Tomando como ejemplo el control-1 y el 18S, se puede ver que el valor C<sub>T</sub> mínimo del 18S detectado fue en un pocillo en que se encontraba con la sonda para ND6 (C<sub>T</sub> = 15,9), mientras que el máximo se dio en un pocillo con la sonda CYTB (C<sub>T</sub> = 21,77), habiendo una diferencia de C<sub>T</sub> de 5,87 entre ambas. Sin embargo, esta diferencia se redujo a 0,85 para el mismo caso haciendo la qPCR en dos pasos (RT-PCR+qPCR), esto es, primero obteniendo el cDNA y después realizando la qPCR como tal con el kit *TaqMan® Gene Expression Master Mix*.

## 8.6 Secuencia del hmtDNA y localizaciones funcionales de interés (hebra ligera)

Tabla 8.5. Localizaciones funcionales de interés del mtDNA

Región funcional	Posiciones	Color	Fuente bibliográfica
7S DNA	16106-191	Resaltado en verde	(Lott et al., 2013) (Nicholls & Minczuk, 2014)
7S RNA	208-407	Resaltado en amarillo	(Ojala, Crews, et al., 1981) (Jemt et al., 2015)
CSBI	213-235	Subrayada	(B. Xu & Clayton, 1996) (Lott et al., 2013)
CSBII	299-315	En negrita	(B. Xu & Clayton, 1996) (Lott et al., 2013)
CSBIII	346-363	En negrita y subrayada	(B. Xu & Clayton, 1996) (Lott et al., 2013)
LSP	392-435	En azul y negrita	(Montoya et al., 1982) (Lott et al., 2013)
Origen de transcripción de la cadena ligera	407	Resaltado en azul oscuro	(Ojala, Crews, et al., 1981) (Montoya et al., 1982) (B. Xu & Clayton, 1996) (Litonin et al., 2010)

>NC\_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome

GATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGGGAGCTCTCCATGCATTGGTATTTTCGTCTGGGGG  
 GTATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCCTATGTCGCAGTATCTGTCTTTGATTG  
 CTGCCTCATCCTATTTATTTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACA TACTTACTAAAGTGTGTTA  
 ATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACATC  
 ATAACAAAAAATTTCCACCAAAACCCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCA  
 AACCCCAAAAAACAAGAACCCTAACACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTGGCGGTATGCAC  
 TTTTAAACAGTCACCCCAACTAACACATTATTTCCCCTCCCCTCCACTCCCATACTACTAATCTCATCAATA  
 CAACCCCGCCCTCTACCCAGCACACACACACCCTGCTAACCCCATACCCCGAACCCAAACAAACCC  
 AAAGACACCCCCACAGTTTATGTAGCTTACCTCCTCAAAGCAATACACTGAAAAATGTTTAGACGGGCTC  
 ACATCACCCCATAAACAAATAGGTTTGGTCTTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGCAA  
 GCATCCCCGTTCCAGTGAGTTACCCCTCAAATCACACGATCAAAAGGAACAAGCATCAAGCACGCAGC  
 AATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAA  
 ACGAAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTCTGTGCCAGCCACCGCGTACACGA  
 TTAACCCAAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGTTTTAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAAC  
 CACCTGAGTTGTAAAAAATCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAGTGGCTTTAACATATCTGAACAC  
 ACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCACTATGCTTAGCCCTAACCTCAACAGTTAAATC  
 AACAAAATGCTCGCCAGAACACTACGAGCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATC  
 CCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAACCCGATCAACCTCACACCTCTTGCTCAGCCTATATA  
 CCGCCATCTTCAGCAAACCTGATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAGTACCCACGTAAAGACGTTAGGTC  
 AAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTTAT  
 GAAACTTAAGGGTGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGA  
 AGCGGTACACACCCGCGTACCCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCA  
 TTTATATAGAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACTTGGACGAACCAGAGTGTA  
 GCTTAACACAAAACACCCAACTTACACTTAGGAGATTTCAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTA  
 GCCCAAACCCACTCCACCTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATTAAGTATAGGCG  
 ATAGAAATGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACCGCCAAGGAAAGATGAAAAATTAACCAAGCATA  
 ATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTTCTGCATAATGAATTAACCTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCC  
 AAAGCTAAGACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCCGCTATGTAGCA  
 AAATAGTGGGAAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCTACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGAT  
 AGAATCTTAGTTCAACTTTAAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAGTC  
 CAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTTAGAGAGAGTAAAAATTTAACCCCATAG  
 TAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGAAAAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAC  
 ATATAACTGAACTCCTCACACCCAATTTGGACCAATCTATCACCCCTATAGAAGAACTAATGTTAGTATAAG  
 TAACATGAAAAATTTCTCTCCGCATAAGCCTGCGTCAGATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCC

AATATCTACAATCAACCAACAAGTCAATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAGGA  
AAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAATCTTACCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCACCTCTAGC  
ATCACCAGTATTAGAGGCACCGCTGCCAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAA  
AGGTAGCATAATCACTTGTTCCCTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCT  
TACTTTTAAACAGTGAAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCATAACACAGCAAGACGAGAAGACCCTA  
TGGAGCTTTAATTTATTAATGCAAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCATT  
AAAAATTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACTCCGAGCAGTACATGCTAAGACTTCACCAG  
TCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGATCCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACA  
GCGCAATCCCTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCG  
ATGGTGCAGCCGCTATTAAGGTTTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCCTACGTGATCTGAGTTTCAGACCGG  
AGTAATCCAGGTCGGTTTCTATCTACNTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCT  
ACTTCACAAAAGCGCTTCCCCCGTAAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGA  
ACAGGGTTTGTAAAGATGGCAGAGCCCGGTAATCGCATAAAACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAAT  
TCCTCTTCTTAAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATCGCAATGGCA  
TTCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCC  
CCTACGGGCTACTACAACCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCCAC  
ATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCTACTATGAACCCCC  
CTCCCCATAACCAACCCCTGGTCAACCTCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAG  
CCGTTTACTCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGGGCAGTGCAGC  
AGTAGCCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCTAGCCATCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGC  
TCCTTTAACCTCTCCACCCTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTTGG  
CCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTTCGACCTTGCCGAAGGGGAGTC  
CGAACTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAATACGCCGACGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATAC  
ACAAACATTATTATAATAAACACCCCTCACCACTACAATCTTCTTAGGAACAACATATGACGCACTCTCCC  
CTGAACCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTACTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTCGAAC  
AGCATACCCCGATTCCGCTACGACCAACTCATACCTCCTATGAAAAAACTTCTTACCCTCACCCCTA  
GCATTACTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATTCCCCCTCAAACCTAAGAAATAT  
GTCTGATAAAAAGAGTTACTTTGATAGAGTAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGA  
GAATCGAACCCATCCCTGAGAAATCCAAAATTTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCCTAAAGTAAGGTC  
AGCTAAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTTGGTTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCT  
GGCCAACCCGTCATCTACTCTACCATCTTTGACAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTT  
TTTACCTGAGTAGGCTAGAAAATAACATGCTAGCTTTTATTCAGTTCTAACCAAAAAATAAACCCCTC  
GTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTTCTCAGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTAT  
CCTCTTCAACAATATACTCTCCGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATACTCATATTAATA  
ATCATAATAGCTATAGCAATAAACTAGGAATAGCCCCCTTTCCTTCTGAGTCCAGAGGTTACCCAAG  
GCACCCCTCTGACATCCGGCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATACCA  
AATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTTATCCATCATAGCAGGCAGTTGA  
GGTGGATTAACCAAAACCCAGCTACGCAAAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAA  
TAGCAGTTCTACCGTACAACCCTAACATAACCATTTCTAATTTAACTATTTATATTATCCTAACTACTAC  
CGCATTCCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGACCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTA  
ACATGACTAACACCCTTAATTCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCGGCTTTT  
TGCCAAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCATCATCCCCACCATCATAGCCAC  
CATCACCCCTCCTTAACTCTACTTCTACCTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATA  
TCTAACACGTAATAAAATAAAATGACAGTTTGAACATAACAAAACCCACCCATTCCTCCCCACTCATCG  
CCCTTACCACGCTACTCTACTATCTCCCTTTTATACTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATAC  
AGACCAAGAGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAAAA  
CCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTAAGCCCTTACTAGACCAATGGGA  
CTTAAACCCACAAAACCTTAGTTAACAGCTAAGCACCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCC  
GCCGGGAAAAAAGGCGGGAGAAAGCCCGGCGAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGCAATTCATATGA  
AAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCTGTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCA  
GCCATTTTACCTCACCCCACTGATGTTGCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATTGG  
AACACTATACCTATTATTTCGGCGCATGAGCTGGAGTCTTAGGCACAGCTCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCC  
GAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAGGTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTACACAGCCCATGCAT  
TTGTAATAATCTTCTTCATAGTAATAACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACTAGTTCCCCTAAT  
AATCGGTGCCCCGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACAACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTC  
CTACTCCTGTCTGCATCTGCTATAGTGGAGGCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCCTCCCTTAG  
CAGGGAACACTCCACCCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCTCCTTACACCTAGCAGGTGTCTC  
CTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTCTATCACAACAATTTATCAATATAAAACCCCTGCCATAACCCAATAC  
CAAACGCCCTCTTCGCTGATCCGTCTAATCACAGCAGTCTTACTTCTCCTATCTCTCCAGTCTTAG  
CTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGAACCTCAACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGG  
AGACCCCATCTATACCAACACCTATTCTGATTTTTTCGGTACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTACCA

GGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAGAAAAAGAACCATTTGGATACATAGGTA  
TGGTCTGAGCTATGATATCAATGGCTTCCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGG  
AATAGACGTAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCCACCGGCGTCAA  
GTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATATGAAATGATCTGCTGCAGTGTCTGAGCCCTAG  
GATTCATCTTTCTTTTACCCTAGGTGGCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTATCACTAGACATCGT  
ACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCCCACTTCCACTATGTCTTATCAATAGGAGCTGTATTTGCCATC  
ATAGGAGGCTTCATTCCTGATTTCCCTATTTCTCAGGCTACACCCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCC  
ATTTCACTATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGGCCTATCCGGAAT  
GCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCACATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATT  
ATTTCTTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGTCC  
TAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCCCCCACCTACCACACATTCGA  
AGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAA  
CCCCATGGCTCCATGACTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTATAACTTTGTCAAAGTTAAAT  
TATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAGCGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCT  
ATCATAGAAGAGCTTATCACCTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTCCTTATCTGCTTCCCTAGTCC  
TGTATGCCCTTTTCTAACACTCACAAACAACTAACTAATACTAACATCTCAGACGCTCAGGAAATAGA  
AACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATCATCTAGTCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTAC  
ATAACAGACGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGTACTGAACCTACG  
AGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTACATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCAGGCGA  
CCTGCGACTCCTTGACGTTGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTCGTATAATAATTACA  
TCACAAGACGCTTGCCTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAAACAGATGCAATTTCCGGACGTC  
TAAACCAAACCACTTTTACCCTGACACGACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGC  
AAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTTCCCTAAAAATCTTTGAAATAGGGCCCGTATTT  
ACCCTATAGCACCCCTTACCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACTTTTAAGTT  
AAAGATTAAGAGAACCAACACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCCTATGGCCACCCT  
AATTACCCCTACTCCTTACTATTTCTCCTACACCACTAAAAATATAAACACAACTACCACCTA  
CCTCCCTACCAAGCCATAAAAAATAAAAAATATAACAAACCTGAGAACCAAATGAACGAAAATCT  
GTTGCTTTCATTTCATTGCCCCACAACTCCTAGGCTTACCCTGCGCAGTACTGATCATTCTATTTCCCT  
CTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCGACTAATCACCACCAACAATGACTAATCAAAC  
TAACCTCAAAAACAAATGATAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTTTATACTAGTATCCTT  
AATCATTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTCATTACACCAACCACCAACTA  
TCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCTTATGAGCGGGCACAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTA  
AAAATGCCCTAGCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACTAGTTATTATCGA  
AACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCGTACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCAC  
CTACTCATGCACCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTTACACTTATCA  
TCTTACAATTTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTGCGCTTAATCCAAGCCTACGTTTTAC  
ACTTCTAGTAAGCCTTACCTGCACGACAACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAA  
AACCCAGCCCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCTAGCCATGTGATT  
TCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCTACTAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGG  
CGGATGTAACACGAGAAAAGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATACG  
GGATAATCCTATTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTCTTCGAGGATTTTTCTGAGCCTTTTACCCTCCAG  
CCTAGCCCTTACCCCAATTAGGAGGGCACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAA  
GTCCCACCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTCACCATAGTCTAA  
TAGAAAACAACCGAAACCAATAATTCAAGCACTGCTTATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCT  
CCTACAAGCCTCAGAGTACTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTTTT  
GTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCATTATTGGCTCAACTTTCTCACTATCTGCTTATCCGCC  
AACTAATATTTCACTTTACATCCAAACATCACTTTGGCTTCGAAGCGCGCCTGATACTGGCATTTTGT  
AGATGTGGTTTACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTTAGTATAAATAGT  
ACCGTTAACTTCCAATTAACCTAGTTTGGACAACATTCAAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTAA  
TAATCAACACCCCTCCTAGCCTTACTACTAATAATTAATTACATTTTACTACCACAACCTCAACGGCTACAT  
AGAAAAATCCACCCCTACGAGTGCAGGCTTCGACCCATATCCCCCGCCGCTCCCTTTCTCCATAAAA  
TTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTATTATTGATCTAGAAATGGCCCTCCTTTTACCCTACCATGAG  
CCCTACAAAACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCATCCTAGCCCTAAG  
TCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAGGATTAGACTGAACCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAAT  
GATTTGACTCATTAATTTATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTTACATAAATATTATACTAG  
CATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCATATCCTCCCTACTATGCCTAGA  
AGGAATAATACTATCGCTGTTTATTATAGTACTCTCATAACCCCTAACACCCACTCCCTCTTAGCCAA  
ATTGTGCCTATTGCCATACTAGTCTTTGCCGCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCCTACTAGTCTCAA  
TCTCAAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTAAACCTACTCCAATGCTAAAACCTAATCGTCCCA  
ACAATTATATTACTACCCTGACATGACTTTCCAAAAACACATAAATTTGAATCAACACAACCACCCACA  
GCCTAATTATTAGCATCATCCCTTACTATTTTTTAAACCAAATCAACAACAACCTATTTAGCTGTTCCCC

AACCTTTTCTCCGACCCCTAACACCCCTCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTCACAATC  
ATGGCAAGCCAACGCCACTTATCCAGTGAACCCTATCACGAAAAAACTCTACCTCTCTATACTAATCT  
CCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTCACAGCCACAGAATAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAAC  
CACACTTATCCCCACCTTGGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAAGCCTGAACGCAGGCACA  
TACTTCTATTTACTACCCCTAGTAGGCTCCCTTCCCTACTCATCGACTAATTTACTCACAACACCC  
TAGGCTCACTAAACATTTACTACTCACTCTCACTGCCAAGAATAATCAAACCTCTGAGCCAACAAT  
AATATGACTAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCACTTATGACTCCCT  
AAAGCCCATGTGGAAGCCCCATCGCTGGGTCAATAGTACTTGGCGCAGTACTCTTAAAATAAGGCGCT  
ATGGTATAATACGCTCACACTCATTCTCAACCCCTGACAAAAACACATAGCCCTACCCCTTCCCTGTACT  
ATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAACAGACCTAAAATCGCTCATTGCA  
TACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCGTAGTAAACAGCCATTCTCATCCAAACCCCTGAAGCTTACCG  
GCGCAGTCAATTTCTATAATCGCCACGGGCTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGCAAACCTCAAATA  
CGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTACTCCACTAATAGCTTTT  
TGATGACTTCTAGCAAGCCTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAATCTCTG  
TGCTAGTAAACCGTTCTCTGATCAAATACACTCTCCTACTTACAGGACTCAACATACTAGTCACAGC  
CCTATACTCCCTCTACATATTTACCACAACACAATGGGGCTCACTCACCCACCACATTAACAACATAAAA  
CCCTCATTACACGAGAAAAACCCCTCATGTTTACATACCTATCCCCATTCTCTCCTATCCCTCAACC  
CCGACATCATTACCGGTTTTCTCTTGTAAATATAGTTTAAACAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAA  
CAGAGGCTTACGACCCCTTATTTACCGAGAAAGCTCACAAGAATACTGCTAACCTCATGCCCCCATGTCTAAC  
AACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTTAGGCCCAAAAATTTTGGTGCA  
ACTCCAAAATAAAAAGTAATAACCATGCACACTACTATAACCACCCCTAACCCCTGACTTCCCTAATCCCCC  
ATCCTTACCACCCCTCGTTAACCTTAAACAAAAAACTCATACCCCATTTATGTAATAATCCATTGTGCGAT  
CCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTCATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAA  
CTGACACTGAGCCACAACCCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAACCTAGACTACTTCTCCATAATA  
TTCATCCCTGTAGCATTGTTCTGTTACATGGTCCATCATAGAATTTCTACTGTGATATAAACTCAGACC  
CAAACATTAATCAGTCTTCAAATATCTACTACTCTTCTTAATTAACATACTAATCTTAGTTACCGCTAA  
CAACCTATTCCAAGTGTTCATCGGCTGAGAGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGTCTCATCAGTTGATGA  
TACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGCAATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTT  
TCATCCTCGCCTTAGCATGATTTATCCTTACTCTCAACTCATGAGACCCACAACAATAAGCCCTTCTAAA  
CGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCTCCTCCTAGCAGCAGCAGGCAATCAGCCCAATTAGGT  
CTCCACCCCTGACTCCCTCAGCCATAGAAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCATA  
TAGTTGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCCACTAATCCAAC  
TCTAACACTATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCGCAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATC  
AAAAAATCGTAGCCTTCTCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAATAGTTACAATCGGCATCAACCAAC  
CACACCTAGCATTCTGCACATCTGTACCCAGCCTTCTTCAAAGCCATACTATTTATGTGCTCCGGGTC  
CATCATCCACAACCTTAAACAATGAACAAGATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCCATACCTCTC  
ACTTCAACCTCCCTCACCATTTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCCTACAGGTTTCTACTCCA  
AAGACCACATCATCGAAAACCGCAAACATATCATAACAAAACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGC  
TACCTCCCTGACAAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTTCTTCTCACCCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCCCC  
ACCCTTACTAACATTAACGAAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCATTAACGCCTGGCAGCCGGAAGCC  
TATTGCGAGGATTTCTCATTACTAACAACATTTCCCCCGCATCCCCCTTCAAACAACAATCCCCCTCTA  
CCTAAAACCTACAGCCCTCGCTGTCACTTTCTTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTCAACTACCTAACC  
AACAACTTAAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTATTTCTCAAACATACTCGGATTTACTCCCTAGCA  
TCACACACCGCAACAATCCCCTATCTAGGCTTCTTACGAGCAAAACCTGCCCTACTCTCTTAGACCT  
AACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTTACAGCACCAAATCTCCACCTCCATCATCACTCA  
ACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACTTCTCTTTTCTTCTTCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAA  
TCACATAACCTATTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACCCAACAACAATGTTCAACCAGTAA  
CTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCCGACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGA  
CCCCCTCCTTATAAATTTATCAGCTTCTTACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCATAC  
TCTTTCACCCACAGCACCAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAAACACTCACCACAGCCTCAACCC  
CTGACCCCATGCTCAGGATACTCTCAATAGCCATCGCTGTAGTATATCAAAGACAACCATCATTCC  
CCCTAAATAAATTAAAAAACTATTAACCCATATAACCTCCCCAAAATTCAGAATAATAACACACCCCG  
ACCACACCGCTAACCAATCAATACTAAACCCCATAAATAGGAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCCAACAAC  
CCATTACTAAACCCCACTCAACAGAAAACAAAGCATACATCATTATCTCGCAGGACTACAACCACGAC  
CAATGATATGAAAAACCATCGTTGTATTTCAACTACAAGAACACCAATGACCCCAATACGAAAACCTAAC  
CCCCATAAATAAATTAATTAACCACTCATTATCATCGACCTCCCCACCCATCCAACATCTCCGATGATGAA  
ACTTCGGCTCACTCCTTGGCGCCTGCCTGATCCTCAAATCACCACAGGACTATTCTTAGCCATGCACTA  
CTCACCAGACGCTCAACCGCTTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAATTTATGGCTGAATC  
ATCCGCTACCTTACGCCAATGGCGCCTCAATATCTTTATCTGCCTTCTCTACACATCGGGCGAGGCC  
TATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTATCCTCTGCTTGAACCTATAGC  
AACAGCCTTATAGGCTATGTCTCCCGTAGGCCAAAATATCATTCTGAGGGCCACAGTAATTACAAAC

TTACTATCCGCCATCCCATACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCTACTCAGTAGACA  
GTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCAC TTCATCTTGCCCTTCATTATTGCAGCCCTAGCAACACT  
CCACCTCCTATTCTTGCACGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAATC  
ACCTTCCACCCTTACTACACAAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTCTTCCTTCTCCTTAATGACAT  
TAACTACTATTCTCACCAGACCTCCTAGGGGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCC  
TCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTCGCCCTACACAATTCTCCGATCCGTCCCTAACAACTA  
GGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCTAGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAC  
AACAAAGCATAAATATTTGCCCCACTAAGCCAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGCAGACCTCCTCATTCT  
AACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAGCTACCCTTTTACCATCATTGGACAAGTAGCATCCGTACTATAC  
TTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAACTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTC  
CTTGTAGTATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAAGGACAAATCAGA  
GAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAACTATTCTCTGTTCTTTC  
ATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTCGTACA  
TTACTGCCAGCCACCATGAATAATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCA  
ATCCACATCAAAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCA  
ACTGCAACTCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAG  
TACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCC  
TCAGATAGGGTCCCTTGACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAGAGTGCTACTCTCCTCG  
CTCCGGGCCATAAACAATTGGGGTAGCTAAAGTGAACGTATCCGACATCTGGTTCCCTACTTCAGGGTC  
ATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATG

## 8.7 Especificidad de los *primers* para el 7S DNA

Para comprobar si la amplificación del 7S DNA con los *primers* de la [Tabla 3.38](#) (presentes en la mezcla 7S DNA (VIC)) era específica, se llevó a cabo una PCR y posterior secuenciación del producto de PCR, realizando entre medio los diversos pasos explicados en el apartado 3.2. Los reactivos y el programa de PCR utilizados se muestran en las [Tablas 8.6 y 8.7](#). Como puede comprobarse en las [Figuras S5 y S6](#), el amplificado obtenido fue específico y se correspondió con el fragmento de 85 pb del 7S DNA que quiso cuantificarse por qPCR, tal y como se describe en el apartado 3.3.15.

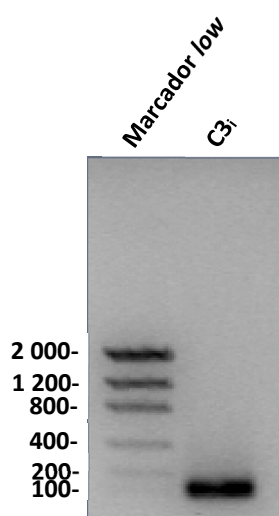
**Tabla 8.6.** Reactivos para amplificar el 7S DNA por PCR

Reactivo	Concentración stock	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
PHS II polimerasa	2 U/ $\mu$ l	1	0,04 U/ $\mu$ l
Tampón HF	5 X	10	1 X
dNTPs	10 mM	1	200 $\mu$ M
7S DNA (VIC)	20 X	2,5	1 X
Muestra	100 ng/ $\mu$ l	2,5	5 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O comercial	-	33	-
Volumen final		<b>50</b>	

**Tabla 8.7.** Programa para amplificar el 7S DNA por PCR

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
1. Desnaturalización inicial	300	98
2. Desnaturalización	10	98
3. Hibridación	20	63,5
4. Extensión	5	72
5. Final de la extensión	300	72
	$\infty$	4

30 ciclos



**Figura S5.** Gel de agarosa (1 %) de la PCR del fragmento de 85 pb del 7S DNA con la mezcla de *primers* 7S DNA (VIC). La muestra que se amplificó por PCR fue DNA de fibroblastos inmortalizados de 3 años (C3i). El producto de PCR dio lugar a una única banda.

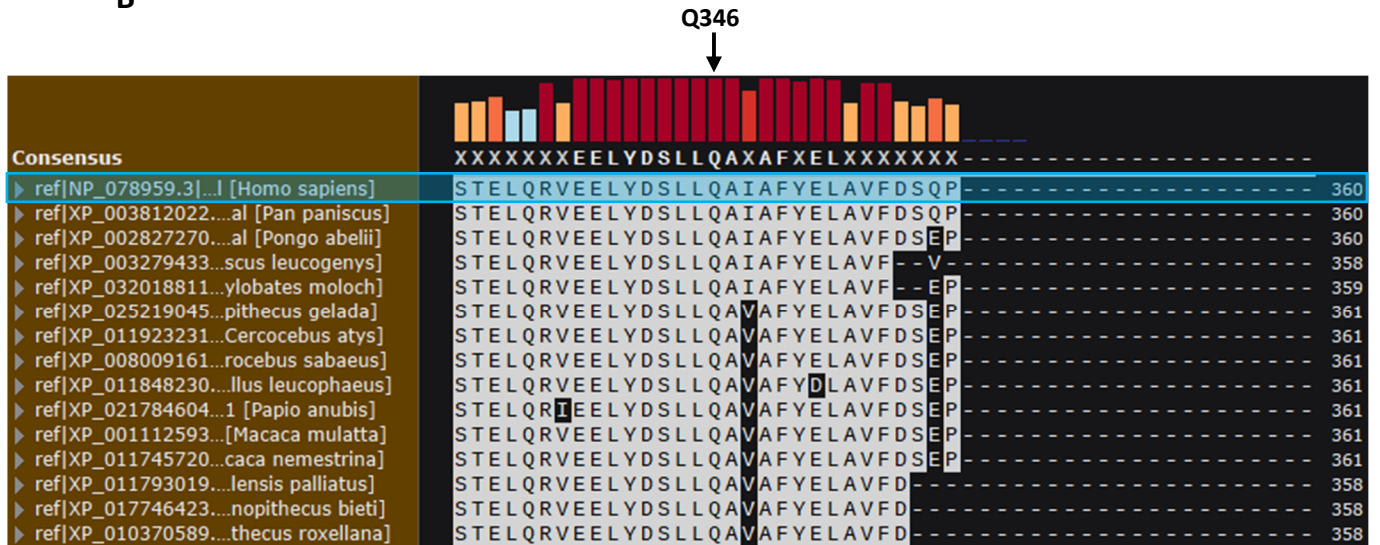
7S DNA	CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGG	7S DNA
0QXU8	CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACG-A	C3a I - 1
0QXU9	CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGGA	C3a I - 2
0QXUA	CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGGA	C3a I - 3
0QXUB	CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCACGATGGATCACAGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGGA	C3a I - 4

**Figura S6.** Secuencias del fragmento de 85 pb de 7S DNA amplificado por PCR. La secuencia superior se corresponde con la teórica amplificada por los *primers* de la mezcla 7S DNA (VIC), mientras que cada una de las 4 secuencias inferiores pertenece al inserto clonado en el vector pCR™-Blunt II-TOPO®, purificado de 4 colonias diferentes de bacterias *E. coli* DH5α™. Las secuencias fueron obtenidas por la empresa Secugen S.L. mediante secuenciación de Sanger y alineadas con el programa CodonCode Aligner. Los resultados confirman que los *primers* de la mezcla 7S DNA (VIC) amplifican el fragmento de 85 pb de interés del 7S DNA.





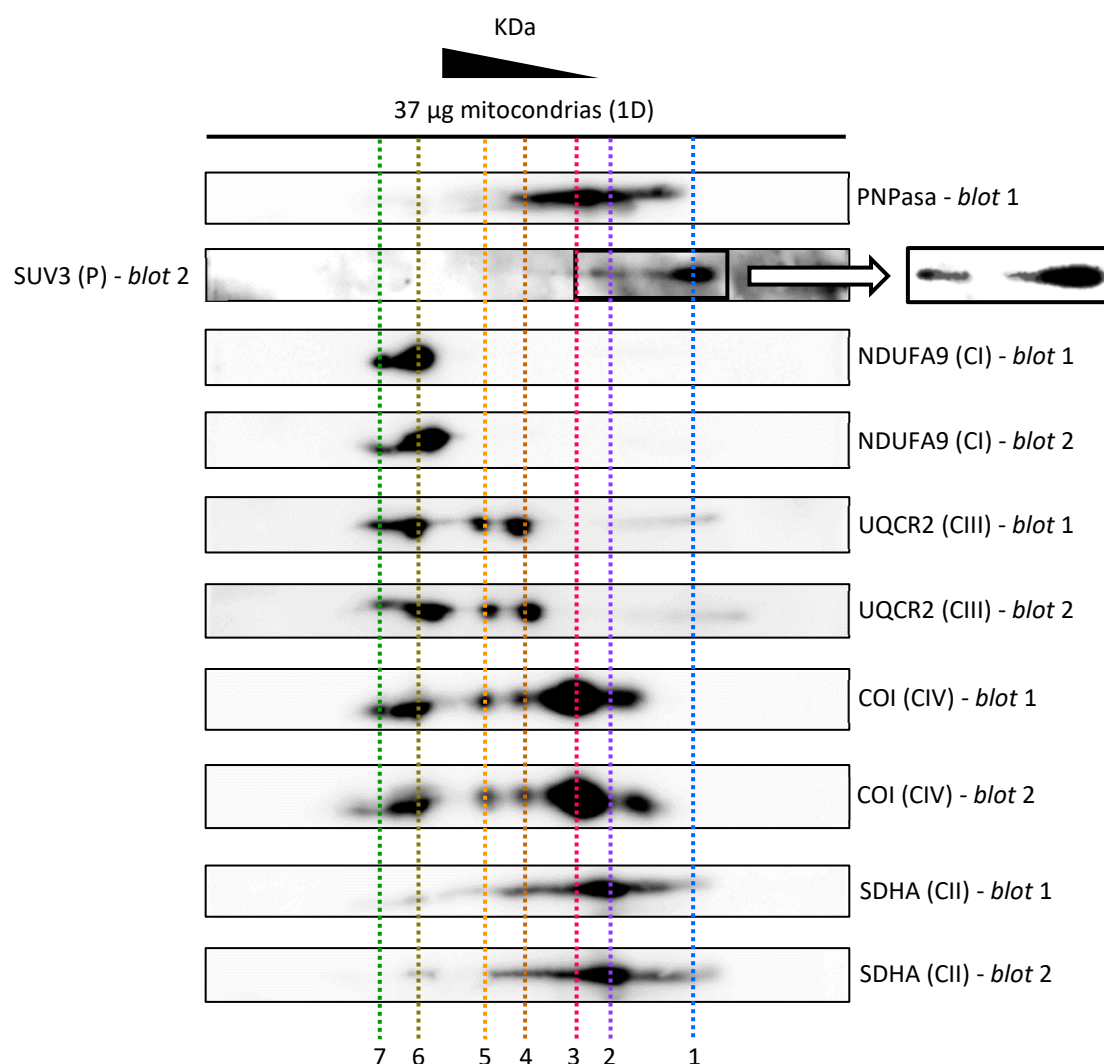
B



**Figura S7.** Alineamiento múltiple y conservación de residuos de 250 secuencias de la PNPasa (A) y TEFM (B). Para ambas proteínas se ofrecen 15 de las 250 secuencias, destacando las pertenecientes a *Homo sapiens* en azul (PNPasa: NP\_149100.2; TEFM: NP\_07859.3) y los residuos homólogos en gris del resto de proteínas con respecto a éstas. Además, tanto en (A) como en (B) se muestra un fragmento del alineamiento múltiple (en (A) separado en dos imágenes): residuos S498-Q576 (PNPasa humana) y residuos S331-P360 (TEFM humano). Encima de las secuencias alineadas, aparece la secuencia consenso que muestra qué residuo se encuentra por encima de un límite establecido, en este caso, en más del 95 % de las 250 secuencias (si no hay ninguno que cumpla este criterio aparece una X). Tanto la A507 como la K562 para la PNPasa, así como la Q346 para TEFM, están en la secuencia consenso. Finalmente, en relación a lo anterior, las barras superiores señalan en altura e intensidad de color la conservación de los residuos en una determinada posición entre las secuencias alineadas, estando más conservadas aquellas de mayor altura y con un rojo más intenso.

### 8.9 Análisis del degradosoma mitocondrial por BN-PAGE 2D

Para investigar la formación del complejo degradosoma, se aislaron mitocondrias de células HEK293T y se llevó a cabo una BN-PAGE 2D: primero se separaron en un gel nativo y, posteriormente, las bandas de interés se recortaron y se corrieron en una segunda dimensión con geles de Tricina-SDS-PAGE (ver la [Figura 3.2](#) como ejemplo). Después, los resultados se transfirieron a membranas de PVDF, en que se analizó la presencia de la PNPasa y de SUV3. Para ello, además, se utilizó la altura (correspondiente a la primera dimensión) del CI, CII, CIII y CIV del sistema OXPHOS y sus asociaciones con objeto de alinear las distintas membranas entre sí. Todas las posibles bandas detectadas y coincidentes en altura entre la PNPasa y SUV3 son menores a los 330 kDa del degradosoma ([D. D.-H. Wang et al., 2009](#)), ya que se localizan entre el CII y el CIV (130-205 kDa), y, por tanto, no se pudo analizar el degradosoma ([Figura S8](#)).



**Figura S8.** Caracterización del ensamblaje del degradosoma en mitocondrias de la línea HEK293T. Localización de SUV3, de la PNPasa y del degradosoma en dos membranas de PVDF (*blot 1* y *blot 2*) obtenidas a partir de una BN-PAGE 2D, cargando 37 µg de mitocondrias en la primera dimensión. Los anticuerpos se añadieron secuencialmente (la (P) de SUV3 es de policlonal; [Tabla 3.42](#)) y los complejos y asociaciones del sistema OXPHOS se utilizaron para alinear los resultados obtenidos, habiendo un aumento progresivo del MW (kDa) de las especies detectadas de derecha a izquierda. De SUV3 (*blot 2*) se ofrece, además, una imagen con una mayor ampliación y contraste para una mejor visualización de las bandas detectadas en su membrana. 1 = SUV3; 2 = CII; 3 = CIV; 4 = CIII<sub>2</sub>; 5 = CIII<sub>2</sub> + CIV; 6 = CI; 7 = SC.

## 8.10 Panel virtual de RNA-seq y las diferencias observadas en los fibroblastos (en %)

Gen	P1 (vs C3)	P2 (vs C15)	C15-TEFM (vs C15)	C3 (vs C15)
POLG	121,6124368	118,1894749	98,34276739	87,80288964
POLG2	96,75550507	79,14740234	99,01066086	95,68224211
TWINK	110,9412177	117,1860727	83,13418228	108,9417857
mtSSB	118,5895969	104,5875383	96,41266691	91,3637323
MGME1	75,46005145	106,8364646	78,01885288	98,73524662
RNASEH1	107,3539138	105,7683055	102,0102677	105,3416727
POLRMT	109,4540452	108,0412964	88,10243232	85,75621685
TFAM	115,1300151	99,79115245	89,78667759	94,72080385
TFB1M	95,69806337	86,65148938	102,2450914	93,68471623
TFB2M	98,04699128	82,67194284	88,16398584	85,82639058
<b>TEFM</b>	96,55378438	80,85814299	2921,820735	85,72970808
MTERF1	78,39080895	80,36042034	101,8198681	100,5095461
MTERF2	87,55373945	73,53792247	77,0216901	95,41006125
MTERF3	116,5438897	135,2681642	94,03351538	113,158142
MTERF4	95,22220167	85,50474894	97,14351801	95,2614014
NSUN4	128,5681508	111,8182157	102,6572059	111,4639155
MRPL12	135,6555125	138,6214692	95,30502397	108,8981318
MTRES1	95,14951652	87,29405249	72,00545635	85,37018743
MRPP1	113,9681572	105,6755555	90,82849494	84,13362468
MRPP2	120,2632788	137,555329	101,4178486	135,3438209
MRPP3	96,98746202	89,57220804	96,54295712	101,6867849
ELAC2	102,7144927	101,4775625	90,40411555	99,05008017
FASTK	116,0896374	102,6530073	114,4713672	105,275423
FASTKD1	99,62143109	89,89508123	98,67373842	93,40200073
FASTKD2	103,6784919	87,73168697	92,6469562	90,99709558
FASTKD3	106,2176481	102,2282924	98,55398535	91,25957148
FASTKD4	112,5368751	113,0592017	100,008999	102,1213976
FASTKD5	91,6135831	120,4440552	93,69327659	117,0387429
<b>PNPT1</b>	65,51661827	114,4068705	93,49877664	112,6262492
SUPV3L1	132,8303454	110,5759686	107,1744973	98,40531834
MTPAP	126,7437144	107,8873219	100,7988522	99,28871287
LRPPRC	107,2213887	96,37843652	90,45664609	95,52152414
SLIRP	111,318101	115,9018473	96,47933566	107,2704975
GRSF1	118,876041	90,55926982	104,0968626	91,81906153
MYC	159,7064831	105,5291974	72,95447457	72,98533454
CDKN1B	76,46867847	73,6063787	88,43151213	91,80667122
IFI27	64,94053482	437,5874898	66,36025386	137,0558498
IFI44L	173,2874817	254,5827819	171,0113499	322,3616256
IFIT1	160,2334206	45,73086357	39,9293654	40,7081154
ISG15	224,1225619	67,31827288	84,34097506	48,07445423
RSAD2				
SIGLEC1				

REXO2	110,6911413	101,3805546	98,02864889	92,4694944
DDX28	157,6136007	88,6191493	94,12426434	75,45941352
DHX30	108,0591721	109,7168736	98,2037722	107,0799807
PMPCA	124,6418939	106,3707463	91,72924961	91,47820547
PMPCB	94,7413062	112,138172	106,5736544	121,4335602
LONP1	157,8356596	138,5128066	106,5312776	94,01374281
TRUB2	128,1434851	91,83215556	100,1285141	89,32816862
TRNT1	141,0702077	91,89837792	88,22324815	81,31733457
THG1L	129,5566838	104,1476277	94,01853794	99,74431282
CS	111,2097956	120,8782898	102,173686	93,45065036
TPH1			130,2920584	54,17540583

Leyenda
1
2
3
4
5
6
7

#### Diferencia significativa si p-valor ajustado < 0,05

1. Mayores niveles significativos.
2. Diferencia de niveles no significativa, muy próxima a 0,05.
3. Diferencia de niveles no significativa.
4. Menores niveles significativos.
5. Menores niveles significativos, muy próxima a 0,05.
6. Sin detección (o con niveles muy bajos).
7. Genes con mutaciones asociadas a enfermedad mitocondrial (Craven et al., 2017; Frazier et al., 2019; Rahman, 2020; Thompson et al., 2020).

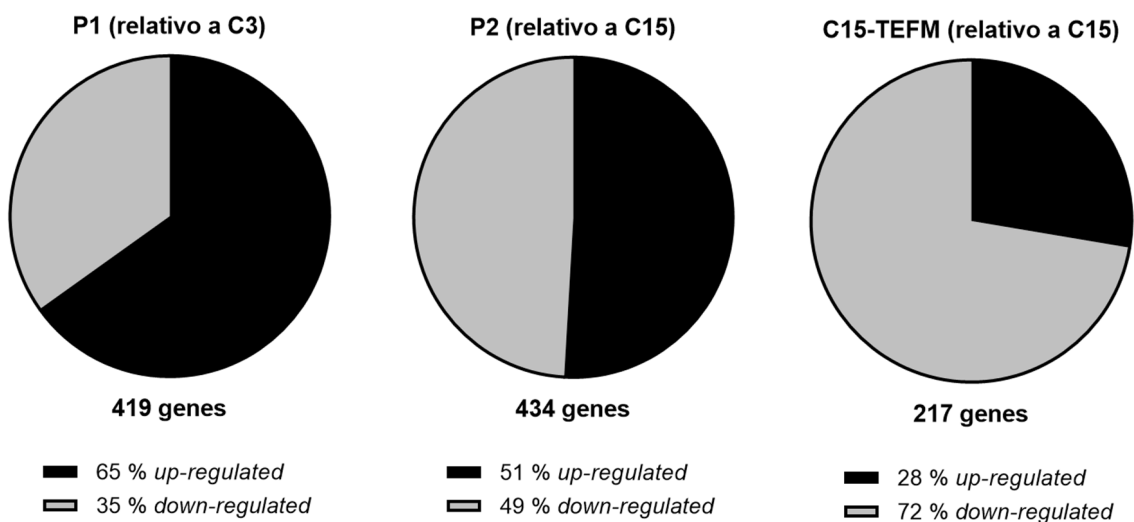


### 8.11 Estudio del mitotranscriptoma de fibroblastos (MitoCarta 3.0)

A partir de los datos obtenidos de la RNA-seq, se llevó a cabo un análisis para cada una de las muestras de interés (P1, P2, C15-TEFM) de los 1 136 genes que codifican para las proteínas de localización mitocondrial y que desempeñan una función en dicho orgánulo. En concreto, se evaluó tanto el incremento como el descenso, en caso de ser estadísticamente significativos (es decir, si el p-valor ajustado es  $< 0,05$  con respecto a los valores del control empleado), de los transcritos de dichos genes de forma global ([panel A](#)) y para cada una de las 16 funciones mitocondriales en que se dividieron<sup>290</sup> ([panel B](#)).

En el primer caso ([panel A](#)), destaca el comportamiento distinto que tiene cada una de las muestras con respecto a sus controles, en lo que puede influir tanto el control utilizado (si bien para P2 y C15-TEFM es el mismo) como el hecho de que cada uno de los fibroblastos analizados presenta un defecto genético diferente. Además, también cabe mencionar que la muestra que presenta menos genes con niveles significativos de los 1 136 es C15-TEFM (217 genes), posiblemente debido a que el fondo genético (salvo por la inserción de más copias de *TEFM wild-type*) es el más parecido al control utilizado.

A

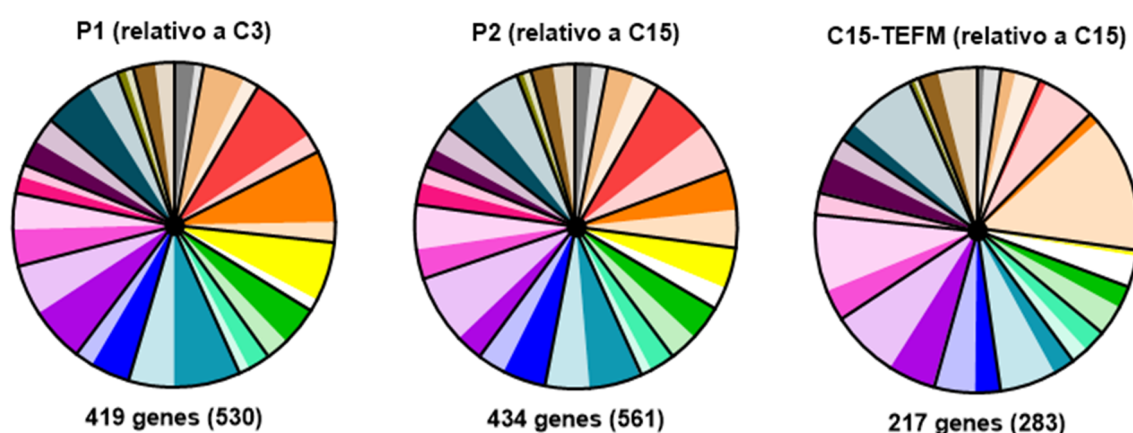


En el segundo caso ([panel B](#)), pueden extraerse varias observaciones. Por un lado, el comportamiento generalizado de las 16 funciones mitocondriales es similar al obtenido con el panel virtual de los 53 genes (disponible en el anexo anterior), al menos, para los fibroblastos del ambos pacientes: dentro de los genes cuyos niveles son estadísticamente significativos, en el panel virtual hay más que aumentan de los que disminuyen para el paciente de *PNPT1* (P1), mientras que en el paciente de *TEFM* (P2) no se detecta una tendencia tan clara (es similar el porcentaje de los genes que aumentan y que disminuyen) y, precisamente, esto mismo es lo que se observa al analizar sus mitotranscriptomas. De hecho, en el caso de P1, aumentan especialmente los genes del mantenimiento del mtDNA; el metabolismo del mtRNA; la traducción; el sistema OXPHOS; el importe, clasificación y homeostasis de proteínas. Por su parte, al sobreexpresar *TEFM* (C15-TEFM) en prácticamente todas las funciones hay más genes

<sup>290</sup> Esta clasificación funcional de los genes se realizó en base a las rutas establecidas en MitoCarta 3.0 ([Rath et al., 2021](#)).

con una diferencia significativa que disminuyen y menos que aumentan, lo que tiene sentido con el resto de los resultados obtenidos para este modelo (presentes a lo largo del apartado 4.2.9). Dicho de otra manera, todo el metabolismo relacionado con la fosforilación oxidativa (transcripción, replicación, niveles proteicos, niveles de complejos y supercomplejos, etc.) presenta un déficit grave al sobreexpresar *TEFM* en fibroblastos, de manera que coincide con que los genes relacionados con dicho metabolismo disminuyan sus niveles. Además, este mismo efecto también se produce en el resto de las funciones analizadas y no relacionadas directamente con el sistema OXPPOS, lo que sugiere que toda la funcionalidad mitocondrial se encuentra comprometida y supone una evidencia más de que sobreexpresar *TEFM* lleva a los fibroblastos a adquirir un fenotipo bioquímico más glucolítico.

## B

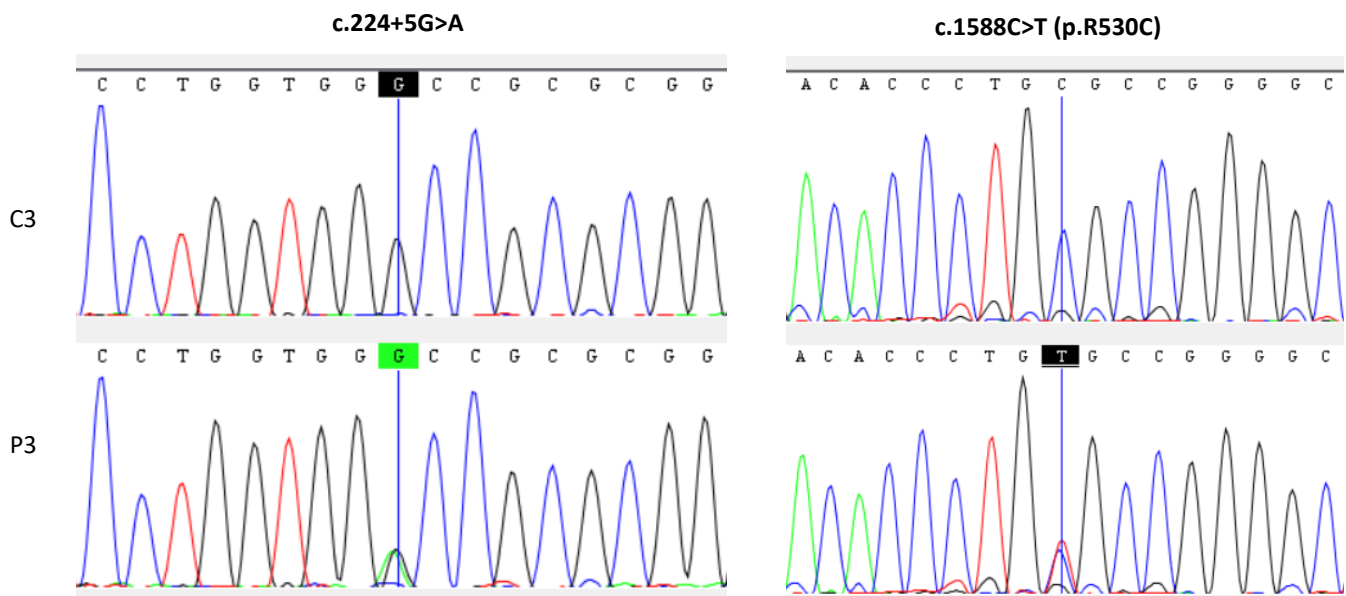


Funciones mitocondriales	P1 (vs C3)			P2 (vs C15)			C15-TEFM (vs C15)		
	Genes	> (%)	< (%)	Genes	> (%)	< (%)	Genes	> (%)	< (%)
Mantenimiento del mtDNA	15	73	27	17	53	47	7	29	71
Metabolismo del mtRNA	31	74	26	30	53	47	11	36	64
Traducción	47	79	21	61	56	44	17	12	88
OXPPOS	49	64	36	44	52	48	42	7	93
Importe y homeostasis de proteínas	37	84	16	36	64	36	10	10	90
Transporte de moléculas pequeñas	33	64	36	34	56	44	15	40	60
Señalización	18	67	33	22	68	32	11	55	45
Dinámica y supervisión mitocondriales	59	59	41	54	54	46	22	27	73
Metabolismo glucídico	31	68	32	39	62	38	19	37	63
Metabolismo lipídico	55	53	47	55	29	71	32	41	59
Metabolismo de aminoácidos	39	51	49	41	39	61	31	29	71
Metabolismo de nucleótidos	15	60	40	22	55	45	6	0	100
Metabolismo de vitaminas	28	50	50	24	42	58	16	62	38
Metales y cofactores	43	60	40	48	46	54	25	20	80
Transportadores de electrones	8	50	50	8	50	50	2	50	50
Detoxificación	22	55	45	26	50	50	17	35	65

## 8.12 Investigación de la patología de variantes encontradas en *CARS2* y *FARS2*

### 8.12.1 *CARS2*

En primer lugar, se extrajo DNA total de los fibroblastos del paciente (P3) y de un control (C3), se amplificó *CARS2* por PCR y los productos obtenidos se purificaron y mandaron a secuenciar por secuenciación de Sanger, confirmando la presencia de las dos variantes en el paciente detectadas previamente por WES en el IIER (Figura S9).



**Figura S9.** Electroferogramas con las variantes en el gen *CARS2* de fibroblastos del paciente. Alineamiento de secuencias entre el control C3 y el paciente P3, obtenidas partiendo de DNA. En el control sólo aparece el nucleótido *wild-type* en la posición 5 del primer intrón (electroferograma de la izquierda) y en la 1 588 (electroferograma de la derecha) de la CDS (ambas posiciones indicadas con una línea vertical azul), mientras que el paciente presenta un doble pico en ambas posiciones, coincidente con la presencia de las variantes en heterocigosis compuesta.

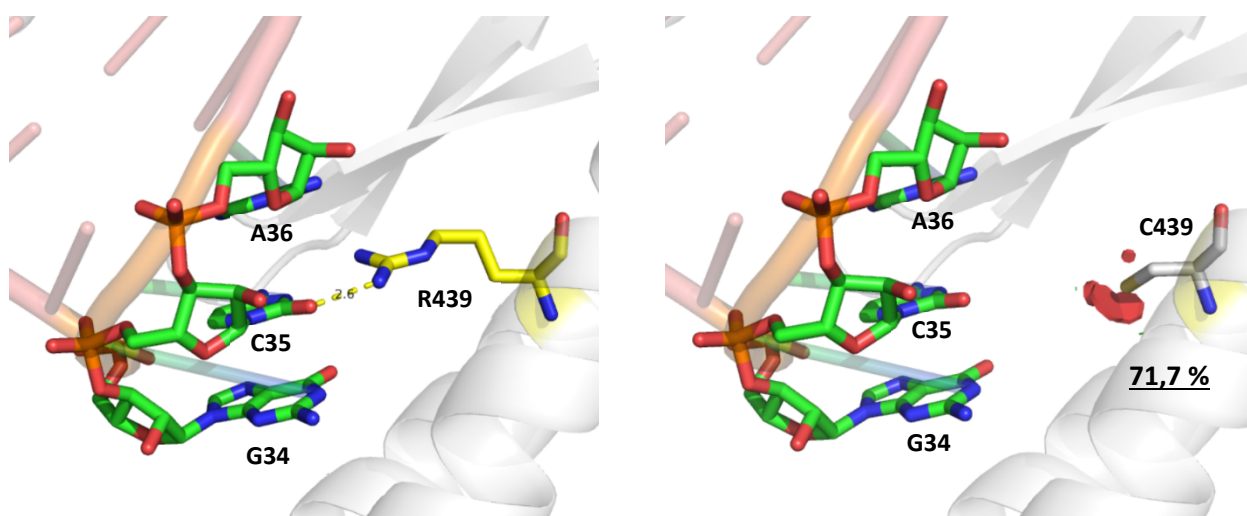
En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis bioinformático en que se evaluó la patología de las variantes mediante predictores y estudiando la estructura de la proteína codificada por *CARS2*, es decir, la cisteinil-tRNA sintetasa mitocondrial. En primer lugar, *Human Splicing Finder* predice que la variante c.224+5G>A provoca la ruptura del sitio donador de *splicing* del intrón 1, sugiriendo que causa la retención del intrón en el mRNA sintetizado a partir del alelo materno y, por tanto, cambiando el marco abierto de lectura (en rojo en la secuencia inferior) y la aparición de un codón de parada prematuro (-):

**MLRTRTRGPGGLGPPLLQAALGLGRAGWHWPAGRAASGGRGRAWLQPTGRETGVQVYNSLTGRKEPLIVAHA  
EAASWWTARDWGTGGGRSWRRLPTAERDLGSGRAFRKLGGRRSRWGCAVLLQVWV-**

Por su parte, la variante c.1588C>T se predice como patológica por todos los predictores utilizados: MutationTaster (probabilidad 0,99999999741498), PMut (92 % de que cause enfermedad) y Polyphen-2 (probablemente dañina, con una puntuación de 1,00; sensibilidad: 0,00; especificidad: 1,00). Además, a nivel proteico la variante afecta a la R530 (pasa a ser C530, es decir, provoca el cambio de un residuo polar con carga positiva a otro polar sin carga), que se

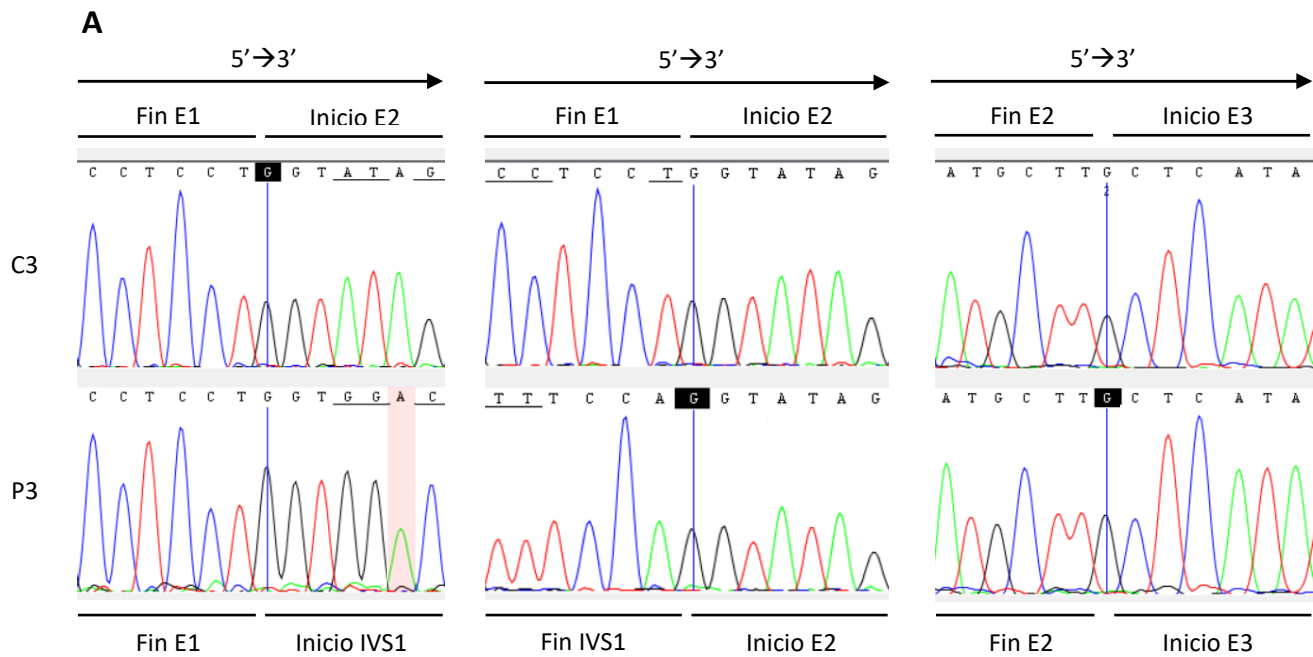


trata de un residuo altamente conservado y se corresponde con la R439 en *E. coli* (datos obtenidos por alineamiento de secuencias; no ofrecidos). Al no haber cristal de la CARS2 humana, se evaluó el efecto de la variante sobre la R439 de la proteína homóloga en *E. coli*, obteniéndose que se perdería el puente de hidrógeno que establece con la C35 del *loop* del anticodón del tRNA<sup>Cys</sup> (la R439 forma parte del dominio AB o *anticodon binding* con el que la enzima interactúa con dicho *loop* (Hauenstein et al., 2004; Newberry et al., 2002)) y que la conformación más probable que adoptaría la C439 (71,7 %) provocaría choques estéricos con residuos cercanos de la proteína (Figura S10). Estas observaciones corroboran el carácter patológico predicho de la variante del paciente y sugieren que afecta a la correcta interacción entre la cisteinil-tRNA sintetasa y el tRNA<sup>Cys</sup> y, por tanto, a la funcionalidad de la enzima.



**Figura S10.** Análisis del efecto de la variante p.R439C (homóloga a la p.R530C humana) en la cisteinil-tRNA sintetasa de *E. coli* (PDB 1U0B). El O2 de la C35, que constituye junto a la G34 y la A36 el *loop* del anticodón del tRNA<sup>Cys</sup>, forma un puente de hidrógeno con la R439 (distancia 2,6 Å). Al mutar el residuo *in silico* a cisteína, se pierde la interacción y la conformación más probable de la C439 (71,7 %) chocaría con residuos próximos, indicados mediante círculos rojos. Todas las bases nitrogenadas y residuos mencionadas se encuentran representados en *sticks*, en los que los átomos de oxígeno están en rojo, los de nitrógeno en azul y los átomos de carbono en verde (bases nitrogenadas G34-A36), en amarillo (R439) y en blanco (C439). La figura ha sido realizada con el programa PyMOL (v1.3r1).

En tercer lugar, se comprobó experimentalmente el efecto de la variante c.224+5G>A sobre la transcripción del alelo materno. Para ello, se extrajo RNA total, se retrotranscribió a cDNA con un *primer* poli(dT)<sub>18</sub>, se amplificó una secuencia comprendida entre los exones E1-E3 de la CDS de CARS2 mediante PCR, se corrieron los resultados en un gel de agarosa, se recortaron y purificaron las bandas de interés y, finalmente, éstas se mandaron a secuenciar por secuenciación de Sanger. En el paciente se detectaron dos productos de PCR, uno de tamaño similar al del control y otro de mayor tamaño (datos no ofrecidos): el de tamaño parecido procedía del alelo paterno, mientras que el de mayor tamaño del materno. Los resultados de secuenciación permitieron confirmar que la transcripción del alelo materno provoca la retención del primer intrón (Figura S11).



**B**

Alelo sano



Alelo materno

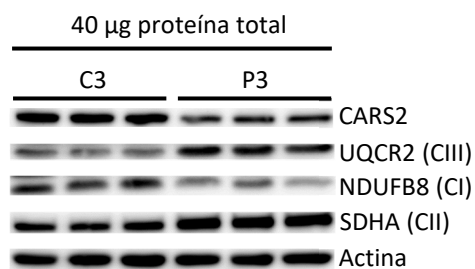


**Figura S.11.** Efecto de la variante c.224+5G>A de *CARS2* sobre la transcripción del alelo materno. **(A)** Alineamiento de secuencias entre el control C3 y el paciente P3 (concretamente, la banda superior obtenida en gel de agarosa, procedente del alelo materno; datos no mostrados), obtenidas partiendo de RNA total. Se ofrecen parte de los nucleótidos que constituyen el inicio y final de los exones 1-3 (E1-E3) de *CARS2*. El alelo materno retiene el intrón 1 (IVS1), en que la adenina resaltada en rojo claro se corresponde con la que resulta de la variante de estudio. **(B)**<sup>291</sup> Esquema a escala 1:1 en que se representan las secuencias obtenidas en **(A)**.

En cuarto lugar, se analizaron por *Western blot* los niveles de *CARS2* y de diversas subunidades de los complejos OXPHOS (Figura S12). Los niveles de la cisteinil-tRNA sintetasa mitocondrial caen en los fibroblastos del paciente con respecto al control, lo que coincide con la estimación de que, como se ya se ha indicado, la variante c.224+5G>A lleve a la formación de una proteína truncada que posiblemente sea degradada. Por su parte, existe una alteración de las subunidades OXPHOS analizadas del paciente, disminuyendo los niveles de NDUFB8, pero aumentando los de UQCR2 y SDHA, siendo especialmente relevantes los de esta última, ya que

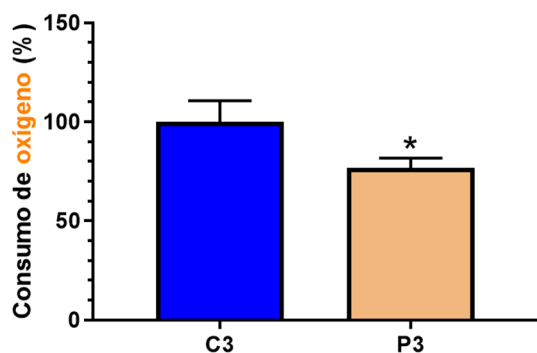
<sup>291</sup> La Figura S11B, S14B y S19B se elaboraron con la herramienta online <http://wormweb.org/exonintron>.

podrían indicar que en el paciente se estaría produciendo una mayor biogénesis mitocondrial para tratar de paliar la patología.



**Figura S12.** Niveles de las proteínas CARS2, UQCR2, NDUFB8 y SHDA en C3 y P3 por *Western blot*. Se utilizó un gel separador del 12,5 %. Los anticuerpos se añadieron de manera secuencial y se empleó la actina como control de carga.

Finalmente, se valoró la capacidad de consumo de oxígeno de los fibroblastos del paciente, obteniéndose menor en el mismo (Figura S13) y confirmando que experimenta una alteración de la fosforilación oxidativa como consecuencia de las variantes c.224+5G>A y c.1588C>T detectadas en heterocigosis compuesta detectadas en *CARS2*.



**Figura S13.** Capacidad de consumo de oxígeno ( $[(\text{fmolO}_2/\text{ml})/\text{min}]/\text{célula}$ ) en C3 y P3. Se evaluó con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN ( $n = 3$ ). Aparece representada la media de los valores obtenidos y su desviación estándar en porcentaje (%) con respecto a C3. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativo (\*) si  $p$ -valor  $< 0,05$  (comparando con C3).

Cabe destacar que se realizaron múltiples intentos para llevar a cabo un ensayo de complementación, pero no fue posible por no conseguir amplificar un fragmento del E1 de la CDS del gen, ni siquiera a partir de un vector comercial con la CDS clonada (solicitado a GenScript). Mediante la secuenciación de dicha CDS se comprobó que la secuencia en las bases de datos era correcta y, por tanto, se concluyó que se trataba de un problema en la retrotranscripción y/o la PCR.

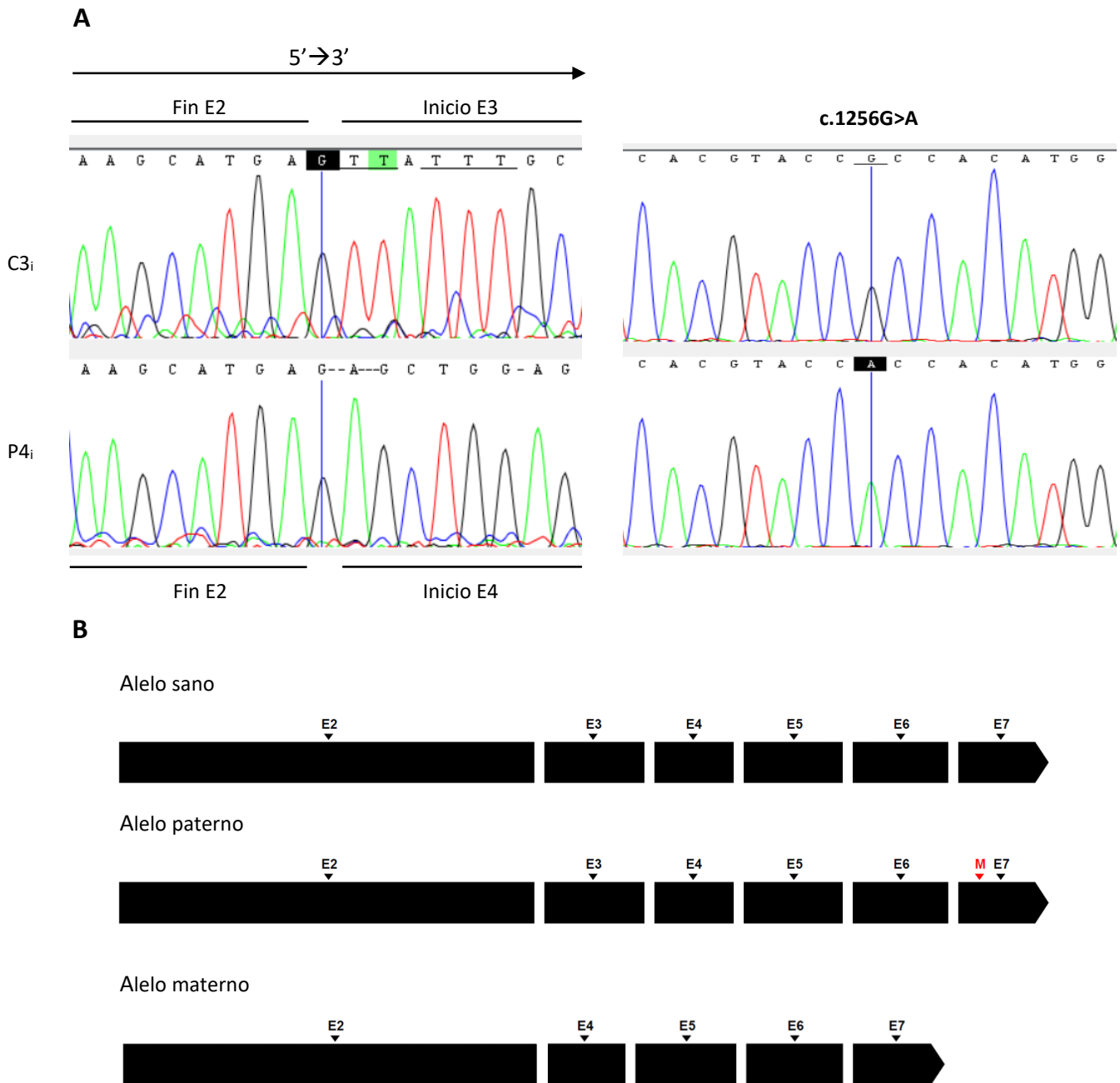
### 8.12.2 FARS2

En primer lugar, se extrajo RNA total de los fibroblastos inmortalizados del paciente (P4;) y de un control (C3<sub>i</sub>), se retrotranscribió a cDNA con un *primer* poli(dT)<sub>18</sub>, se amplificó por PCR *FARS2* (tanto la CDS completa como una secuencia comprendida entre los exones E2-E4 de la CDS<sup>292</sup>), se purificaron los productos de PCR<sup>293</sup> y se mandaron a secuenciar por secuenciación de Sanger. Se confirmó tanto la presencia de la variante c.1256G>A, procedente del padre, como la

<sup>292</sup> Al utilizar *primers* para toda la CDS de *FARS2* sólo fuimos capaces de detectar transcritos del alelo paterno, motivo por el que se diseñaron *primers* específicos para forzar la amplificación de los exones E2-E4 (en concreto, parte del E2, el E3 completo y un fragmento del E4).

<sup>293</sup> En particular, los productos de la PCR en que se amplificó la secuencia comprendida entre los exones E2-E3 se extrajeron a partir del gel de agarosa, mientras que los de la CDS completa de *FARS2* se clonaron en el vector pCR™-Blunt II-TOPO®, se transformaron bacterias *E. coli* DH5α, se crecieron colonias, se extrajo su vector con el inserto de interés y se mandó a secuenciar.

delección del exón 3 heredada de la madre (Figura S14), teniendo en cuenta, además, que el primer exón del gen no es codificante (Almannai et al., 2018).



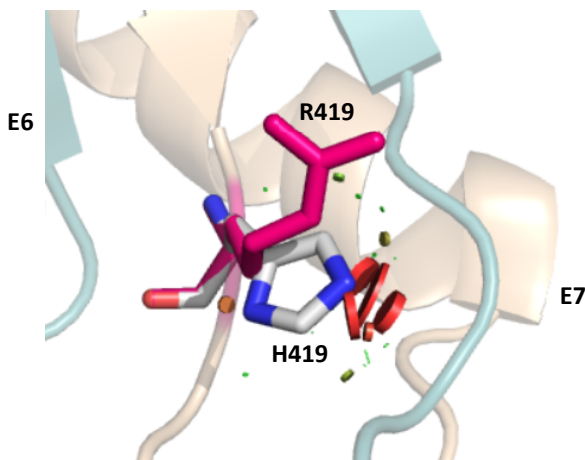
**Figura S14.** Electroferogramas y esquemas con las variantes en el gen *FARS2* de fibroblastos del paciente. **(A)** Alineamiento de secuencias entre el control C3<sub>i</sub> y el paciente P4<sub>i</sub>, obtenidas partiendo de RNA total. En el transcrito procedente del alelo materno del paciente se pierde el exón 3 (E3; electroferograma de la izquierda) de *FARS2* y en el control aparece el nucleótido *wild-type* en la posición c.1256 de la CDS de dicho gen, mientras que en el paciente se visualiza una adenina en dicha localización. **(B)** Esquema a escala 1:1 en que se representan las secuencias obtenidas en **(A)**<sup>294</sup>. La variante c.1256G>A aparece representada como una M en rojo.

En segundo lugar, se analizó el mtDNA del paciente, obteniéndose diversos polimorfismos, pero ninguna mutación. A partir del estudio de los cambios encontrados, se

<sup>294</sup> El esquema del alelo materno es una estimación a partir del exón 4.

concluyó que el paciente pertenece al haplogrupo poblacional K1a. Dichas variantes fueron: A73G, A93G, T195C, A263G, Ins315C, C497T, Ins515-516CA, A750G, T1189C, A1438G, A1811G, A2706G, A3480G, A4769G, C7028T, A8860G, G9055A, T9698C, A10398G, A10550G, T11299C, A11467G, G11719A, A12076G, A12308G, G12372A, G13145A, A13827G, C14167T, C14766T, T14798C, A15326G, T16093C, T16224C, T16311C, T16519C.

En tercer lugar, se llevó a cabo un análisis bioinformático en que se evaluó la patología de la variante c.1256G>A mediante predictores y estudiando la estructura de la proteína codificada por *FARS2*, es decir, la fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial. La variante se predice como patológica por todos los predictores utilizados: MutationTaster (probabilidad 0,999999973737506), PMut (82 % de que cause enfermedad), PolyPhen-2 (probablemente dañina, con una puntuación de 1,000; sensibilidad: 0,00; especificidad 1,00). A nivel proteico la variante provoca el cambio de la R419 por H419, es decir, que se pasa de un residuo polar con carga positiva a otro residuo de la misma naturaleza. Además, el residuo 419 se encuentra en el dominio ABD o de interacción con el anticodón del tRNA<sup>Phe</sup> y es uno de los descritos como importantes para la estabilización de dicho dominio (Vantroys et al., 2017). Esto, junto al hecho de que todas las posibles conformaciones que puede adoptar la R419 al mutarla *in silico* a H419 generaría choques estéricos con sus residuos próximos (Figura S15), lleva a la siguiente hipótesis: la variante provoca una desestabilización del dominio ABD y posiblemente afecte a la capacidad de la enzima de reordenarse entre una estructura abierta y otra cerrada para interactuar con el tRNA<sup>Phe</sup> y ejercer correctamente su función (Kartvelishvili et al., 2017).



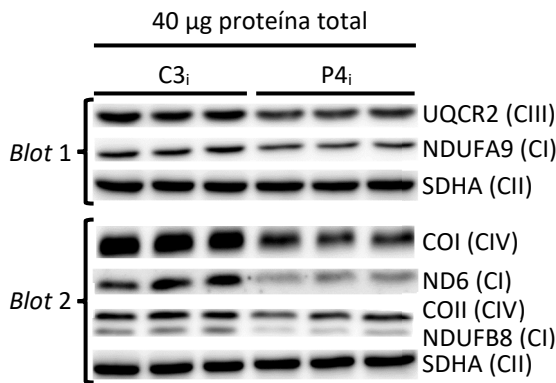
**Figura S15.** Mutación *in silico* del residuo R419 por H419 de la proteína codificada por *FARS2* (PDB 3CMQ). La figura ha sido elaborada con el programa PyMOL (v1.3r1). En rosa y sticks R419, en sticks y cada átomo de un color una de las conformaciones teóricas que ofrece el software de la H419, en azul verdoso el exón 6 (E6) y en marrón claro el exón 7 (E7). Los choques estéricos que generaría la H419 con los residuos alrededor se muestran en círculos rojos.

Por su parte, se analizó *in silico* el efecto de la delección del exón 3 sobre la secuencia proteica: provoca un cambio en el ORF (en rojo en la secuencia inferior) y la aparición de un codón de parada prematuro (-), generando así una proteína distinta y truncada:

```
MVGSALRRGAHAYVYLVSKASHISRGHQHQA WGSRPPAAECATQ RAPGSVV ELLGKSY PQDDHSNLTRKV
LTRVGRNLHNQQHHP LWL IKERVKEHFYKQYVGRFGT PLFSVDNLSPVVT TWQNFDSL LIPADHPSRKK
GDNYYLNRTHMLRAHTSAHQWDL LHAGLDAFLVVG DVYRRDQIDSQHYP IFHQLEAVRLF SKHE SWR-
```

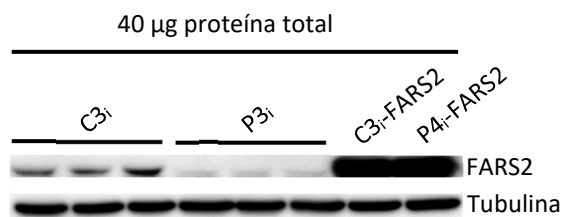
En cuarto lugar, se analizaron por *Western blot* los niveles de *FARS2* (Figura S17) y de diversas subunidades de los complejos OXPHOS (Figura S16). Los niveles de la fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial caen en los fibroblastos del paciente con respecto al control, lo que coincide, por un lado, con que el mRNA de *FARS2* del alelo materno no fuéramos capaces de detectarlo por PCR (al intentar amplificar la CDS completa) y con la estimación de que, al carecer del tercer exón, de lugar a la formación de una proteína truncada que posiblemente sea

degradada. Por su parte, todas las proteínas OXPHOS analizadas experimentan un descenso en sus niveles, siendo un indicativo de que la fosforilación oxidativa se encuentra alterada.

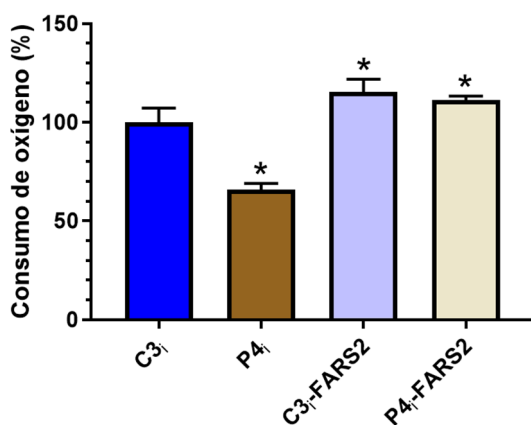


**Figura S16.** Niveles de las proteínas NDFUB8, NDUFA9, ND6, UQCR2, COI y COII en C3<sub>i</sub> y P4<sub>i</sub> por *Western blot*. En el *blot 1* se utilizó un gel separador del 10 % y en el *blot 2* del 12,5 %. En ambos ensayos los anticuerpos se añadieron de manera secuencial y se empleó la SDHA como control de carga.

En quinto lugar, se llevó a cabo un ensayo de complementación para sobreexpresar *FARS2* en los fibroblastos C3<sub>i</sub> y P4<sub>i</sub> y comprobar su efecto sobre el fenotipo bioquímico. Para ello, primero se verificó la sobreexpresión por *Western blot* (Figura S17) y, posteriormente, se valoró la capacidad de consumo de oxígeno en los modelos C3<sub>i</sub>, P4<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-*FARS2* y P4<sub>i</sub>-*FARS2*, siendo estos dos últimos los fibroblastos que sobreexpresan *FARS2*. Como resultado se obtuvo que dicha capacidad se encuentra comprometida en los fibroblastos del paciente, pero que se recupera al sobreexpresar *FARS2* (Figura S18), lo que, junto a los resultados anteriores, lleva a concluir que el paciente experimenta una alteración de la fosforilación oxidativa a causa de la variante c.1256G>A y la delección del exón 3 de *FARS2*.



**Figura S17.** Niveles de *FARS2* en C3<sub>i</sub>, P4<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-*FARS2* y P4<sub>i</sub>-*FARS2* por *Western blot*. Se utilizó un gel separador del 10 %, los anticuerpos se añadieron secuencialmente y se usó la tubulina como control carga.

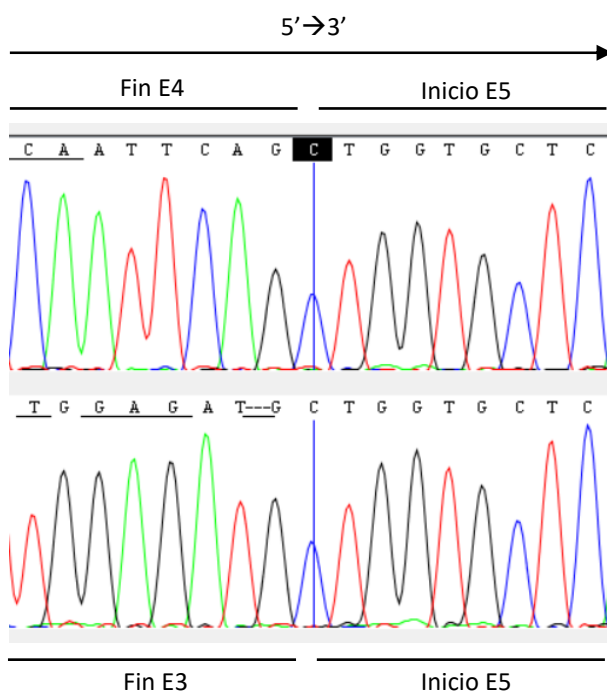


**Figura S18.** Capacidad de consumo de oxígeno ( $[(\text{fmolO}_2/\text{ml})/\text{min}]/\text{célula}$ ) en C3<sub>i</sub>, P4<sub>i</sub>, C3<sub>i</sub>-*FARS2* y P4<sub>i</sub>-*FARS2*. Se evaluó con las pendientes obtenidas en un oxígrafo en situación basal y al añadir el inhibidor KCN ( $n = 3$ ). Aparece representada la media de los valores obtenidos y su desviación estándar en porcentaje (%) con respecto a C3<sub>i</sub>. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, siendo significativo (\*) los casos en que si  $p\text{-valor} < 0,05$  (comparando con C3<sub>i</sub>).

Finalmente, cabe destacar que, al investigar la presencia de las variantes en los fibroblastos del paciente recibidos, se detectó un producto de PCR procedente del alelo paterno no presente en el control. Este producto fue clonado y secuenciado, obteniéndose que carece del E4 (Figura S19) y que surge a partir de un *splicing* alternativo que da como resultado un mRNA que codifica para la isoforma 2 de *FARS2* (la pérdida del E4 no provoca ningún cambio en el ORF por lo que esta segunda isoforma posee la misma secuencia proteica que la isoforma 1 o

canónica, pero sin el E4). Realizando pruebas posteriores, se intentó encontrar dicho transcrito en el control, pero no se tuvo éxito: en 27 colonias bacterianas positivas para *FARS2* y procedentes del control no se encontró esta especie con ausencia del exón 4 en ninguna, mientras que en 16 colonias positivas del paciente se detectó en 3. En otras palabras, en el control un 0 % de las secuencias tenían el exón 4 y en el paciente un 19 %. Esto nos lleva a sospechar que tal vez en el paciente exista un aumento de la expresión de la isoforma 2 para tratar de paliar el déficit de la proteína, lo que se ve afianzado por el hecho de que el E4 participa en la coordinación del F-AMP (Figura S20) y, por tanto, la ausencia del mismo sugiere que la isoforma 2 de *FARS2* lleve a cabo una función distinta a la de la isoforma canónica.

**A**



**Figura S19.** Electroferograma y esquema con la isoforma 2 de *FARS2*. **(A)** Alineamiento de secuencias entre el control C3<sub>i</sub> y el paciente P4<sub>i</sub>, obtenidas partiendo de RNA total. En el paciente (alelo paterno) se pierde el cuarto exón (E4). **(B)** Esquema a escala 1:1 en que se representan las secuencias obtenidas en **(A)**. La variante c.1256G>A aparece representada como una M en rojo.

**B**

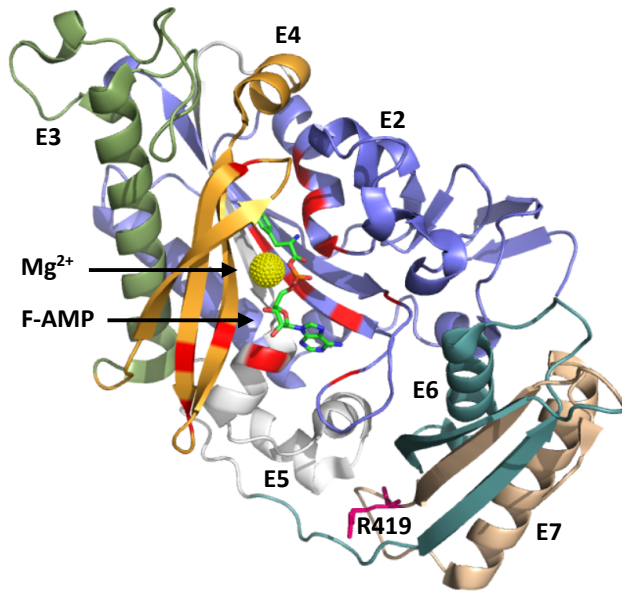
Alelo sano



Alelo paterno (isoforma 2)







**Figura S20.** Estructura cristalizada de la fenilalanil-tRNA sintetasa mitocondrial humana (PDB 3CMQ). Los exones de la CDS de *FARS2* se muestran en distintos colores: E2 en azul, E3 en verde, E4 en naranja, E5 en blanco, E6 en azul verdoso y E7 en marrón claro. Ligandos: el magnesio ( $Mg^{2+}$ ) se representa con una bola amarilla y el fenilalanil-adenilato (fenilalanina activada; F-AMP) en *sticks* y con cada átomo de un color diferente. Los 13 residuos que coordinan el F-AMP se muestran en rojo y pertenecen a los exones E2, E4 y E5 (Klipcan et al., 2008). Residuo R419 en rosa y *sticks*. Figura elaborada con PyMOL (v1.3r1).



