



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIOS GENÉTICOS, FISIOPATOLÓGICOS Y CON
OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO EN ENFERMEDADES
NEUROMETABÓLICAS**

Tesis Doctoral
Lorena Gallego Villar
Mayo, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



ESTUDIOS GENÉTICOS, FISIOPATOLÓGICOS Y CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO EN ENFERMEDADES NEUROMETABÓLICAS

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica **Lorena Gallego Villar** para optar al grado de Doctor en Biología Molecular en la modalidad de doctorado internacional bajo la supervisión de:

Directoras de Tesis:

Dra. Lourdes Ruiz Desviat

Dra. Eva Richard Rodríguez

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Parte de este trabajo se realizó en Kinderspital, Zürich, en el departamento “Divisions of Clinical Chemistry and Biochemistry” bajo la supervisión del Prof. Beat Thöny y la Dra. Hiu Man Viecelli. Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda de posgrado para la Formación de Personal Investigador (BES-2011-045011) y a una ayuda para estancias breves (EEBB-I-2012-04671).

Índice



LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	10
ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS	12
SUMMARY	17
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN.....	21
1 Enfermedades Metabólicas Hereditarias	23
1.1 Aspectos generales.....	23
2 Acidemia Propiónica.....	24
2.1 Historia y Epidemiología.....	24
2.2 Bioquímica y biología molecular.....	24
2.3 Diagnóstico	26
2.4 Presentación clínica y fisiopatología.....	27
2.5 Modelos animales	28
2.6 Tratamiento y terapias.....	29
3 Hiperfenilalaninemias	31
3.1 Historia y Epidemiología.....	31
3.2 Bioquímica y biología molecular.....	32
3.3 Diagnóstico y clasificación de hiperfenilalaninemias.....	33
3.4 Presentación clínica y fisiopatología.....	34
3.5 Modelos animales	34
3.6 Tratamiento y terapias.....	35
4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	37
4.1 Mitocondria y metabolismo energético	37
4.2 Estrés oxidativo y defensas antioxidantes	38
4.3 Disfunción mitocondrial en acidemia propiónica	41
5 Splicing y terapia antisentido	42
5.1 Alteraciones en el mecanismo de <i>splicing</i>	42
5.2 Modulación del <i>splicing</i> mediante el uso de oligonucleótidos antisentido.....	43
OBJETIVOS	49
OBJECTIVES	51
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1 Materiales	55
1.1 Muestras de fibroblastos de pacientes.....	55
1.2 Ratones.....	55
1.3 Líneas celulares	56
1.4 Cepas bacterianas.....	57
1.5 Vectores.....	57
1.6 Reactivos y otros materiales.....	57
1.7 Anticuerpos y sondas fluorescentes	60
1.8 Oligonucleótidos.....	62
1.9 Soporte informático y análisis <i>in silico</i>	64

2	Métodos	65
2.1	Técnicas de ácidos nucleicos	65
2.1.1	Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos	65
2.1.2	Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	65
2.1.3	Amplificación de gDNA y de cDNA	66
2.1.4	Purificación de productos de PCR y secuenciación	66
2.1.5	Genotipado de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) y <i>Pah</i> ^{enu2/+}	66
2.1.6	Determinación del número de copias de DNA mitocondrial en muestras de tejido de ratón	67
2.1.7	Mutagénesis dirigida	68
2.1.8	Minigenes	68
2.2	Técnicas de proteínas	69
2.2.1	Preparación de homogenados para inmunodetección	69
2.2.2	Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE.	69
2.2.3	Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas.	70
2.2.4	Detección de proteínas carboniladas en muestras de tejido de ratón	70
2.2.5	Microarray de proteínas de fase reversa (RPPma)	71
2.3	Determinación de metabolitos.....	71
2.3.1	Determinación de los niveles de L-Phe en sangre de ratón	71
2.3.2	Determinación de TBARs en muestras de tejido de ratón	72
2.4	Ensayos enzimáticos.....	72
2.4.3	Actividad propionil-CoA carboxilasa	72
2.4.4	Actividad fenilalanina hidroxilasa	73
2.4.5	Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial	74
2.5	Cultivos celulares.....	74
2.5.1	Mantenimiento de los cultivos	74
2.5.2	Transfección	74
2.5.3	Detección de apoptosis temprana por citometría de flujo	76
2.5.4	Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular por citometría de flujo	76
2.5.5	Marcaje de la red mitocondrial	77
2.6	Técnicas histológicas, microscopía óptica y confocal.....	77
2.6.1	Preparación de muestras de tejido de ratón para histología	77
2.6.2	Detección de especies superóxido en tejidos de ratón con DHE	78
2.6.3	Detección de apoptosis tardía en tejidos de ratón mediante TUNEL	79
2.7	Técnicas con ratones.....	79
2.7.1	Generación de ratones diabéticos con estreptozotocina	79
2.7.2	Tratamiento <i>in vivo</i> con Vivomorpholinos (VMO).	79
2.7.3	Tests de comportamiento.	80
2.8	Análisis estadístico.....	80
	SUMMARY: RESULTS PART1	83
1	Caracterización funcional de nuevos genotipos, estudios de estrés oxidativo y terapia <i>in vitro</i> con antioxidantes en acidemia propiónica	85
1.1	Análisis de microsatélites para confirmar una disomía uniparental en un paciente con AP ...	87
1.2	Análisis de mutaciones <i>missense</i> en los genes <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i>	87
1.3	Análisis del efecto sobre el proceso de <i>splicing</i> de la mutación c.763 G>A en el gen <i>PCCB</i> ...	90
1.4	Análisis de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS)	91
1.5	Análisis de la morfología mitocondrial	93

1.6	Análisis de los niveles de la proteína superóxido dismutasa (SOD2)	93
1.7	Análisis de los niveles de apoptosis	94
1.8	Análisis de los niveles de proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) p38 MAPK y JNK	95
1.9	Análisis del efecto de antioxidantes	95
SUMMARY: RESULTS PART 2		99
2	Estudios de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	101
2.1	Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético	101
2.2	Análisis de la actividad de los complejos de la CTE	103
2.3	Análisis del número de copias de DNA mitocondrial	104
2.4	Análisis histológico de la presencia de radicales superóxido en corazón y cerebro de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	104
2.5	Análisis del daño oxidativo en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	105
SUMMARY: RESULTS PART 3		107
3	Estudios de comportamiento en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	109
3.1	Análisis de la capacidad locomotora y exploratoria	109
3.2	Análisis de la coordinación motora	110
SUMMARY: RESULTS PART 4		113
4	Desarrollo de un sistema <i>in vivo</i> para probar la eficiencia de la modulación del <i>splicing</i> mediante oligonucleótidos antisentido	115
4.1	Estudios <i>in vitro</i> en células Hep3B	115
4.2	Ensayos <i>in vivo</i> en ratones <i>wildtype</i>	117
4.3	Ensayos <i>in vivo</i> en ratones <i>Pah</i> ^{enu2/+}	118
DISCUSIÓN		123
1	Caracterización funcional de nuevos genotipos en acidemia propiónica	125
2	Estudios <i>in vitro</i> : estrés oxidativo y tratamiento con antioxidantes en acidemia propiónica	127
3	Estudios <i>in vivo</i> : caracterización del modelo murino hipomorfo de acidemia propiónica	130
4	Desarrollo de un sistema <i>in vivo</i> para probar la eficiencia de la modulación de <i>splicing</i> mediante oligonucleótidos antisentido	135
CONCLUSIONES		141
CONCLUSIONS		143
BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES		145
PUBLICACIONES		177

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Fig.1	Estructura de la holoenzima propionil Co-A carboxilasa (PCC)	25
Fig.2	Integración del ácido propiónico en las distintas vías metabólicas	26
Fig.3	Esquema del ciclo catalítico de la fenilalanina hidroxilasa (PAH)	32
Fig.4	Estructura de la fenilalanina hidroxilasa (PAH)	33
Fig.5	Papel de la mitocondria en el metabolismo de ROS	40
Fig.6	Esquema del vector pSPL3.....	68
Fig.7	Pedigrí del caso P1.....	87
Fig.8	Localización de mutaciones <i>missense</i> causantes de enfermedad identificadas en <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i>	88
Fig.9	Análisis funcional mediante minigenes del cambio c.763 G>A en el gen <i>PCCB</i>	90
Fig.10	Análisis de los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes con AP.....	91
Fig.11	Análisis de los niveles intracelulares de ROS tras la expresión transitoria de la proteína PCC <i>wildtype</i> en fibroblastos de pacientes con AP	92
Fig.12	Análisis de la morfología mitocondrial de fibroblastos de pacientes con AP.....	93
Fig.13	Análisis de los niveles de superóxido dismutasa (SOD2) en fibroblastos de pacientes con AP.....	94
Fig.14	Análisis de los niveles de apoptosis en fibroblastos de pacientes con AP.....	94
Fig.15	Análisis de los niveles de proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) p38 MAPK y JNK en fibroblastos de pacientes con AP.....	95
Fig.16	Análisis del efecto de antioxidantes en los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes con AP.....	96
Fig.17	Análisis del efecto de resveratrol en los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes P1-P5	97
Fig.18	Análisis de los niveles de superóxido dismutasa (SOD2) y glutatión peroxidasa (GPx1) en fibroblastos control y pacientes con AP (P1, P2, P3 y P5)	98
Fig.19	Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) y ratones <i>wildtype</i> de 4-5 meses de edad mediante un array de proteínas de fase reversa (RPPma).....	102
Fig.20	Análisis de la actividad de los complejos de la CTE en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) de 4-5 meses de edad.....	103
Fig.21	Análisis del número de copias de DNA mitocondrial en corazón y músculo de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) de 4-5 meses de edad.....	104
Fig.22	Análisis de los niveles intracelulares de aniones superóxido (O ₂ ⁻) en muestras de corazón y cerebro de ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) de 3 meses de edad	105
Fig.23	Análisis del daño oxidativo en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) de 3-5 meses de edad	106
Fig.24	Análisis del test de comportamiento de campo abierto en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) y <i>wildtype</i> de 6-24 semanas de edad	110
Fig.25	Análisis de la coordinación motora en ratones <i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) y <i>wildtype</i> de 6-32 semanas de edad mediante un rota-rod	111
Fig.26	Oligonucleótidos antisentido (AONs) usados en este trabajo	115
Fig.27	Tratamiento antisentido para suprimir la expresión de la proteína PAH humana en células Hep3B.....	116

Fig.28	Tratamiento con VMO-Ex11 en ratones <i>wildtype</i>	117
Fig.29	Tratamiento con VMO-Ex11 en ratones <i>Pah^{enu2/+}</i>	118
Fig.30	Análisis por secuenciación de los transcritos obtenidos tras el tratamiento con VMO-Ex11.....	119
Fig.31	Duración del efecto del tratamiento con VMO-Ex11 en ratones <i>Pah^{enu2/+}</i>	120
Fig.32	Niveles de L-Phe en sangre en ratones <i>Pah^{enu2/+}</i> tras el tratamiento continuado con VMO-Ex11.....	120
Fig.33	Análisis del efecto de VMOs dirigidos contra el exon 11 o el exon 12.....	121
Fig.34	Análisis de muestras de riñón de ratones <i>Pah^{enu2/+}</i> tratados con VMO-Ex11 o VMO-Ex12.....	122
Fig.35	Esquema de las alteraciones encontradas en los distintos órganos de los ratones <i>Pcca^{-/-}</i> (A138T)	130

TABLAS

Tabla 1	Clasificación de hiperfenilalaninemias (HPAs) según niveles de L-Phe en sangre	34
Tabla 2	Líneas de fibroblastos control	56
Tabla 3	Cepas bacterianas	57
Tabla 4	Vectores	57
Tabla 5	Reactivos y otros materiales	57
Tabla 6	Tampones y soluciones	59
Tabla 7	Anticuerpos y sondas	60
Tabla 8	Oligonucleótidos	62
Tabla 9	Bases de datos y programas útiles	64
Tabla 10	Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos	65
Tabla 11	Pacientes <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i>	86
Tabla 12	Análisis <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> del efecto funcional de mutaciones <i>missense</i> en los genes <i>PCCA</i> y <i>PCCB</i>	89
Tabla S1	Genes implicados en hiperfenilalaninemias (HPAs) y acidemia propiónica (AP)	171
Tabla S2	Presentación clínica y sintomatológica en pacientes con acidemia propiónica (AP)	171
Tabla S3	Deficiencia en complejos OXPHOS asociado a cardiomiopatías en pacientes con acidemia propiónica (AP)	171
Tabla S4	Sintomas neurológicos más frecuentes en pacientes con acidemia propiónica (AP)	171
Tabla S5	Sintomatología clínica de pacientes con fenilcetonuria (PKU).....	172
Tabla S6	Principales características de los modelos animales de hiperfenilalaninemias (HPAs).....	172
Tabla S7	Principales especies reactivas de oxígeno (ROS)	172

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

12

2-O-Me	2-O-metil-fosforotioato
2-MOE	2-O-metoxietil
AAV	Virus adeno asociado / <i>Adeno-Associated Virus</i>
ACN	Acetonitrilo
Ad	Adenovirus
AF	Ácido fórmico
AMM	Acidemia metilmalónica
ANOVA	Análisis de la varianza
AONs	Oligonucleótidos antisentido / <i>Antisense oligonucleotides</i>
AP	Acidemia propiónica
APS	Peroxodisulfato de amonio
AST	<i>Analyze Splice Tool</i>
BC	Biotina carboxilasa
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada / <i>Branched Chain Amino Acids</i>
BCCP	Dominio de biotinización
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHT	Butilhidroxitolueno
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
C-terminal	Carboxilo-terminal
C2	Acetilcarnitinas
C3	Propionilcarnitinas
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
CAT	Catalasa
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
cDNA	ADN complementario / <i>complementary DNA</i>
CEDEM	Centro de diagnóstico de enfermedades metabólicas
CEEA	Comité Ético de Experimentación Animal
CoQ10	Coenzima Q10
COX	Citocromo oxidasa
Cpm	Cuentas por minuto
CS	Citrato sintasa
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DCF	Di-Cloro-Fluoresceína
DHE	Dihidroetidio
DHPR	6,7-dihidropteridina reductasa
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazona
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato / <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DTT	1,4-ditio-L-treitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilen-diamino tetra-acético
EtFU	Intensidad de fluorescencia relativa

EMH	Enfermedades metabólicas hereditarias
ENU	N-etil-N-nitrosurea
ESI-MS/MS	Espectrometría de Masas de Ionización por Electro spray
FADH2	Flavín adenín dinucleótido / <i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FBS	Suero bovino Fetal / <i>Fetal bovine serum</i>
FOXO	<i>Forkhead box</i>
FVB	<i>Friend Leukemia Virus, strain B</i>
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC-MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
H2DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
HPA	Hiperfenilalaninemia / <i>Hyperphenylalaninemia</i>
HRP	Peroxidasa de rábano
HSF	<i>Human splicing finder</i>
Hsp60	<i>Heat shock protein 60</i>
HTV	Inyección hidrodinámica en la vena de la cola / <i>Hydrodynamic Tail Vein</i>
i.p.	Inyección intraperitoneal
i.v.	Inyección intravenosa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IF	Inmunofluorescencia
IF1	Inhibidor 1 H ⁺ -ATPasa
Ile	Isoleucina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
LB	<i>Luria-Bertani liquid medium</i>
LC	Cromatografía líquida
LDHA	Lactato deshidrogenasa (subunidad A)
LNA	Ácido nucleico cerrado / <i>Locked nucleic acid</i>
LNNA	<i>Large neutral amino acids</i>
MAP3Ks	<i>MAP kinase kinase kinase</i>
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MC	Minicirculos / <i>Minicircle</i>
MDA	Malondialdehído
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
Met	Metionina
MetCit	Metilcitrato
MKP	Fosfatasa quinasa activada por mitógenos
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MPS	Mucopolisacaridosis
mRNA	ARN mensajero / <i>messenger RNA</i>
MS-MS	Espectrometría de masas
MSUD	Jarabe de Arce / <i>Maple Syrup Urine Disease</i>
mt DNA	DNA mitocondrial
n DNA	DNA nuclear
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido / <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NAGs	N-Acetilglutamato sintasa
NDUFS3	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3</i>

NFκ-B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	<i>NADPH oxidase</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
NTPs	Nucleótidos trifosfato
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
OFT	Test de campo abierto / <i>Open Field Test</i>
OLCFAs	Ácidos grasos de cadena larga impar / <i>Odd large chain fatty acids</i>
Oligo dT	Oligo de deoxitimidinas
ONOO⁻	Peroxinitrito
OTC	Ornitina transcarbamilasa
OXPHOS	Fosforilación oxidativa / <i>Oxidative phosphorylation</i>
PAH	Fenilalanina hidroxilasa / <i>Phenylalanine hydroxylase</i>
PAL	Fenilalanina amonio liasa / <i>Phenylalanine ammonia lyase</i>
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino / <i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	Ácido perclórico / <i>Perchloric acid</i>
PCC	Propionil-CoA carboxilasa / <i>Propionyl-CoA carboxylase</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein data base</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PEG	Polietilenglicol
PFK	Fosfofructoquinasa
Phe	Fenilalanina
PI	Ioduro de propidio / <i>Propidium Iodide</i>
PKKM2	Isoenzima piruvato quinasa de músculo 2 / <i>Pyruvate kinase muscle isozyme 2</i>
PKU	Fenilcetonuria
PMO	Oligo morfolino fosforodiamidato
PPP	<i>Pentose phosphate pathway</i>
PTC	Codón de parada prematura de la traducción
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados / <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico / <i>Ribonucleic acid</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno / <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno / <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
RPPma	Microarray de proteínas de fase reversa
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAP	<i>Serum amyloid P component (promoter)</i>
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
scAAV	<i>Self-complementary adeno-associated virus</i>
SD	Desviación estándar / <i>Standard deviation</i>
SDHB	Succinato Deshidrogenasa (subunidad B)
SDS	Dodecil sulfato sódico / <i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	Electroforésis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMA	Atrofia muscular espinal / <i>Spinal Muscular Atrophy</i>
SMN	<i>Survival motor neuron</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SOD	Superóxido dismutasa
SSO	<i>Splice-switching oligonucleotides</i>
STR	Microsatélites / <i>Short tandem repeat</i>
STZ	Estreptozotocina / <i>Streptozotocin</i>
SUCL	<i>Succinate-CoA ligase</i>
TBARs	Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tc DNA	Triciclo DNA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TCA	Tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFP	Proteína trifuncional mitocondrial / <i>Mitochondrial trifunctional protein</i>
Thr	Treonina
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TPP	Trifenilfosfonio
Trx	Tiorredoxina
TrxP	Tiorredoxina reductasa
TSAP	<i>Thermostable alkaline phosphatase</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Tyr	Tirosina
UDP	Disomía uniparental
Val	Valina
VMO	Vivo-morfolino / <i>Vivo-morpholino</i>
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wildtype</i>



SUMMARY

In this work, we have characterized the molecular basis of the defect in fibroblasts samples from 10 patients diagnosed with propionic acidemia (PA), one of the most common organic acidemias. In addition, we have investigated oxidative stress and cellular damage in PA patients' fibroblasts. Furthermore, using the hypomorph mouse model of PA we have characterized the mitochondrial dysfunction and oxidative damage and studied the behavior and motor coordination. Finally, we have tested *in vivo* the efficiency of splice-modulation using antisense oligonucleotides (AONs), which are a promising therapy for specific splicing defects.

To provide molecular insight into the pathogenicity of PA variants we have analyzed the structural and functional effects of five point mutations in *PCCA* and *PCCB* genes, by using homology modeling with the recently solved crystal structure of the PCC holoenzyme and an eukaryotic expression system. The results confirmed the pathogenic nature of these mutations, showing a more severe effect in those ones located near the active site in the α subunit compared to mutations located between β subunits that showed higher residual PCC activity. We have performed *in silico* and functional analysis using minigenes to analyze a point mutation in the last nucleotide of the exon 7 of the *PCCB* gene, revealing it is a partial splicing defect and underscoring the need of carefully evaluating every nucleotide change for a possible splicing defect.

Moreover, we have investigated oxidative stress analyzing intracellular ROS levels, antioxidant enzymes' levels and apoptosis parameters in PA patients-derived fibroblasts. Our results indicate that oxidative stress may be an important contributing factor to the cellular damage. Additionally, we have shown that different antioxidants successfully scavenge ROS production in these patients' cells. These results establish the proof of concept of the potential of antioxidants as an adjuvant therapy for PA.

To gain further insights into the physiopathology of PA, we have used the mouse model of PA to study the expression of several proteins involved in mitochondrial function by Reverse Phase Protein Microarrays (RPPMa), OXPHOS activities, mtDNA copy number and oxidative damage. The results showed impairment of oxidative phosphorylation, increased ROS production, lipid peroxidation and mtDNA depletion in relevant tissues. To characterize behavioral and locomotive defects, we have carried out open-field test and rota-rod performance. The results indicate age-dependent alterations in locomotion, coordination and endurance. These data support the hypothesis that mitochondrial dysfunction may contribute to the physiopathology of PA.

Finally, in the heterozygous PKU mouse model and in wildtype mice we have tested AONs using different dosing, mode of injection and treatment regimes. The results showed that consecutive intravenous injections of optimal doses result in transient hyperphenylalaninemia correlating with complete exon skipping and absence of PAH protein and enzyme activity. These results provide a sensitive *in vivo* assay to test the ability of AONs to modulate splicing, as well as a possible method to generate murine models for genetic liver diseases.



RESUMEN

En este trabajo, se han caracterizado algunas mutaciones identificadas en fibroblastos de 10 pacientes diagnosticados con acidemia propiónica (AP), una de las acidemias orgánicas más comunes. Además, se ha investigado el estrés oxidativo y el daño celular en los fibroblastos de estos pacientes. Asimismo, utilizando el modelo hipomorfo murino de AP se ha caracterizado el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial y estudiado el comportamiento y la coordinación motora. Por último, se ha probado la eficiencia *in vivo* de la modulación de *splicing* mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AONs), que constituyen una terapia prometedora para los defectos específicos de *splicing*.

19

Para proporcionar un mejor entendimiento molecular de la patogenicidad de variantes en AP se ha analizado el efecto estructural y funcional de cinco mutaciones puntuales en los genes *PCCA* y *PCCB*, mediante el modelado por homología de la estructura cristalina recientemente resuelta de la holoenzima PCC y un sistema de expresión eucariota. Los resultados confirmaron la naturaleza patogénica de estas mutaciones, que muestran un efecto más severo en aquellas variantes situadas cerca del centro activo en la subunidad α en comparación con mutaciones localizadas entre las subunidades β que mostraron una mayor actividad PCC residual. Se ha llevado a cabo el análisis *in silico* y funcional empleando minigenes para analizar una mutación puntual en el último nucleótido del exon 7 del gen *PCCB*, mostrando un defecto de *splicing* parcial que subraya la necesidad de evaluar cuidadosamente todos los cambios nucleotídicos como posibles defectos de *splicing*.

Por otra parte, se ha investigado el estrés oxidativo analizando los niveles intracelulares de ROS y de enzimas antioxidantes y parámetros relacionados con la apoptosis en los fibroblastos de pacientes con AP. Nuestros resultados indican que el estrés oxidativo puede ser un importante factor que contribuye al daño celular. Además, se ha demostrado con éxito que diferentes antioxidantes neutralizan la producción de ROS en las células de estos pacientes. Estos resultados establecen la prueba de concepto del posible uso de antioxidantes como una terapia adyuvante en AP.

Para obtener un mayor conocimiento en la fisiopatología de la AP, se ha utilizado el modelo de ratón de AP para estudiar la expresión de varias proteínas implicadas en la función mitocondrial mediante microarrays de proteínas de fase reversa, midiendo las actividades OXPHOS, el número de copias de DNA mitocondrial y el daño oxidativo. Los resultados mostraron una alteración en la fosforilación oxidativa, un aumento de la producción de ROS y de lipoperoxidación y una depleción de DNA mitocondrial en tejidos relevantes. Para caracterizar defectos locomotores y de comportamiento, se han llevado a cabo pruebas de campo abierto y pruebas de *rota-rod*. Los resultados sugieren alteraciones dependientes de la edad en la locomoción, la coordinación y la resistencia. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que la disfunción mitocondrial puede contribuir a la fisiopatología de la AP.

Finalmente, se han contrastado diferentes dosis, modos de inyección y pautas de administración de oligonucleótidos antisentido en el modelo de ratón PKU heterocigoto y en ratones *wildtype*. El estudio mostró que inyecciones intravenosas consecutivas de dosis óptimas resultan en una hiperfenilalaninemia transitoria que se correlaciona con un completo *exon skipping* y con la ausencia de proteína y actividad enzimática PAH. Estos resultados proporcionan un ensayo eficaz *in vivo* para probar la capacidad de los AONs para modular el *splicing*, así como un posible método para generar modelos murinos para enfermedades genéticas hepáticas.



Introducción



1 Enfermedades Metabólicas Hereditarias

1.1 Aspectos generales

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMH) se definen como alteraciones bioquímicas de origen genético que están causadas por un defecto en la estructura y función de una proteína implicada en una de las muchas reacciones químicas del metabolismo celular. En más de la mitad de las EMH descritas el producto génico alterado es una enzima, y su defecto provoca el bloqueo de una ruta metabólica, lo cual puede resultar en: 1) la acumulación de metabolitos previos al bloqueo, 2) la aparición de nuevos intermediarios tóxicos generados de la derivación del producto acumulado a rutas metabólicas alternativas y 3) en un déficit o ausencia de la formación del producto final o incluso en un compendio de todos ellos.

En la actualidad se han descrito más de 700 EMH (Pampols, 2010) que individualmente son consideradas como enfermedades raras. Según EURORDIS (European Organization of Rare Diseases) sólo se consideran enfermedades raras aquellas que afectan a menos de una de cada 2.000 personas en Europa. Aunque no existen grandes estudios epidemiológicos de este grupo de enfermedades, se estima que la incidencia acumulada es de 1 de cada 800 recién nacidos vivos. La esperanza de vida de las EMH está reducida en 2 de cada 3 de ellas, un 30 % de los pacientes fallecen antes de los 10 años y un 20% entre los 10 y los 30. El 70% de los fenotipos implican más de un sistema anatómico y funcional, siendo el sistema nervioso el más frecuentemente afectado (43%) (Pampols, 2010).

La mayoría de las EMH son monogénicas, el 67% se heredan de manera autosómica recesiva, el 21% de manera dominante, el 6% presenta una herencia ligada al cromosoma X y el otro 6% están relacionadas con alteraciones en el genoma mitocondrial (Pampols, 2010).

La gran diversidad y baja frecuencia individual de las EMH, hace que el diagnóstico, el tratamiento y el análisis bioquímico molecular sean complejos. El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva está incrementando la capacidad de diagnóstico, sin embargo debido a la heterogeneidad de los mecanismos patológicos implicados y a la ausencia de un conocimiento específico de la fisiopatología de cada enfermedad se estima que sólo alrededor del 12% de las EMH son tratadas con éxito, un 45% obtienen beneficios parciales del tratamiento y un 34% no presentan respuesta al tratamiento. El diagnóstico de las EMH depende de su reconocimiento por los clínicos y del acceso coordinado a los laboratorios de genética y bioquímica. En una pequeña parte de las EMH (< 5%), la detección se basa en programas de cribado poblacional en individuos asintomáticos, durante el periodo neonatal. En este trabajo nos centraremos en una de las acidurias orgánicas más frecuentes, la Acidemia Propiónica (AP) y en el defecto en el catabolismo de aminoácidos más común, la Fenilcetonuria (PKU), ambas enfermedades forman parte del programa de cribado neonatal de la Comunidad de Madrid.

2 Acidemia Propiónica

2.1 Historia y Epidemiología

24

La acidemia propiónica (AP, OMIM# 606054) es un error innato del metabolismo que fue descrito por primera vez en la literatura en 1961 por Childs y colaboradores como una hiperglicinemia cetósica idiopática en un paciente con elevadas concentraciones de glicina y cuerpos cetónicos en sangre (Childs et al., 1961). En 1968 tras la descripción de un paciente con acidosis metabólica severa y altos niveles de ácido propiónico se especuló sobre una posible alteración metabólica en el paso de propionil-CoA a metilmalonil-CoA (Hommes et al., 1968). Ésta fue demostrada un par de años más tarde tras la detección de un déficit de carboxilación de ácido propiónico en leucocitos (Hsia et al., 1969), y una deficiencia de actividad propionil-CoA carboxilasa en hepatocitos (Gompertz et al., 1970) y en fibroblastos de piel de pacientes afectados (Hsia et al., 1971).

La AP es una de las acidemias orgánicas del catabolismo de aminoácidos ramificados más frecuente en humanos. La incidencia a nivel mundial es de 1 de cada 50.000 a 1 de cada 100.000 recién nacidos vivos, existiendo áreas endogámicas de mayor incidencia como en Arabia Saudí donde afecta entre 1 de cada 2.000 o 5.000, en los esquimales de Groenlandia que afecta a 1 de cada 1.000 y en las poblaciones de Amish en Estados Unidos, donde afecta a 1 de cada 3.000 (Pagon et al., 2012).

2.2 Bioquímica y biología molecular

La AP tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y está causada por mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB* que codifican para las subunidades α y β , respectivamente, de la enzima Propionil-CoA Carboxilasa (PCC; E.C. 6.4.1.3) (**Tabla S1**).

PCC es una enzima mitocondrial dependiente de biotina que cataboliza el primer paso de la vía de oxidación del propionato, la carboxilación de propionil-CoA en D-metilmalonil-CoA. La carboxilación se realiza en dos etapas: en la primera de ellas dependiente de ATP y Mg^{2+} , el bicarbonato (como fuente del grupo carboxilo) se une al nitrógeno N1 de la biotina formando un intermediario carboxi-biotina-enzima; en la segunda etapa, el complejo biotina interacciona con un carbono del propionil-CoA transfiriendo el grupo carboxilo del complejo biotina-bicarbonato a un segundo carbono del propionil-CoA, formando D-metilmalonil-CoA.

En el año 2010 se publicó la cristalización de la proteína quimérica PCC de *Ruegeria pomeroyi* (PDB_3N6R) con la cual la proteína humana (hPCC) comparte un 54% (subunidad α) y un 65% (subunidad β) de identidad de secuencia. hPCC es considerada también un dodecámero ($\alpha_6\beta_6$) constituido por el mismo número de subunidades α (72kDa) y β (56kDa), donde las subunidades α

se disponen en la estructura decorando la parte externa de un núcleo hexamérico de subunidades β que adoptan una forma de cilindro corto con un pequeño agujero a lo largo de su eje. Este núcleo hexamérico es considerado un trímero de dímeros β_2 (Huang *et al.*, 2010) (**Fig.1**).

La subunidad α contiene el dominio biotina carboxilasa (BC) y el dominio de biotilización

25

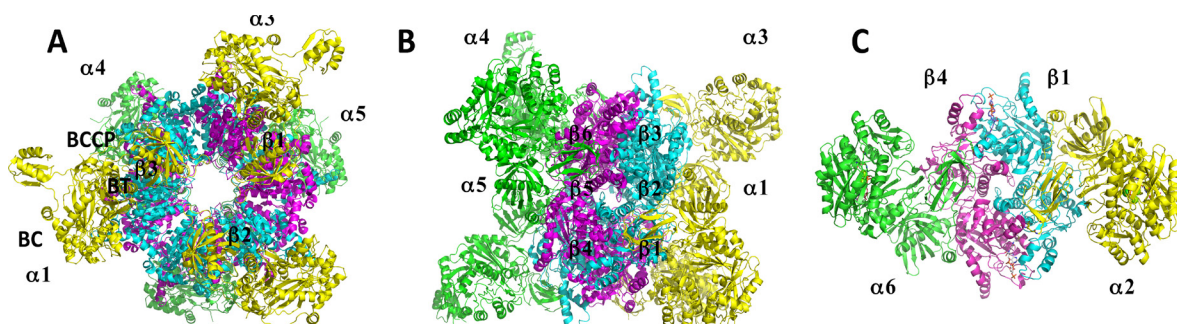


Fig.1 Estructura de la holoenzima propionil Co-A carboxilasa (PCC). Las subunidades α están representadas en color amarillo ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y verde ($\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$) y se disponen decorando la parte externa de un núcleo central hexamérico de subunidades β representadas de color azul ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) y rosa ($\beta 4$, $\beta 5$ y $\beta 6$). **A-B** Se muestran distintas vistas del dodecámero de la proteína quimérica bacteriana RpPCC α -RdPCC β . **C** Se muestra el hetero-tetramero de la holoenzima PCC humana modelado por el servicio de bioinformática del CBMSO a partir de la holoenzima de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso PDB 3n6r) (Huang *et al.*, 2010), la subunidad α análoga de *S. aureus* unida al ATP (PDB 2vpq) (Mochalkin *et al.*, 2008) y la biotina y el bicarbonato unidos al sitio activo del dominio biotina carboxilasa (BC) incorporados de la estructura de *E. coli* (PDB 3g8c) (Chou *et al.*, 2009). BCCP: dominio de biotilización, BC: biotina carboxilasa.

(BCCP) con el motivo conservado A-M-K-M (localizado en el exon 23) además del sitio de unión a ATP. Al igual que el resto de carboxilasas dependientes de biotina, la PCC se sintetiza en forma de apoenzima y es covalentemente biotinilada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS). El ácido propiónico proviene principalmente del catabolismo proteico de cuatro aminoácidos esenciales (valina, isoleucina, metionina y treonina) que constituyen el 50% del conjunto de propionil-CoA del cuerpo, del catabolismo de la cadena lateral del colesterol y de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena impar, que constituye un 25% del total del propionil-CoA, y el 25% restante procedente de la fermentación realizada por las bacterias de la flora intestinal (Bain *et al.*, 1988; Eaton *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1990b) (**Fig.2**).

La acumulación de propionil-CoA intracelular y sus derivados como consecuencia de la deficiencia en la actividad PCC altera el funcionamiento de proteínas implicadas en distintas vías como la glucolítica, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y el ciclo de la urea. El propionil-CoA provoca la inhibición del enzima N-acetilglutamato sintetasa (NAGs) (Coude *et al.*, 1979; Stewart y Walser, 1980) y del sistema de transporte mitocondrial de la glicina (Hayasaka *et al.*, 1982; Kolvraa, 1979), lo que explica la hiperamonemia y la hiperglicinemia que presentan estos pacientes. Debido a la acción de la enzima carnitina-N-acilasa, los pacientes también acumulan propionil-carnitina (C3) y sufren una deficiencia secundaria de carnitina en plasma (Ugarte *et al.*, 1980). El propionil-CoA inhibe el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Gregersen, 1981), el complejo III de la

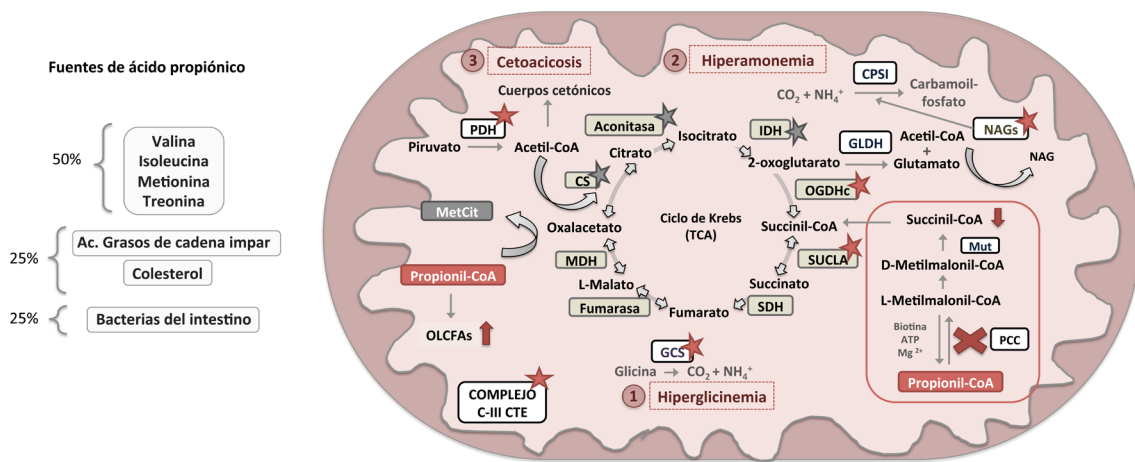


Fig.2 Integración del ácido propiónico en distintas vías metabólicas y su relación con la patología de AP. A la izquierda se muestran las distintas fuentes de ácido propiónico. Los complejos y enzimas que son inhibidos por metilcitrato se muestran con una estrella gris y los inhibidos por propionil Co-A con una estrella roja. El recuadro rojo en lado derecho resalta la vía del propionato. Los recuadros beis indican las enzimas implicadas en el TCA. Las flechas rojas hacia abajo indican disminución de los metabolitos y hacia arriba aumento o acumulación de metabolitos. GCS (complejo glicina sintasa), PDH (piruvato deshidrogenasa), OGDHc (complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa), SUCL (succinato Co-A ligasa), IDH (isocitrato deshidrogenasa), MDH (malato deshidrogenasa), GLDH (glutamato deshidrogenasa), NAGs (N-acetil glutamina sintasa), NAG (N-acetil glutamina), Mut (metilmalonil Co-A mutasa), complejo III de la CTE (cadena transportadora de electrones), MetCit (metilcitrato), PCC (propionil-CoA carboxilasa), OLCFA (ácidos grasos de cadena larga impar).

cadena transportadora de electrones (CTE) (Merinero *et al.*, 2011; Sauer *et al.*, 2008), el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDHc) y la succinil-CoA-ligasa (SUCL) (Brock y Buckel, 2004). Además el propionil-CoA se condensa con oxalacetato para formar metilcitrato (Ando *et al.*, 1972; Weidman y Drysdale, 1979), el cual es capaz de inhibir enzimas implicadas en la glucólisis y el TCA como la citrato sintasa (CS), la aconitasa, la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la fosfofructokinasa (PFK) (Cheema-Dhadli *et al.*, 1975). Por otra parte, el propionil-CoA puede actuar como sustrato en lugar del acetil-CoA en la síntesis de ácidos grasos, dando lugar a un aumento relativo de los ácidos grasos de cadena larga impar (OLCFA) (Lynen, 1961; Sperl *et al.*, 2000) (Fig.2).

2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la AP se basa en la detección y cuantificación en plasma y orina por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS) de ácido propiónico y sus metabolitos derivados (3-OH-propionato, metilcitrato y propionilglicina). Adicionalmente, la cuantificación de propionilcarnitina (C3) en sangre en recién nacidos por espectrometría de masas en tándem (MS-MS) permite la identificación pre-sintomática de pacientes con AP (Turgeon *et al.*, 2010). Sin embargo, para poder diferenciar la AP de otras acidemias orgánicas es necesario llevar a cabo una confirmación del diagnóstico mediante la determinación de la actividad PCC en linfocitos y/o fibroblastos de piel cultivados, y/o mediante el análisis de mutaciones en los genes *PCCA* o *PCCB*.

Además, en aquellos casos donde se conoce de antemano o existe alguna sospecha de que alguno de los padres es portador de mutaciones en estos genes también es posible realizar un diagnóstico prenatal mediante la cuantificación de metabolitos en líquido amniótico, la determinación de la actividad PCC y/o estudios moleculares en amniocitos o biopsia corial.

2.4 Presentación clínica y fisiopatología

La presentación clínica es heterogénea y puede manifestarse en diferentes órganos incluyendo el sistema cardiovascular, nervioso, gastrointestinal, renal e inmune. Aproximadamente 80% de los pacientes con AP manifiestan la enfermedad en las primeras semanas de vida (presentación neonatal) manifestando un fenotipo grave por intoxicación, con crisis metabólicas, principalmente cetoacidosis e hiperamonemia, mientras que aproximadamente el 20% debutan durante la infancia o la edad adulta (presentación tardía), donde los síntomas clínicos suelen ser más leves (Baumgartner *et al.*, 2007; Pena y Burton, 2012), aunque existen también casos de presentaciones tardías muy severas (Lucke *et al.*, 2004). Aunque todos los síntomas (**Tabla S2**) son dianas importantes para el tratamiento y la monitorización de los pacientes, se resalta la importancia de la patología cardíaca y neurológica, ya que estos dos órganos están asociados con un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

Cardiomiopatía. Una de las manifestaciones clínicas más frecuentes dentro de la patología cardíaca son las arritmias con una incidencia del 70% en pacientes con AP. Aunque las cardiomiopatías son más frecuentes en la presentación neonatal también ocurren en la presentación tardía ya que pueden empezar de repente y progresar rápidamente hasta la muerte del paciente (Bhan y Brody, 2001; Laemmle *et al.*, 2014; Mardach *et al.*, 2005). Aunque se han realizado varios estudios tratando de relacionar la patología cardíaca con distintos metabolitos alterados en pacientes con AP (Romano *et al.*, 2010), actualmente el desarrollo de la cardiomiopatía en estos pacientes no se ha asociado a ningún marcador metabólico, ni a factores de riesgo, ni a la edad de presentación de la enfermedad, ni a la severidad de la misma (Baruteau *et al.*, 2014; Romano *et al.*, 2010). Un estudio post mortem en un paciente que murió tras un fallo cardíaco reveló una hipertrofia cardíaca, una disminución en el tamaño de las fibras musculares y bajos niveles de carnitina en tejido, a pesar de que los valores en plasma fueron normales (Mardach *et al.*, 2005). El análisis bioquímico reveló una completa ausencia de actividad en el complejo I, NADH citocromo c reductasa. En la **Tabla S3** se muestra un resumen del análisis de la actividad de distintos complejos de la CTE analizados en múltiples tejidos de pacientes que presentaron graves síntomas cardíacos. También se ha descrito un defecto en CoQ10 en un pequeño número de pacientes que presentaron cardiomiopatía (Baruteau *et al.*, 2014).

Patología neurológica. La presentación de distintas complicaciones en el sistema nervioso es común en pacientes con AP (Schreiber *et al.*, 2012). Los síntomas neurológicos más frecuentes (**Tabla**

S4) reducen en gran manera la calidad de vida de los pacientes, lo que hace necesario profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de las alteraciones neurológicas observadas. Aunque algunos estudios han demostrado una correlación negativa entre el coeficiente intelectual y el número de crisis metabólicas sufridas por los pacientes (Grunert *et al.*, 2012) se siguen manifestando síntomas neurológicos como hipotonía y discapacidad intelectual en pacientes con un control metabólico óptimo (North *et al.*, 1995). La circulación de metabolitos tóxicos por el torrente sanguíneo puede explicar el daño ocasionado en distintos órganos de estos pacientes, sin embargo en el caso del cerebro la barrera hematoencefálica añade un nivel mayor de complejidad. Aunque los metabolitos acumulados en AP no son conocidos directamente por producir un daño neurotóxico en humanos, es probable que las altas concentraciones de ácido propiónico y metilcitrato presentes en pacientes con AP puedan alcanzar niveles dañinos para el cerebro como lo demuestra la administración directa de ácido propiónico en el cerebro de ratas, que causa defectos cognitivos que son revertidos tras el tratamiento con ácido ascórbico (Pettenuzzo *et al.*, 2002). Otro estudio donde se trataron cultivos celulares del modelo de cerebro de rata con distintas concentraciones crecientes de ácido metilmálico, ácido propiónico y metilcitrato mostró un incremento en la concentración de amonio y una disminución de glutamato, consistente con lo que se observa en pacientes (Scholl-Burgi *et al.*, 2010). Además altas concentraciones de metilcitrato mostraron un incremento de apoptosis vía caspasa 3 (Jafari *et al.*, 2013). Estas observaciones junto con los casos de pacientes con AP que presentan una disfunción neuronal en ausencia de crisis metabólicas o altos niveles de amonio en sangre, proporciona una evidencia de la existencia de una posible respuesta tejido específica a una producción local de ácido propionico en el cerebro.

2.5 Modelos animales

El primer modelo de ratón deficiente en PCC generado mediante la disrupción del gen murino *Pcca* (*Pcca*^{-/-}) mostró una presentación neonatal severa con niveles extremadamente altos de C3 muriendo entre las 24-48h después de nacer (Miyazaki *et al.*, 2001). Este fenotipo letal (*Pcca*^{-/-}) fue rescatado por transgénesis (*SAP*⁺*PCCA*^{-/-}) consiguiendo una suplementación hepática de la proteína PCC y demostrando que una actividad PCC del 10-20% en hígado es suficiente para prevenir la letalidad neonatal, disminuir la cetoacidosis, y conseguir sobrevivir hasta 3 semanas. La transgénesis en el modelo *Pcca*^{-/-} (*SAP*⁺*PCCA*^{-/-}) constituyó una prueba de concepto de la terapia génica dirigida al hígado, sin embargo la dificultad para llevar a cabo inyecciones sistémicas durante las primeras horas de vida y la falta de reproducción de la enfermedad en todas las células del cuerpo y no sólo en hígado, hizo necesaria la búsqueda de nuevos modelos alternativos. Recientemente se ha descrito la generación de un modelo transgénico hipomorfo *Pcca*^{-/-}(A138T) mediante la introducción de un cDNA de *PCCA* humano con la mutación p.A138T (identificada en pacientes y con una actividad residual del 4%) en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) (Clavero *et al.*, 2002; Guenzel *et al.*, 2013; Perez-Cerda

et al., 2000). Este modelo consigue mimetizar las alteraciones bioquímicas y la sintomatología observada en los pacientes que presentan una actividad enzimática hipomorfa, consiguiendo que los ratones sobrevivan hasta la edad adulta (Guenzel *et al.*, 2013).

2.6 Tratamiento y terapias

Actualmente no existe cura para la AP, los tratamientos que se llevan a cabo se basan en una corrección metabólica para aliviar los síntomas, mediante tratamiento dietético y trasplante de hígado. Dentro de las nuevas terapias alternativas que se están desarrollando para mejorar la calidad de vida de los pacientes en un futuro destacamos: la terapia génica y las terapias específicas de mutación.

Tratamiento dietético. El objetivo es reducir la producción de propionato y facilitar la eliminación de metabolitos tóxicos. Está basado en la restricción de proteínas de alto valor biológico y el suplemento de una mezcla especial de proteínas exenta de los aminoácidos propionogénicos (Thr, Met, Val e Ile). Para facilitar la eliminación por orina del ácido propiónico, en forma de C3 y prevenir la deficiencia secundaria de carnitina es necesario administrar carnitina. Además, se recomienda la suplementación de biotina (el cofactor del enzima) (Lehnert *et al.*, 1994); evitar el ayuno, para prevenir el catabolismo proteico y la lipólisis (Thompson y Chalmers, 1990); la administración de metronidazol, un antibiótico que reduce la producción anaerobia de propionato de las bacterias intestinales (Mellon *et al.*, 2000); e isoleucina, cuya carencia provoca el síndrome de piel escaldada.

Aunque se ha descrito una mejoría en pacientes que siguen una dieta restrictiva en aminoácidos propionogénicos sigue existiendo una alta incidencia de hospitalización por descompensación metabólica incluso bajo control dietético (Touati *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la descompensación metabólica aguda ocurre más a menudo como resultado de una infección u otra enfermedad (Sutton *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 1990a). La eficacia del tratamiento dietético es difícil de asegurar ya que los metabolitos detectados en plasma y orina, así como la medida de la actividad enzimática PCC en fibroblastos a menudo no se correlacionan con la severidad de la enfermedad (Thompson *et al.*, 1990a).

Trasplante de hígado. A pesar de las mejorías observadas con la terapia dietética, algunos pacientes todavía siguen presentando descompensaciones metabólicas y sufriendo alteraciones neurológicas y cardíacas (de Baulny *et al.*, 2005; Dionisi-Vici *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la corrección de PCC en hígado podría mitigar algunas de las secuelas metabólicas normalizando la transaminación de aminoácidos precursores de ácido propiónico (Saudubray *et al.*, 1999). Desde 1995 se han realizado varios trasplantes de hígado en pacientes con un fenotipo severo de AP (Rela *et al.*, 1997; Schlenzig *et al.*, 1995; Yorifuji *et al.*, 2000). Este tratamiento ha demostrado ser beneficioso en estos pacientes, mostrando una mejoría en el crecimiento, en el desarrollo mental,

una corrección de los niveles de hiperamonemia y disminuyendo los episodios de descompensación metabólica. También es notable destacar que en algunos casos se ha revertido la patología cardíaca (Romano *et al.*, 2010) y se ha conseguido normalizar los niveles de propionilglicina y tiglilglicina, sin embargo las concentraciones de metilcitrato, C3, y 3-OH-propionato permanecen elevadas tras el trasplante. A pesar de los numerosos beneficios del trasplante hepático y de ser considerado el tratamiento más eficiente en estos pacientes hay que considerar que la operación conlleva una alta morbilidad y mortalidad, y un alto riesgo de infección y de enfermedades linfoproliferativas.

Terapia génica. En AP sólo se han realizado ensayos de terapia génica en el modelo murino. Los primeros se llevaron a cabo en el modelo *Pcca*^{-/-} mediante inyecciones intrahepáticas con AAV8 (adenovirus asociado) que expresan el cDNA humano del gen *PCCA*, consiguiendo rescatar así un 60% de los ratones, de los cuales un 40% consiguieron sobrevivir durante más de dos meses (Chandler *et al.*, 2011). Los resultados con adenovirus (ad5) administrados via i.v. en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) de 5 y 10 semanas han demostrado una corrección en el crecimiento de los animales y en los niveles de propionilcarnitina/acetilcarnitina (C3/C2) y metilcitrato en sangre, resultando en una corrección transitoria que sólo es efectiva las 4 primeras semanas después de la administración del vector. Mientras que AAV8 han demostrado una corrección más robusta de los marcadores de la enfermedad durante 13 semanas de estudio, observándose un efecto más eficiente en los ratones más jóvenes. Además tanto con el uso de ad5 como de AAV8 se consiguió recuperar hasta un 30% la actividad enzimática PCC con respecto a los ratones *wildtype* (Guenzel *et al.*, 2013). Además, recientemente se ha publicado como AAV con promotores específicos de músculo e hígado pueden corregir los niveles de C3 y metilcitrato en sangre, siendo esta corrección más efectiva en los ratones machos frente a las hembras (Guenzel *et al.*, 2015).

Terapias específicas de mutación. Desde la década de los noventa se está potenciando la búsqueda de terapias personalizadas en distintas enfermedades genéticas, entre ellas, el cáncer y diversas enfermedades monogénicas. Las mutaciones sin sentido (*nonsense*) que generan un codón de parada prematuro de la traducción (PTC) abarcan aproximadamente entre un 10-15% de las mutaciones presentes en pacientes con alguna enfermedad genética. Desde los primeros estudios con aminoglucósidos llevados a cabo en fibrosis cística (Howard *et al.*, 1996) se ha demostrado la eficiencia de dicha terapia en más de 20 modelos de enfermedad *in vitro* y 8 modelos *in vivo* (Dietz, 2010; Keeling *et al.*, 2012; Linde y Kerem, 2008) y se han realizado varios ensayos clínicos en pacientes con fibrosis cística (Clancy *et al.*, 2001; Wilschanski *et al.*, 2003), distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), acidemia metilmalónica (AMM) y mucopolisacaridosis (MPS I) (www.ptcbio.com). En fibroblastos de pacientes con mutaciones que generan un PTC en AP se ha demostrado la capacidad de algunos de estos compuestos para recuperar parcialmente la actividad enzimática (Sanchez-Alcudia *et al.*, 2012). Otra de las terapias específicas de mutación empleadas con éxito *in vitro* en distintas EMH, incluida la AP, es la terapia antisentido. Oligonucleótidos

antisentido (AON) de tipo morfolino son capaces de eliminar la inclusión de pseudoexones en fibroblastos de pacientes con AP que presentan mutaciones puntuales que generan nuevos sitios críticos de *splicing*, recuperándose el transcrito normal y hasta un 100% de la actividad enzimática tras el tratamiento (Rincon *et al.*, 2007). Además se ha demostrado también en fibroblastos de pacientes con AP como la sobreexpresión *in vitro* de factores implicados en el procesamiento del mRNA (U1snRNA) permite suprimir defectos de *splicing* (Sanchez-Alcudia *et al.*, 2011).

31

3 Hiperfenilalaninemias

3.1 Historia y Epidemiología

La fenilcetonuria (PKU, OMIM 261600) es el error innato del metabolismo de aminoácidos más frecuente. Fue descrito por primera vez en 1934 por el médico noruego Ivar Asbjørn Følling al estudiar dos hermanos con retraso mental que excretaban cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico en la orina, por lo que le dio el nombre de Idiocia Fenilpirúvica (Følling, 1934), pero no fue hasta años más tarde cuando se llegó a conocer como fenilcetonuria (PKU). En 1947 se postuló que el defecto metabólico de la fenilcetonuria consistía en la imposibilidad de transformar fenilalanina (Phe) en tirosina (Tyr), originando hiperfenilalaninemia (HPA) (Jervis, 1947), y cinco años más tarde se demostró que esta HPA estaba causada por una deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) (Jervis, 1953). En 1960, el microbiólogo Robert Guthrie desarrolló un ensayo de inhibición bacteriana que permite medir los niveles de Phe en papel seco y realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad, evitando así los daños que conlleva el trastorno metabólico (Guthrie y Susi, 1963).

La incidencia global de las HPAs en el mundo es de 1 de cada 10.000 recién nacidos (Scriver, 2007). En Irlanda del Norte y en Turquía la prevalencia es más baja 1 de cada 6.500 (Zschocke *et al.*, 1997), en Suiza 1 de cada 8.000 y en Finlandia y Asia 1 de cada 100.000 (Guldberg *et al.*, 1995). En España hay una alta incidencia de HPAs suaves, se estima que 1 adulto español de cada 50 es portador (Blau *et al.*, 2014; Blau *et al.*, 2010).

3.2 Bioquímica y biología molecular

La PKU tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y está causada principalmente por una deficiencia en la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (PAH, EC 1.14.16.1) codificada por el gen *PAH*. Hasta la fecha se han descrito más de 850 variantes en el gen *PAH* (Blau *et al.*, 2014). Aproximadamente el 97-99% de las HPA están asociadas a mutaciones en el gen *PAH* y un 1-3% a alteraciones en la biosíntesis y reciclaje del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (de Baulny *et al.*, 2007; Kaufman *et al.*, 1978; Kaufman *et al.*, 1975; Thony *et al.*, 2000) (**Fig.3 y Tabla S1**).

La enzima PAH es una monooxigenasa de función mixta que cataliza la etapa limitante

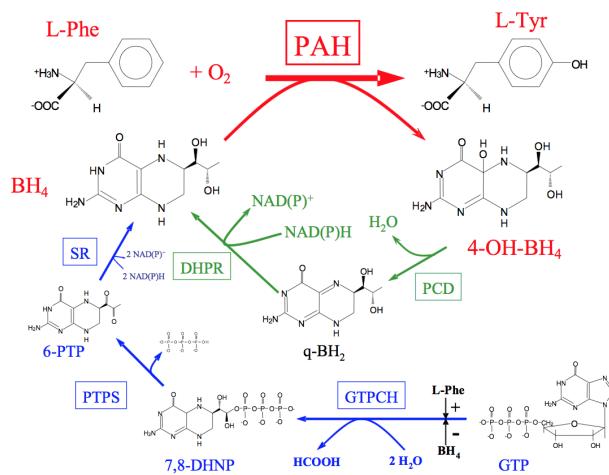


Fig.3 Esquema del ciclo catalítico de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) en presencia del cofactor natural BH4 (en rojo), en el que se incluyen las rutas principales de biosíntesis de BH4 (en azul) y de reducción del cofactor oxidado (en verde). Se indica la regulación ejercida por L-Phe (+) y BH4 (-) sobre la etapa limitante en la biosíntesis de BH4. Las enzimas implicadas en estos procesos se muestran en recuadros. Abreviaturas: 4-OH-BH4 (4 α -carbinolamin-tetra-hidrobiopterina); 6-PTP (6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina); 7,8-DHNP (7,8-dihidroneopterina-trifosfato); BH4 ((6R)-L-eritro-5,6,7,8 tetra-hidrobiopterina); DHPR (dihidropteridina reductasa); GTPCH (GTP ciclohidrolasa I); PCD (4 α -carbinolamin-tetrahidropterina deshidratasa); PTPS (6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina sintasa); q-BH2(7,8-di-hidrobiopterina quinoinoide); SR (sepiapterina reductasa).

en el catabolismo de la Phe llevando a cabo la parahidroxilación de L-Phe a L-Tyr en presencia de tetrahidrobiopterina (BH4) que actúa como cofactor y O₂ como co-sustrato. La enzima se expresa mayoritariamente en hígado (Lichter-Konecki *et al.*, 1999), y en algunos organismos también en riñón constituyendo un 30% de la actividad enzimática detectable en hígado (Heintz *et al.*, 2012a).

La metaloproteína PAH hepática es una enzima citosólica oligomérica, miembro de la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos. Está formada por dos subunidades idénticas y existe tanto en forma de dímero como de tetrámero (Fusetti *et al.*, 1998) que coexisten en un equilibrio dinámico dependiente de pH (Tourian, 1971), siendo el homotetrámero la forma funcionalmente más activa en presencia de Phe (Martinez *et al.*, 1995). La estructura tridimensional de la PAH ha sido obtenida mediante la caracterización estructural de diversas formas truncadas cristalizadas (Andersen *et al.*, 2001, 2002; Flatmark y Stevens, 1999; Fusetti *et al.*, 1998) demostrándose la existencia de 3 dominios diferenciados en el monómero: un dominio de tetramerización carboxilo terminal (Fusetti *et al.*, 1998), un dominio catalítico en el que se halla el centro activo de la enzima

con el átomo de hierro esencial para la catálisis y los sitios de unión para sustrato (Phe) y cofactor (BH4) (Andersen *et al.*, 2002) y un dominio regulador en la parte N-terminal (Knappskog *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2002) (**Fig.4**). La PAH está altamente regulada por fosforilación reversible, activación de sustrato e inhibición del cofactor (Kure *et al.*, 1999; Shiman *et al.*, 1994). La cooperatividad positiva de la enzima en respuesta a Phe se considera el mecanismo fisiológico de regulación de la homeostasis de Phe en sangre más importante (Thorolfsson *et al.*, 2003).

33

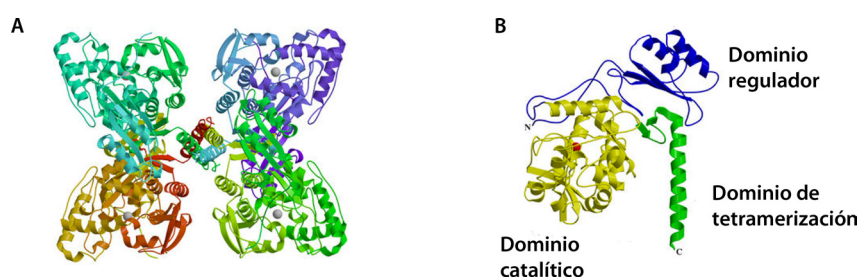


Fig.4 Estructura de la fenilalanina hidroxilasa (PAH). A) Vista perpendicular de la composición del modelo de la PAH humana. En rojo la parte N-terminal, en azul la parte C-terminal y el hierro está representado como una esfera gris en cada uno de los monómeros. B) Representación del monómero de la PAH humana. El dominio regulador se muestra en azul, el dominio catalítico en amarillo y el dominio de tetramerización en verde. El hierro se muestra como una esfera roja. Estructuras adaptadas de (Martinez *et al.*, 1995).

3.3 Diagnóstico y clasificación de hiperfenilalaninemias

La PKU fue la primera enfermedad metabólica asociada a un retraso mental y una de las primeras enfermedades incluidas dentro de los programas de cribado neonatal en el mundo. La detección precoz de la enfermedad es fundamental para minimizar los daños neurológicos en los pacientes mediante una restricción proteica temprana. Actualmente en la mayoría de los países desarrollados se ha adoptado un programa de cribado neonatal para la detección de Phe en sangre en papel por espectrometría de masas. En España el cribado neonatal de HPA se inició en 1968 en Granada y posteriormente en Madrid (1973) en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Metabólicas (CEDEM). Tras una detección precoz de los niveles de Phe en sangre superiores a los normales (150 $\mu\text{mol/L}$) se procede a la confirmación y diagnóstico de la etiología de la HPA. Para ello, se restringe la ingesta proteica y se procede a la toma de muestras de plasma, orina y sangre total para cuantificar los niveles de Phe y Tyr en plasma y orina, los niveles de fenilcetonas y pterinas en orina y determinar la actividad dihidropteridina reductasa (DHPR) en eritrocitos. Este estudio permite diferenciar entre las deficiencias en PAH y defectos del metabolismo del cofactor, ya que la excreción de pterinas es característica de cada tipo de HPA. Como complemento al estudio diferencial y para confirmar una sospecha de una alteración en el metabolismo del cofactor se realiza la determinación

de neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo.

Las HPAs debidas a defectos en el gen *PAH* se clasifican según los niveles de Phe plasmáticos y la tolerancia a la ingesta diaria a la L-Phe en la dieta (Blau *et al.*, 2011; Blau *et al.*, 2010) (**Tabla 1**). Niveles de Phe en sangre entre 50-110 $\mu\text{mol/L}$ se consideran normales (Blau *et al.*, 2010).

Tabla 1. Clasificación de hiperfenilalaninemias (HPAs) según los niveles de Phe en sangre.

Fenotipo	Phe en sangre ($\mu\text{mol/L}$)
HPA suave (MHP)	120-600
PKU suave (<i>mild</i> PKU)	600-1200
PKU clásico (<i>classic</i> PKU)	>1200

3.4 Presentación clínica y fisiopatología

La manifestación clínica y los síntomas de los pacientes PKU sin tratar son muy variables. La sintomatología más característica muestra alteraciones en el desarrollo cognitivo, tanto mayores cuanto mayor es el defecto de la capacidad hidroxilante de la L-Phe (**Tabla S5**). Los mecanismos a través de los cuales el incremento de los niveles de L-Phe plasmáticos causan estas alteraciones aún no están claros, aunque existen evidencias que sugieren que pueden afectar tanto a la mielinización, como al desarrollo y a la diferenciación celular en el sistema nervioso central (SNC) (Scriver y Kaufman, 2001). Además el incremento de los niveles de L-Phe es capaz de inhibir el transporte de otros aminoácidos neutros largos (LNAA) a través de la barrera hematoencefálica en pacientes PKU (Pietz *et al.*, 1999), ralentizando la síntesis de proteínas (de Groot *et al.*, 2015; Smith y Kang, 2000) y neurotransmisores (Puglisi-Allegra *et al.*, 2000) en el SNC de los modelos animales.

3.5 Modelos animales

La generación de un modelo animal apropiado en la década de los 90 abrió nuevas posibilidades para profundizar en la fisiopatología de la enfermedad y aplicar terapias génicas. Dos modelos murinos homoalélicos (*Pah*^{enu1/1} y *Pah*^{enu2/2}) y uno heteroalélico (*Pah*^{enu1/2}) que fueron generados mediante el uso de un agente mutagénico N-etil-N-nitrosourea (ENU) son empleados frecuentemente en investigaciones pre-clínicas (McDonald *et al.*, 1990; Sarkissian *et al.*, 2000; Shedlovsky *et al.*, 1993). En la **Tabla S6** se resumen las principales características de estos modelos. Los ratones con un fenotipo PKU (*Pah*^{enu2} y *Pah*^{enu3}) muestran hipopigmentación y alteraciones en el comportamiento mimetizando la presentación más severa de los pacientes PKU. El modelo *Pah*^{enu1/2} representa la categoría genética más común en pacientes con HPA, donde la mayoría presentan dos alelos diferentes (Scriver *et al.*, 2003); a menudo mutaciones puntuales que conducen a mal plegamiento y a la inestabilidad de la proteína PAH (Pey *et al.*, 2007; Sarkissian *et al.*, 2012).

3.6 Tratamiento y terapias

Restricción de la dieta. El tratamiento de pacientes PKU, consiste en la administración de una dieta restringida en Phe, con el fin de evitar el cúmulo de Phe en los fluidos biológicos y prevenir así el daño neurológico que se produce en los pacientes si no reciben tratamiento o lo reciben tarde. Durante años se pensó que el tratamiento dietético era suficiente hasta los ocho años de vida, edad a la que se consideraba que la mielinización cerebral estaba completa. Sin embargo, estudios en pacientes que habían abandonado la dieta a esa edad, mostraron una pérdida en algunas de sus capacidades cognitivas (Holtzman *et al.*, 1986). Otro estudio mostró el efecto que una dieta relajada producía en la disminución del coeficiente intelectual en adolescentes PKU, estos datos pusieron de manifiesto la necesidad de mantener la dieta restringida en Phe de por vida y controlar los niveles de Phe en sangre periódicamente, para evitar un cúmulo de este aminoácido y sus metabolitos. Este estudio puso de manifiesto la necesidad de la búsqueda de nuevas terapias alternativas (Smith *et al.*, 1991).

Tratamiento con BH4. Ensayos clínicos en grupos de pacientes con defectos en el gen *PAH*, han demostrado que el tratamiento con la forma sintética de la BH4 (dicloruro de sapropterina o Kuvan) resulta en una disminución de los niveles de Phe en sangre y una mejora en la tolerancia a la dieta con Phe (Kure *et al.*, 1999). Se estima que entre el 20-60% de los pacientes PKU son respondedores al tratamiento, siendo más probable la respuesta en aquellos pacientes con un fenotipo menos severo (Blau *et al.*, 2014). El tratamiento ha demostrado un desarrollo cognitivo normal en todos aquellos pacientes que lo empezaron antes de los 4 años de edad, no mostrando diferencias en los niveles normales de Phe en aquellos pacientes tratados solo con Kuvan, y con Kuvan y restricción dietética (Longo *et al.*, 2014).

Suplemento de aminoácidos neutros largos (LNAA). Los suplementos de LNAA se basan en la competencia de los LNAA con la Phe por receptores específicos que trasladan los LNAA a través de la mucosa intestinal a la sangre y de la barrera hematoencefálica a la corteza cerebral. La suplementación con LNAAs en pacientes PKU ha logrado una disminución de la Phe en sangre del 39-55% respecto del valor basal (Matalon *et al.*, 2007).

Terapia de reemplazo enzimático. Estudios con la enzima recombinante fenilalanina amonio liasa (PAL), que transforma la Phe en amonio, conjugada a polietilenglicol (rAv-PAL-PEG) han demostrado en ratones *Pah*^{enu2/enu2} disminuir considerablemente los niveles de Phe en sangre tras una administración semanal durante 3 meses (Gamez *et al.*, 2004; Sarkissian *et al.*, 2008). Ensayos clínicos (<https://www.bmrn.com/pipeline/clinical-trials/pku.php>) en humanos han demostrado que rAv-PAL-PEG disminuye una media de un 68% los niveles de Phe en aquellos pacientes PKU tratados durante 1 año, manifestando como efectos adversos más frecuentes mareos, hipersensibilidad en la zona de inyección y reacciones inmunes, pero sin mostrar ningún daño en hígado ni riñón (Blau y Longo, 2015). Actualmente se está investigando la administración oral de PAL (Kang *et al.*, 2010) y

como dirigir su administración de una manera más efectiva mediante su encapsulación en eritrocitos (Rossi *et al.*, 2014).

36

Terapia génica. Dado que la restricción dietética es un tratamiento efectivo en los pacientes PKU, la terapia génica debería convencer de su seguridad y aplicabilidad para poder reemplazarla. En los últimos años se han llevado a cabo grandes avances en los modelos de ratón, demostrándose la capacidad de adenovirus asociados recombinantes (rAAV) y auto-complementarios scAAV (*self complementary AAV*) dirigidos al hígado y al músculo de ratones *Pah*^{enu2/enu2} para corregir la HPA y revertir la hipopigmentación de forma transitoria (Ding *et al.*, 2008; Harding *et al.*, 2006). Sin embargo, la fuerte respuesta inmune a la re-aplicación así como la toxicidad y el potencial de inserción mutagénico obstaculizan una administración repetitiva, haciendo la terapia génica con AAV todavía poco viable para humanos (Asokan *et al.*, 2012). Los problemas asociados a la terapia génica con vectores virales pueden ser solventados mediante el uso de vectores no virales. Aunque estas aproximaciones han sido ignoradas en el pasado debido a su baja eficiencia de transfección y a la expresión transitoria del transgen, en los últimos años se ha conseguido una eficiente expresión a largo plazo con vectores basados en DNA (Glover *et al.*, 2005). Recientemente el uso de Minicírculos (MC) mediante una única inyección hidrodinámica en la vena de la cola (HTV) de ratones *Pah*^{enu2/enu2} ha demostrado normalizar eficientemente los niveles de Phe y revertir la hipopigmentación durante un año, consiguiendo que un 14-20% de los hepatocitos expresen el transgen (Viecelli *et al.*, 2014).

Terapias específicas de mutación. El descubrimiento del efecto de BH4 en la actividad de la enzima PAH mutada ha resultado en la inclusión de la PKU dentro de las denominadas “*misfolding diseases*” (Blau *et al.*, 2014). Esta categoría incluye enfermedades donde la variante génica causa un defecto en el plegamiento de la proteína y una disminución de su actividad. El uso de chaperonas farmacológicas incrementa la estabilidad y la actividad de proteínas con mutaciones *missense*. Actualmente se siguen principalmente dos estrategias en la búsqueda de nuevas chaperonas, el cribado farmacológico de alto rendimiento (*high-throughput screening*) en grandes librerías de moléculas y el cribado computacional (Pey *et al.*, 2008; Underhaug *et al.*, 2012). Se han identificado y probado varios componentes farmacológicos en el modelo de ratón PKU, uno de ellos benzil hidantoina que ha demostrado una reducción de los niveles de Phe dos veces más eficaz que el tratamiento con BH4 (Santos-Sierra *et al.*, 2012). Otro tipo de variantes específicas donde se ha investigado el tratamiento específico *in vitro* son las mutaciones que generan un codón de parada prematuro de la traducción (PTC) (Perez *et al.*, 2012). Experimentos con geneticina (G418) y gentamicina en células Cos-7 y Hek293 han conseguido suprimir la terminación de la traducción y recuperar cierta actividad residual (Blau *et al.*, 2014).

4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

4.1 Mitocondria y metabolismo energético

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana, dinámicos, que contienen su propio genoma circular y que desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la célula eucariota. Su principal función es la de producir la mayor parte de la energía metabólica de la célula mediante la oxidación de sustratos en un proceso acoplado a la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Otras de las funciones esenciales en las que están implicadas son: la transducción de señales mediadas por Ca^{2+} (Satrústegui *et al.*, 2007), la adaptación de las células a la demanda metabólica (Liesa y Shirihai, 2013), el mantenimiento del estado redox, el control de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zorov *et al.*, 2014) y el control de la muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2012). En este contexto, resulta lógico que la existencia de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que interfieren con la función de la mitocondria estén vinculadas a la manifestación de diferentes patologías humanas incluyendo enfermedades neurodegenerativas y metabólicas (Nunnari y Suomalainen, 2012).

En la mayoría de los tejidos humanos, la mitocondria produce la energía necesaria para el crecimiento de la célula y las actividades biológicas. Se estima que cerca del 90% del consumo de oxígeno en mamíferos es mitocondrial y se emplea principalmente para la síntesis de ATP, aunque los niveles pueden variar según el tejido y el estado de actividad del organismo considerado (Benard *et al.*, 2006). La mitocondria interviene en la última fase del catabolismo celular tras el conjunto de reacciones enzimáticas del metabolismo intermediario que degradan carbohidratos, grasas y proteínas en pequeñas moléculas tales como piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, respectivamente. La mitocondria transforma estos sustratos mediante oxidaciones para producir equivalentes energéticos en forma de ATP, NADH y FADH₂, a través de la β -oxidación y el TCA. Los electrones generados durante la oxidación de los sustratos metabólicos son degradados por la cadena transportadora de electrones (CTE) en un proceso de conversión de energía denominado fosforilación oxidativa (OXPHOS), donde los electrones liberados de la oxidación de NADH y FADH₂ se transfieren a la CTE compuesta por 5 complejos multiproteicos embebidos dentro de la membrana interna mitocondrial y dos tipos de transportadores de electrones (coenzima Q y citocromo c). El complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo II (succinato deshidrogenasa) reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, respectivamente, y los pasan a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q, que se desplaza libremente a través de la membrana. El complejo III (citocromo c oxidoreductasa o bc1) oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez al citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana. Por último, el complejo IV (citocromo oxidasa) acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O_2 a H_2O . Todos estos complejos están compuestos por numerosas subunidades que son codificadas tanto por genes nucleares como mitocondriales, a excepción del complejo II,

cuyas subunidades están codificadas sólo por el genoma nuclear. La energía liberada por el paso de los electrones a través de estos complejos propicia la formación de un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana interna mitocondrial. La utilización de este gradiente de H^+ por el complejo V (H^+ -ATP sintasa) en la fosforilación oxidativa produce la mayor parte del ATP celular.

4.2 Estrés oxidativo y defensas antioxidantes

Durante las reacciones redox que tienen lugar en el metabolismo aerobio de la célula se generan radicales libres, como subproducto metabólico, definidos por Halliwell y sus colaboradores como especies con uno o dos electrones desapareados en la última capa (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los radicales que derivan de una reducción parcial de la molécula de O_2 , denominados especies reactivas de oxígeno (ROS), representan la clase más importante de radicales generados en sistemas vivos (Miller *et al.*, 1990). La reacción mediada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) entre el anión superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO) genera peroxinitrito ($ONOO^-$), el precursor de las denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS). Tanto O_2^- como NO son considerados las principales especies reactivas en la célula. Aunque elevadas concentraciones de ROS pueden resultar tóxicas para la célula, en condiciones fisiológicas desempeñan un papel relevante como moléculas señalizadoras implicadas en una gran variedad de respuestas celulares como la muerte celular por apoptosis (Kaminsky y Zhivotovsky, 2014), la proliferación celular (Owusu-Ansah *et al.*, 2008), la diferenciación celular (Weidinger y Kozlov, 2015) y la defensa contra agentes infecciosos (Linares *et al.*, 2001) (Tabla S7).

La generación de radicales libres está equilibrada con los sistemas de defensa antioxidante de la célula, sin embargo, cuando se produce una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes que no puede ser compensado, se genera un estado de estrés oxidativo (Sies y Mehlhorn, 1986).

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS en las células de mamíferos (Turrens, 2003). A pesar de la eficiencia del consumo de O_2 durante la fosforilación oxidativa se estima que entre 1-5% de todos los electrones que entran en la CTE no llegan nunca a la citocromo oxidasa sino que se desprenden de los complejos I, II y III, principalmente de los centros Fe-S, y llevan a cabo reducciones de un electrón del oxígeno a superóxido, el principal precursor de ROS en la mitocondria (Murphy, 2009; Nohl *et al.*, 2004; Turrens, 2003). La mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes que transforman el O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el H_2O_2 en H_2O . Cuando la cantidad de estas enzimas es insuficiente para neutralizar las concentraciones de O_2^- , H_2O_2 se puede transformar en el radical hidroxilo (OH^\cdot) mediante la reacción de Fenton, catalizada por las formas reducidas de los átomos de Fe y/o Cu presentes en las enzimas mitocondriales (Winterbourn, 1995). Además, ROS pueden dañar también la membrana interna mitocondrial y los complejos de la CTE, permitiendo la

liberación de los grupos prostéticos que catalizan dicha reacción. Se ha postulado este mecanismo como la fuente de un posible círculo vicioso, donde la alteración de la CTE aumentaría la fuga de electrones, generando más ROS que a su vez dañarían la CTE, desestabilizando de esta manera el equilibrio energético de la célula (Andreyev *et al.*, 2005). También se ha descrito la relación entre un aumento de ROS y cambios estructurales en la morfología de la mitocondria (Boveris y Navarro, 2008). La dinámica mitocondrial ha demostrado tener un papel importante en la modulación de diversas funciones de la mitocondria como la generación de ROS, la señalización por Ca^{2+} , apoptosis y la producción energética (Rossignol y Karbowski, 2009).

Desde hace más de 40 años cuando se identificaron las primeras fuentes de ROS en la mitocondria hasta hoy, se han reconocido varios sitios de producción de O_2^- localizados principalmente en la membrana externa e interna de la mitocondria, siendo los complejos I y III de la CTE los sitios de mayor producción de O_2^- (**Fig.5**) (Andreyev *et al.*, 2005; Brand, 2010). La contribución de cada sitio de la CTE a la producción general de O_2^- varía dependiendo del órgano y del tejido, y también de si las mitocondrias están respirando de una forma activa o reducida (Murphy, 2009). Además de la mitocondria existen otras fuentes que participan en la producción de ROS intracelular, como los peroxisomas, el retículo endoplasmático y diversas enzimas, entre ellas, las NADPH oxidasas (NOX), las xantina oxidasas (XO), las nitrato sintasas (NOS), las ciclooxigenasas (COX), las lipoxigenasas, y enzimas del sistema citocromo P_{450} (Holmstrom y Finkel, 2014).

En 1995 Halliwell definió los antioxidantes como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell *et al.*, 1995). Las defensas antioxidantes de la célula pueden clasificarse en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son proteínas de peso molecular elevado, que minimizan el daño oxidativo catalizando reacciones químicas, mientras que los antioxidantes no enzimáticos son moléculas pequeñas que reaccionan directamente con los radicales libres, evitando que ejerzan su acción tóxica sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Dentro de los **antioxidantes enzimáticos** la superóxido dismutasa (SOD) está presente prácticamente en todos los mecanismos aerobios y juega un papel central en el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes en la célula. Su función es catalizar la dismutación de O_2^- a H_2O_2 (McCord y Fridovich, 1969). En mamíferos se han descrito tres isoformas de SOD, cada una ubicada preferentemente en un tejido específico, y caracterizada por el metal que contiene en su centro catalítico. Los niveles más altos de SOD se encuentran en el hígado, la corteza suprarrenal, riñón y bazo. Su actividad se regula mediante su síntesis, siendo además sensible a la oxigenación de los tejidos y a la generación de radicales libres (Harris, 1992).

Existen tres enzimas antioxidantes que catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O : catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y tioredoxina peroxidasa (Trx-P). Cada una de ellas presenta distintas isoformas que se localizan diferencialmente en la célula (Hekimi *et al.*, 2011). Aunque catalizan la misma reacción presentan distintas afinidades por el H_2O_2 en función de la cantidad presente en la célula (Ray y Husain, 2002). CAT se localiza en el citosol y en los peroxisomas principalmente de las células del hígado y riñón (Bai y Cederbaum, 2001) y se considera una de las enzimas más eficientes conocidas, tanto que no puede saturarse por H_2O_2 a concentraciones elevadas. GPx requiere de glutatión (GSH) y la enzima glutatión reductasa (GR) para ser regenerada. Existen 4 isoformas mayoritarias en tejidos de mamíferos, todas dependientes de selenio (Arthur, 2000). Trx-P cataliza también la reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos (procedentes de la lipoperoxidación) y requiere Tioredoxina (Trx) y Tioredoxina reductasa (TrxR) para ser regenerada (Mari *et al.*, 2009).

Dentro de las moléculas de bajo peso molecular que constituyen los **antioxidantes no enzimáticos** de la célula destacamos el glutatión (GSH) que actúa como cofactor de enzimas antioxidantes, el ácido ascórbico (vitamina C), los β -carotenos, los α -tocoferoles (vitamina E) y la melatonina, que actúan como neutralizadores de ROS.

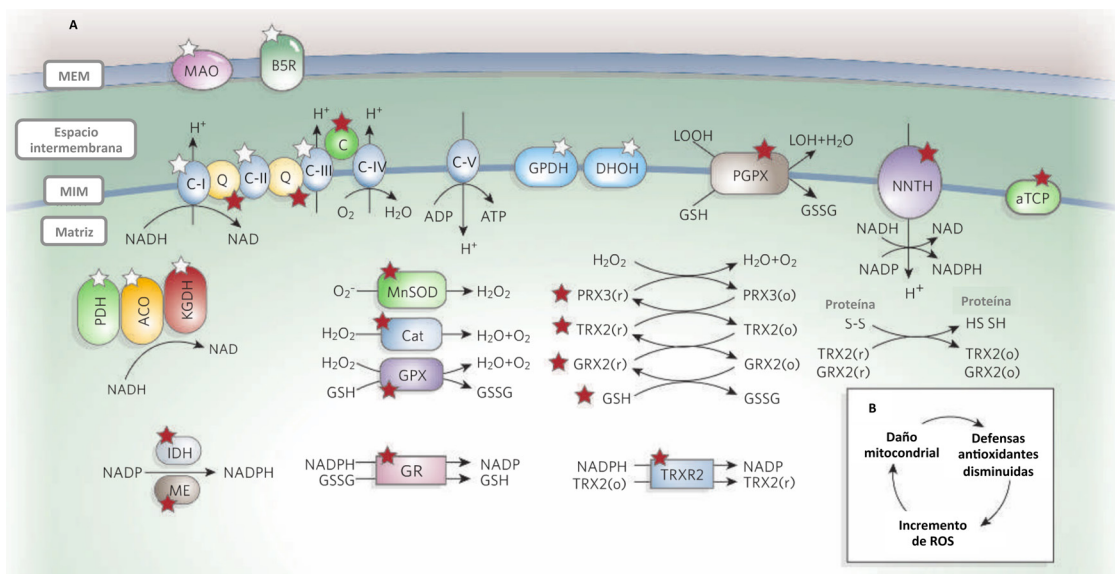


Fig.5 Papel de la mitocondria en el metabolismo de ROS. Los procesos y componentes implicados en la generación de ROS están marcados con una estrella blanca y las defensas antioxidantes con una estrella roja. MEM (membrana externa mitocondrial); MIM (membrana interna mitocondrial); MAO (monoamina oxidasa); B5R (citocromo b5 reductasa); PDH (piruvato deshidrogenasa); ACO (aconitasa); KGDH (α -cetoglutarato deshidrogenasa); MnSOD (manganeso superóxido dismutasa); Cat (catalasa); GPx (glutatión peroxidasa); GPDH (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa); DHOH (dihidroorato deshidrogenasa); aTCP (α -tocoferol); Q (coenzima Q10), c (citocromo); GSH (glutatión); GR (glutatión reductasa); TRX2 (tioredoxina); TRXR2 (tioredoxina reductasa); PRX3/5 (peroxiredoxinas); IDH (isocitrato deshidrogenasa); ME (enzima málica); NNTH (nicotinamida nucleótido transhidrolasa); PGPX (glutatión peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos); C-I-V (complejos de la CTE). Figura adaptada de Michael T.Lin (Lin y Beal, 2006)

En este trabajo hemos empleado distintos antioxidantes: trolox, *tiron*, resveratrol y mitoQ. Trolox, un análogo hidrosoluble de α -tocoferol, actúa como un antioxidante lipídico capaz de neutralizar radicales peroxil lipídicos, manteniendo la estabilidad de las membranas lipídicas (Wang y Quinn, 1999). *Tiron* es un agente quelante de hierro y otros metales (Krishna *et al.*, 1992) y un potente neutralizador de aniones superóxido (Supinski *et al.*, 1999). Es capaz de permeabilizar la membrana mitocondrial y permanecer allí más que en el citosol (McArdle *et al.*, 2005; Supinski *et al.*, 1999). Resveratrol es una fitoalexina polifenólica que presenta múltiples propiedades beneficiosas como antioxidante, anti-inflamatorio, protector renal, cardioprotector, anti-cancerígeno y neuroprotector (Kitada y Koya, 2013; Kitada *et al.*, 2011; Kondratyuk *et al.*, 2011; Magyar *et al.*). Es considerado un potente antioxidante capaz de neutralizar O_2^- , H_2O_2 y $ONOO^-$ (Holthoff *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2003; Mokni *et al.*, 2007) y de modular la expresión y actividad de enzimas antioxidantes (SOD2, GPx1 y CAT) mediante la regulación transcripcional de factores nucleares como Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2*), AP1 (*activator protein-1*) y FOXO (*Forkhead box O*) (Kitada *et al.*, 2011; Mokni *et al.*, 2007; Robb *et al.*, 2008a; Robb *et al.*, 2008b; Price *et al.*, 2012). Este antioxidante induce además la expresión de complejos de la CTE, factores de transcripción y SOD en cardiomiocitos (Li *et al.*, 2013). Resveratrol incrementa los niveles de fosforilación potenciando la actividad enzimática GPx1, ya que es regulada transcripcionalmente mediante la fosforilación de residuos específicos de tirosina (Cao *et al.*, 2003; Sadi *et al.*, 2014). MitoQ es una ubiquinona (Coenzima Q10) unida a un catión lipofílico trifenilfosfonio (TPP) capaz de acumularse *in vivo* dentro de las mitocondrias en respuesta a diferencias en el potencial de membrana (Murphy, 2001, 2008). La principal acción antioxidante de MitoQ es prevenir la peroxidación lipídica (James *et al.*, 2004). Ha sido usado en un amplio rango de estudios *in vivo* en roedores y en ensayos clínicos en humanos (Smith y Murphy, 2010).

4.3 Disfunción mitocondrial en acidemia propiónica

En los últimos años se han descrito numerosas evidencias que ponen de manifiesto la implicación de la disfunción mitocondrial en la fisiopatología de varias acidemias orgánicas. La mayoría de los metabolitos que se acumulan en la AP se producen dentro de la mitocondria, donde alcanzan su concentración intracelular máxima antes de ser excretados en la orina. Por lo tanto, es posible que la fisiopatología de la enfermedad sea debida en parte a una disfunción mitocondrial secundaria provocada por alteraciones en OXPHOS y en otras vías mitocondriales implicadas en la producción de energía (Wajner y Goodman, 2011). Estudios complementarios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el propionil-CoA inhibe el complejo III de la CTE (Sauer *et al.*, 2008) y las actividades de diversas enzimas implicadas en el TCA (Cheema-Dhadli *et al.*, 1975). Además el propionato inhibe fuertemente el consumo de oxígeno, la oxidación de α -cetoglutarato y piruvato en mitocondrias de hígado de rata a concentraciones encontradas en el plasma de pacientes con AP (Cathelineau *et al.*,

1979). Asimismo se ha propuesto una disminución de la actividad del TCA debido al defecto en la síntesis de succinil-CoA a partir de propionil-CoA. Este hecho puede ser especialmente significativo para el corazón y el músculo esquelético, ya que el propionato es el mayor sustrato anaplerótico y además el TCA juega un papel importante en la contracción del músculo cardíaco (Gibala *et al.*, 2000). Finalmente, es importante destacar que se han descrito alteraciones en la estructura mitocondrial en el músculo esquelético, corazón e hígado de pacientes con AP, junto con una marcada disminución en la producción de ATP, en la cantidad de DNA mitocondrial y en la actividad de diversos complejos de la CTE (de Keyzer *et al.*, 2009; Mardach *et al.*, 2005; Schwab *et al.*, 2006).

5 Splicing y terapia antisentido

5.1 Alteraciones en el mecanismo de *splicing*

Aproximadamente entre un 90-94% de los genes humanos contienen intrones que tienen que ser eliminados del pre-mRNA para su correcta traducción a proteína, esto se produce en un proceso muy preciso y complejo denominado *splicing*. Este proceso está coordinado por la maquinaria de *splicing*, formada por elementos en cis que constituyen las secuencias consenso conservadas: sitios 5' donador y 3' aceptor de *splicing*, secuencia de ramificación y tracto polipirimidínico. Estos elementos son reconocidos por un complejo ribonucleoproteico denominado spliceosoma, que está compuesto por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP), U1, U2, U4, U5 y U6, y aproximadamente 150 proteínas auxiliares. El proceso se produce en diferentes pasos en los que los componentes del spliceosoma reconocen de manera secuencial las diferentes regiones conservadas (Singh y Cooper, 2012). Existen también secuencias reguladoras, menos conservadas, que se localizan tanto en exones como en intrones, y que pueden actuar bien estimulando la eliminación intrónica (potenciadores de *splicing* o *enhancers*) o bien impidiéndola (silenciadores de *splicing* o *silencers*). Los elementos activadores son reconocidos por proteínas ricas en serina y arginina (SR) y los silenciadores por ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) (De Conti *et al.*, 2013; Pozzoli y Sironi, 2005).

La variabilidad en el reconocimiento de las secuencias conservadas de *splicing* por los diferentes componentes del spliceosoma contribuye a una diferente eficiencia y fidelidad del proceso. Mutaciones puntuales localizadas en cualquiera de estas secuencias, que interrumpen estas interacciones, son responsables de aproximadamente el 10% de los casos de las enfermedades genéticas (HGMD *professional release* 2014.3) (Lewandowska, 2013; Wang y Cooper, 2007). Aunque un estudio reciente concluye que las mutaciones en cis pueden constituir hasta un 33% de todas las mutaciones causantes de enfermedad (Lim *et al.*, 2011). Las mutaciones que afectan al *splicing* han sido descritas, clásicamente, por interrumpir sitios conservados de *splicing* afectando principalmente

a los dinucleótidos invariables AG o GT en los sitios 3' y 5' de *splicing*, respectivamente (Lewandowska, 2013). Sin embargo, gracias a los rápidos avances de la secuenciación masiva, hoy en día, es factible analizar intrones completos, lo cual, ha incrementado la detección de mutaciones en regiones intrónicas profundas que perturban el procesamiento normal del transcrito. Los efectos más comunes son la exclusión de algún exon (*exon skipping*), o la activación de nuevos sitios crípticos de *splicing* produciendo la exclusión de secuencias codificantes o la inclusión de secuencias intrónicas aberrantes (pseudoxones) (Divina *et al.*, 2009). Estas deleciones y/o inserciones pueden producirse en fase, provocando la inserción o deleción de ciertos aminoácidos, que pueden alterar la estructura y funcionalidad de la proteína (Havens *et al.*, 2013), o alterar la pauta de lectura y generar un codón de terminación prematuro (PTC) que suele provocar la degradación del mRNA por el NMD (*nonsense-mediated decay*) evitando la formación de proteínas truncadas carentes de función (Maquat, 2004).

El análisis *in silico* mediante el uso de herramientas bioinformáticas constituye una primera aproximación útil que nos orienta del posible mecanismo molecular por el cual una mutación puede ejercer su efecto, sin embargo, es imprescindible llevar a cabo una verificación experimental. La comparación de los análisis *in vitro*, *ex vivo* e *in silico* son de gran importancia como ha quedado reflejado en un estudio reciente (Ramalho *et al.*, 2015). Por ello, es necesario analizar el perfil transcripcional del alelo mutante en células del paciente, y/o realizar un ensayo *ex vivo* con vectores específicos de *splicing*, llamados minigenes (Baralle y Baralle, 2005; Cooper, 2005; Desviat *et al.*, 2012; Ramalho *et al.*, 2015). Un minigen es un vector que contiene una versión simplificada de un gen, con dos regiones exónicas flanqueadas por un sitio 5' y 3' de *splicing* respectivamente y separadas por una secuencia intrónica donde se encuentra el sitio de policlonaaje donde se introduce la región de interés. El análisis transcripcional de la expresión transitoria de la construcción normal y mutante permite profundizar en el efecto sobre el proceso de *splicing* de la mutación analizada (Baralle y Baralle, 2005; Desviat *et al.*, 2012).

5.2 Modulación del *splicing* mediante el uso de oligonucleótidos antisentido

Aunque el proceso de *splicing*, en la actualidad, no ha sido completamente elucidado, se han desarrollado distintas herramientas útiles para poder manipularlo y corregir así el *splicing* aberrante en distintas enfermedades genéticas. La terapia antisentido mediante el uso de oligonucleótidos antisentido para modular el *splicing* ha ganado un interés exponencial en los últimos años, debido en parte al gran avance desde la década de los 90 en los métodos de secuenciación de DNA y síntesis de oligonucleótidos (Geiser, 1990; Kurreck, 2003). El número de publicaciones que demuestran el éxito de esta terapia en distintas enfermedades raras, incluidas las EMH, está creciendo desde su primera aplicación para bloquear un sitio críptico de *splicing* en el gen de la β -talasemia (Dominski y Kole, 1993). Los AONs en función de su química presentan también distintos mecanismos de

acción, es importante distinguir entre aquellos que actúan como silenciadores génicos, ya que se unen al RNA y promueven su degradación, principalmente vía complejo RISC o RNasa H, y aquellos que actúan como moduladores de *splicing*, sin degradar el RNA, como los SSOs (*Splice Switching Oligonucleotides*), éstos se unen al RNA y bloquean estéricamente el acceso a los componentes del spliceosoma (Kole *et al.*, 2012; Rigo *et al.*, 2014; Spitali y Aartsma-Rus, 2012). En EMH se han empleado con éxito SSOs dirigidos contra los sitios 5' y 3' de *splicing* forzando el *pseudoexon skipping* o bloqueando sitios críticos, consiguiendo en ambos casos recuperar el transcrito normal, la proteína y corregir la deficiencia enzimática (Perez *et al.*, 2010; Rincon *et al.*, 2007). Se ha demostrado *in vivo* la eficacia de SSOs en el modelo animal de distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Sazani *et al.*, 2002) y actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos de fase II y III con distintos AONs en DMD y atrofia muscular espinal (SMA) (Aartsma-Rus, 2012; Zanetta *et al.*, 2014). Los SSOs han sido usados también para modelar enfermedades provocando el *exon skipping* de uno o varios exones dando lugar a una proteína no funcional (Sahashi *et al.*, 2012). Las modificaciones químicas del esqueleto de los AONs son cruciales para conseguir una alta efectividad en la modulación de *splicing*. Además de influir en la habilidad para unirse fuerte y específicamente a su secuencia complementaria, el tipo de esqueleto también contribuye a la eficiencia de transporte al interior de las células, la farmacología, la biodistribución, la toxicología y al uso terapéutico en humanos (Saleh *et al.*, 2012). Dentro de los SSOs las modificaciones químicas con una mayor aceptación son: 1) los AONs cargados negativamente como 2-O-metil-fosforotioato (2-OMe), ácidos nucleicos bloqueados o cerrados (LNA, *Locked Nucleic Acid*), y 2-O-metoxietil (2-MOE) y 2) aquellos con carga neutra como morfolinos fosforodiamidato (PMO) y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Los oligos PMO son cadenas cortas de aproximadamente 25 nucleótidos donde en cada nucleótido se ha sustituido la ribosa por un anillo morfolino unido a un grupo fosforodiamidato sin carga, que reemplaza al grupo fosfato (Summerton, 1999). Los PMO son altamente específicos, solubles en agua y resistentes a un amplio rango de nucleasas. Dado que por sí solos no cruzan libremente las membranas de la célula, se ha desarrollado un sistema de transferencia por endocitosis (*endoporter*) el cual garantiza la entrada en células en cultivo (Morcos, 2001). Además, para implementar el uso de PMO en ensayos *in vivo* se han desarrollado los vivo-morfolinos (VMO), constituidos por PMO unidos covalentemente a una parte transportadora formada por un dendrímero de octaguanidina rico en argininas que facilita el cruce a través de las membranas celulares (Li y Morcos, 2008; Morcos *et al.*, 2008). Los VMOs han sido administrados vía intravenosa (i.v.) en ratones, mostrando un transporte eficiente y una amplia distribución a diferentes tejidos (Morcos *et al.*, 2008). Además, han sido eficientemente utilizados como terapia antisentido *in vivo* (Osorio *et al.*, 2011). También han demostrado ser especialmente útiles en la generación de pequeños animales modelo de enfermedad, principalmente en pez cebra (Cline *et al.*, 2012). Por otra parte, los LNA presentan una estructura rígida debido al puente de metileno que conecta el oxígeno en la posición 2'-O con el átomo de carbono en la posición 4'-C del anillo de ribosa (Kumar *et al.*, 1998). Los LNAs no solo tienen una alta afinidad por su diana sino

que también han demostrado una penetración celular y nuclear eficiente después de la transfección con lípidos catiónicos (Arzumanov *et al.*, 2003). La alta afinidad de los LNA, sin mostrar toxicidad, también ha sido comprobada *in vivo* tras su inyección en el cerebro de ratas (Fluiter *et al.*, 2005; Wahlestedt *et al.*, 2000). Sin embargo se ha observado que vía intraperitoneal los LNAs producen hepatotoxicidad (Swayze *et al.*, 2007). El campo de las modificaciones químicas y los sistemas de vehiculización de AONs a las células diana está creciendo rápidamente. Recientemente se han descrito pequeñas moléculas capaces de potenciar el efecto farmacológico de los AONs modulando el tráfico intracelular y su liberación de los endosomas (Yang *et al.*, 2015).



Objetivos/Objectives

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido profundizar en las bases moleculares y fisiopatológicas de la acidemia propiónica (AP) y buscar nuevas aproximaciones que nos permitan probar la eficiencia de la terapia antisentido.

49

Con este fin se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar funcionalmente el efecto de nuevas variantes alélicas identificadas en los genes *PCCA* y *PCCB* causantes de AP.
2. Analizar el estrés oxidativo y el potencial terapéutico de compuestos antioxidantes en fibroblastos de pacientes con AP.
3. Estudiar la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en el modelo murino hipomorfo de AP.
4. Desarrollar un modelo *in vivo* para testar la aplicabilidad en enfermedades metabólicas de oligonucleótidos antisentido moduladores de *splicing*.

OBJECTIVES

The **main goal** of this study was to further characterize the molecular and pathophysiological basis of propionic acidemia (PA) as well as develop new strategies that allow us to test the efficiency of antisense therapy.

51

To this aim we proposed the following **specific objectives**:

1. Functional characterization of the effect of new allelic variants identified in *PCCA* and *PCCB* genes causing PA.
2. Analysis of oxidative stress and therapeutic potential of antioxidant compounds in PA patients-derived fibroblasts.
3. Study of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the hypomorph mouse model of PA.
4. Develop an *in vivo* model to test the applicability of splice-modulating antisense oligonucleotides for metabolic diseases.



Materiales y métodos



1 Materiales

1.1 Muestras de fibroblastos de pacientes

En este trabajo se han incluido 10 muestras de pacientes con acidemia propiónica (AP) deficientes en los genes *PCCA* y *PCCB* (**Tabla 11**). Los pacientes se diagnosticaron en base a su sintomatología clínica y análisis bioquímico, enzimático y/o genético en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM, Madrid).

Las muestras de pacientes fueron obtenidas con el consentimiento informado y autorizado por los padres, y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el programa genoma humano y derechos humanos.

1.2 Ratones

A lo largo del trabajo aquí presentado se han utilizado dos grupos de modelos transgénicos: los ratones heterocigotos *Pah*^{enu2} como modelo de PKU para probar la eficiencia de terapia antisentido y los ratones hipomorfos *Pcca*^{-/-} (A138T) como modelo de AP.

Pah^{enu2} son ratones de fondo genético C57BL/6, que se generaron utilizando un agente químico mutagénico N-etil-N-nitrosurea (ENU) el cual induce mutaciones puntuales (Shedlovsky *et al.*, 1993). El ratón heterocigoto *Pah*^{enu2/+} presenta un alelo con una mutación *missense* en el exon 7 (p.Phe263Ser; c.789T>C) del gen *Pah* y un alelo *wildtype* o silvestre, que le permite desarrollar un fenotipo normal. Los experimentos se realizaron con ratones *wildtype* de la cepa C57BL/6 y heterocigotos C57BL/6 *Pah*^{enu2/+} generados mediante el cruce entre ratones homocigotos C57BL/6 *Pah*^{enu2/enu2} y heterocigotos C57BL/6 *Pah*^{enu2/+}.

Pcca^{-/-} (A138T) es un modelo hipomorfo que se generó a partir de ratones *Pcca*^{+/-} (Miyazaki *et al.*, 2001) a los cuales se les ha introducido un transgen de *PCCA* humano mutado (A138T) (Guenzel *et al.*, 2013). Todos los experimentos se han realizado usando ratones *wildtype* de la cepa FVB y homocigotos *Pcca*^{-/-} (A138T) generados mediante el cruce de machos heterocigotos *Pcca*^{+/-} (A138T) con hembras heterocigotas *Pcca*^{+/-} (A138T) y homocigotas *Pcca*^{-/-} (A138T).

Los animales fueron alimentados y mantenidos en condiciones asépticas (libre de patógenos) en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO) y en el animalario del Hospital Universitario de Zúrich. Se agruparon en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida (Harlan Iberica) ad libitum y se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12h con encendido de luz a las 08:00h. Todos los procedimientos realizados

con los animales en el CBMSO fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del CBMSO y autorizados por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). Los experimentos realizados en el Hospital Universitario de Zúrich fueron aprobados por la oficina veterinaria cantonal de Zúrich según la ley suiza de protección de animales.

56

1.3 Líneas celulares

Se utilizaron fibroblastos procedentes de las líneas control GM08680, GM08429, GM08333, GM08447, GM05756, CC2509 y CC2511 obtenidas de Coriell Cell Repositories, New Jersey y Lonza (Tabla 2).

Las líneas celulares establecidas de fibroblastos 5626T (*PCCA*, genotipo: c.1899+3del4/

Tabla 2. Líneas de fibroblasts control

Control	Línea ^a	Edad ^b	Sexo ^c	Raza	Origen biopsia
C1	GM08429	1d	V	ND	Oreja
C2	GM08333	5m	V	Negra	Prepucio
C3	GM08447	ND	V	ND	ND
C4	GM05756	2m	V	Caucásica	Zona inguinal
C5	GM08680	5m	V	Caucásica	Prepucio
C6	CC2509	Neonatal ND	ND	ND	Prepucio
C7	CC2511	Adulto ND	ND	ND	Prepucio

^a Número de identificación de Coriell Repositories o de Lonza. ^b Edad del individuo en el momento de tomar la muestra. a= año; m= meses; d=día. ^c Sexo del individuo. V= varón. ND= No disponible.

c.1899+3del4) y 14046T (*PCCB*, genotipo: c.1218_1231del14ins12/ c.1218_1231del14ins12) (Clavero *et al.*, 2002; Perez-Cerda *et al.*, 2003) transformadas con el plásmido T22 (cedido por el Dr. P. H. Gallimore, Universidad de Birmingham, UK), que contiene secuencias del virus SV40 se emplearon en los estudios de expresión de *PCCA* y *PCCB* en células eucariotas.

Hep3B es una línea celular que se estableció a partir de un carcinoma hepático de un niño negro de 8 años. Fue cedida a nuestro laboratorio por el Dr. S.R. de Córdoba, y se utilizó en este trabajo para probar la eficiencia de distintos oligonucleótidos antisentido (AONs).

Hek293T se originó a partir de la línea celular Hek293 (células embrionarias de riñón humano transformadas con adenovirus) que contienen el antígeno grande de SV40 y la región temprana del promotor. Estas células se utilizaron para el análisis del perfil transcripcional mediante la expresión de distintas construcciones de minigenes.

1.4 Cepas bacterianas

Tabla 3. Cepas bacterianas

Nombre	Descripción	Casa comercial
XL1-Blue	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-, F'[proA B+lacIqlacZΔM15Tn10(tetr)]	Stratagene
TOPO One Shot Mach®1T1R	lac ZΔM15, hsdR, lacX74, recA, endA, tonA	Invitrogen

57

1.5 Vectores

Tabla 4. Vectores

Plásmido	Descripción	Uso	Origen
pSPL3	Vector de <i>splicing</i>	Minigenes	Dr.B.Andresen
pCMVA45-12	cDNA <i>PCCA</i>	Expresión de mutaciones	Dr. Leclerc y Prof. R. A. Gravel
pRcCMVB52	cDNA <i>PCCB</i>	Expresión de mutaciones	Dr. Leclerc y Prof. R. A. Gravel
TOPO TA	Vector de clonaje	Clonaje	Invitrogen

1.6 Reactivos y otros materiales

Tabla 5. Reactivos y otros materiales

Reactivo / Producto	Referencia	Casa comercial	Uso/ Aplicación
Agarose D1 Low EEO	8010	Conda	Análisis de productos PCR
Alw26I	ER0031	Thermo Fisher Scientific	Genotipado
<i>Annexin V- DY634 Apoptosis Detection Kit</i>	ANXVKDY-100T	Inmunostep	Ensayo de apoptosis
<i>APS (Ammonium Persulfate)</i>	1201	Merck	Western Blot
<i>Autofluorescence Eliminator Reagent</i>	2160	Millipore	Microscopía
Bicarbonato radiactivo (NaH*CO3)	NEC 086H 001mCi	Perkin Elmer	Actividad PCC
Bicarbonato sódico anhidro	6329	Merck	Actividad PCC
<i>BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit</i>	4337455	Applied Biosystems	Secuenciación
<i>Biorad Protein Assay (Bradford)</i>	500-006	Biorad	Cuantificación de proteínas
<i>Blot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular</i>	IB3010-01	Invitrogen	Western Blot
n-Butanol	101990	Merck	Cuantificación de MDA
Coenzym Q10	C9538-100mg	Sigma Aldrich	Antioxidante
<i>Complete mini EDTA free</i>	11 836 170 001	Roche	Varios
DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	268298	Merck	Marcaje de DNA, IF 1/1000
DHE (Dihidroetidio)	37291-25mg	Sigma	Histología
<i>DNA fragmentation/Fluorescence staining</i>	17-141	Millipore	Detección de apoptosis
<i>DNeasy Blood & Blood & Tissue kit</i>	69540	Qiagen	Extracción de DNA
DTT (ditiotreitól)	D9163	Sigma Aldrich	Western Blot
EDTA (Ethylendiaminetetraacetic acid)	Servicio cultivos del CBMSO		Cultivos celulares
ECL Western Blotting Detection	RPN 2209	GE Healthcare Life Science	Western Blot

Reactivo / Producto	Referencia	Casa comercial	Uso/ Aplicación
EcoRI	ER0271	Thermo Fisher Scientific	Clonaje
Endo-Porter	-	Gene Tools	Transfección
FBS (Fetal Bovine Serum)	F-7524	Sigma	Cultivos celulares
Formalina	H-T501128	Sigma Aldrich	Microscopía
L-glutation reducido	G4251	Sigma Aldrich	Actividad PCC
Glutamina	25030-081	Gibco BRL	Cultivos celulares
Heparina sódica chiesi 1000 UI/mL	608737	Chiesi España	Perfusión
IP (Ioduro de propidio)	P4170-25MG	Sigma	Marcaje de DNA , FACS
Isoflurano	880393.4	Abbvie Farmacéutica	Anestésico
JetPEI	101-10N	Polyplus Transfection	Transfección
Lipofectamin LTX	15338-100	Invitrogen	Transfección
LPS (Lipopolisacrido) <i>E.Coli</i> O111:B4	437627	Calbiochem	Inducción de ROS
<i>MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I-Large Volume</i>	3 730 972 001	Roche	Aislamiento DNA tejido
<i>MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer</i>	04 805 160 001	Roche	Aislamiento DNA tejido
Medios de comprobación	Servicio cultivos CBMSO	Difco Laboratories	Cultivos celulares
Melatonin	M5250-1G	Sigma Aldrich	Antioxidante
MEM (<i>Minimun Essential Medium</i>)	Servicio cultivos del CBMSO		Cultivos celulares
MitoQ	-	Prof. Murphy	Antioxidante
<i>Nitrocelulose blotting membrane 0,2 µM</i>	10600001	GE Healthcare Life Science	Western Blot
<i>Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards</i>	LC5800	Invitrogen	Western Blot
<i>NuPAGE LDS 4X sample buffer-250mL</i>	NP0008	Invitrogen	Western Blot
<i>NuPAGE MES SDS Running buffer-500mL</i>	NP0002	Invitrogen	Western Blot
<i>OptiMEM I Reduced Serum Medium (1X) Liquid-with Glutamine</i>	31985-047	Invitrogen	Transfección cultivos
<i>Oxiselect TBARs MDA quantification</i>	STA-330	Cell Biolabs	Cuantificación de MDA
Placas y botellas de cultivos		BD-Falcon	Cultivos celulares
<i>PHOsPHO-Stop</i>	04 906 837 001	Roche	Western Blot
Polimerasas <i>Fast Start</i>	4710444001	Roche	PCR
<i>Prolong gold antifade</i>	36930	Invitrogen	Medio de montaje
<i>n-Propionyl Coenzyme A Lithium salt</i>	P5397-25MG	Sigma Aldrich	Actividad PCC
<i>Prosieve Protein Marker</i>	50547	Lonza	Western Blot
<i>Proteinase K</i>	03 115 879 001	Roche	Aislamiento DNA de tejido
<i>QIAquick Gel Extraction kit</i>	28704	Qiagen	Purificación banda gel
<i>QIAmp RNA blood mini kit</i>	52304	Qiagen	Extracción de RNA
<i>Quickchange™ Site Directed Mutagenesis kit</i>	200524	Agilent Technologies	Mutagénesis
<i>Rapid DNA ligation kit</i>	11635379001	Roche	Clonaje
Resveratrol	R5010	Sigma Aldrich	Antioxidante
<i>Staurosporine</i>	S4400	Sigma Aldrich	Ensayos de apoptosis
<i>SsoFast EvaGreen SuperMix</i>	CN 172- 5204	Biorad	PCR cuantitativa

Reactivo / Producto	Referencia	Casa comercial	Uso/ Aplicación
<i>Streptozotocin</i>	572201	Calbiochem	Inducción diabetes
<i>Superfrost ultra plus</i>	10143352	Thermo Scientific	Histología
<i>SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	18080-051	Invitrogen	RT-PCR
<i>SuperScript Vilo cDNA synthesis kit</i>	11754050	Invitrogen	RT-PCR
TEMED (Tetrametiletilendiamida)	161-0801	Biorad	Western Blot
<i>Tissue-Tek* O.C.T. Compound</i>	4583	Sakura® Finetek	Histología
<i>Tiron</i>	89460-10G	Sigma Aldrich	Antioxidante
<i>TOPO TA cloning kit for subcloning</i>	450641	Invitrogen	Clonaje
TPP (<i>TriPhenyl Phosphonium</i>)	-	Prof. Murphy	Antioxidante
Tripsina	Servicio cultivos del CBMSO		Cultivos
Trizol	15596028	Life Science	Extracción de RNA
Trolox (<i>6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid</i>)	238813-1G	Sigma Aldrich	Antioxidante
Trypan blue 0,4%	T8154	Sigma	Marcador de viabilidad
<i>Wizard Plus Miniprep DNA Purification System</i>	A1330	Promega	Aislamiento DNA plasmídico
Xileno	1.317.691.611	AppliChem Panreac	Histología

Tabla 6. Tampones y soluciones

Solución	Composición
PBS	NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O 8mM, PO ₄ H ₂ K 1,5 mM
TBS	TrisHCl 50mM, NaCl 276mM, KCl 54mM pH 8
PBS Tampón bloqueo	PBS 1x, BSA 1%
Tampón TAE	Tris-Acetato 40mM, EDTA 2mM
Tampón -TBARs	PBS 1x, BHT (Butilhidroxitolueno)
Solución de deshibridación	TBS 1x, Tween 20 0,05%, glicina 0,2M
Tampones SDS-PAGE y Western Blot	
Tampón de carga- <i>NuPAGE</i> LDS 4X sample buffer	Tris HCl 106 mM, Tris Base 141mM, LDS 2% , glicerol 10%, EDTA 0,51mM, SERVA-BlueG250 0,22mM, rojo fenol 0,175 mM, pH 8,5
Tampón del gel concentrador (gel de poliacrilamida)	Tris 0,4 M pH 6,8;SDS 0,4%
Tampón del gel separador (gel de poliacrilamida)	Tris 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4%
Poliacrilamida	Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%
Solución de lavado	TBS 1x, Tween 20 0,05%
Solución de bloqueo	PBS o TBS 1x, leche en polvo 5%
<i>NuPAGE</i> MES SDS Running buffer	MES 50mM, Tris base 50mM, SDS 0,1%, EDTA 1mM, pH 7,3
Tampones de lisis	
Tampón de lisis	Na ₂ PO ₄ 10mM pH7, NaCl 150mM, TritonX-100 1% , glicerol 10%
Tampón de homogenado para actividad PAH	TrisHCl 50mM, pH 7; KCl 100mM; EDTA 1mM; DTT 1mM; leupeptina 1µM; pepstatina 1mM; PMSF 200µM
Tampón de lisis	TrisHCl 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, Triton X100 1% (v/v), SDS 0.1% , EDTA 0,4 mM
Tampón resuspensión para actividad PCC	Tris-HCl 20mM pH8, glutatión 0,025% (p/v)

1.7 Anticuerpos y sondas fluorescentes

60

Tabla 7. Anticuerpos y sondas

Anticuerpos primarios	Proteína/ Epítipo	Especie / descripción	Uso/ Dilución	Referencia	Origen
Anti- β -actin	Actina	Ratón, pAb	WB, 1/5000	A2228	Sigma-Aldrich
Anti- β -actin	Actina	Ratón, mAb	RPPma, 1/5000	A1978	Sigma-Aldrich
Anti-Catalase	Catalasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/5000	c0979	Sigma-Aldrich
Anti- β -F1-ATPase	ATPasa beta1 sub	Ratón, mAb	RPPma, 0,4ug/mL	Acebo et al., 2009	Lab. J.M. Cuezva
Anti-IF1	ATPasa-IF1 sub	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	a21355	Invitrogen
Anti-complex IV	Cox (sub 4)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab14744	Abcam
Anti-complex IV	Cox (sub 2)	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab110258	Abcam
Anti-complex III Sub. Core 2	Citocromo C Oxidoreductasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/1000	MS304	Mitosciences
Anti-GAPDH	GAPDH	Ratón, mAb	RPPma, 1/20000	a21355	Invitrogen
Anti-GAPDH	GAPDH	Ratón, mAb	WB, 1/1000	ab8245	Abcam
Anti-G6PDH	G6PD	Conejo, pAb	RPPma, 1/500	PA1-84814	Thermo Scientific
Anti-glutathione peroxidase I	GPX1	Ratón, pAb	WB, 1/1000	Ab22604	Abcam
Anti- Hsp60	Hsp60 h	Ratón, mAb	WB, 1/1000	SPA-829	Stressgen bioreagent
Anti-Hsp60	Hsp60	Ratón, mAb	RPPma, 0,4ug/mL	Acebo et al., 2009	Lab. J.M. Cuezva
JNK2	JNK2	Conejo, pAb	WB, 1/1000	4672	Cell Signalling
Anti- Phospho-SAPK/ JNK (Thr183/Tyr185)	p-SAPK/JNK	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9251	Cell Signalling
Anti-LDHA	LDH	Ratón, mAb	RPPma, 0,4ug/mL	Formentini et al., 2014	Lab. J.M. Cuezva
Anti-SOD-2	MnSOD	Conejo, pAb	WB, 1/10000	ADI-SOD-110	Enzo Life Sciences
Anti-SOD-2	MnSOD	Conejo, pAb	RPPma, 1/100	ab13533	Abcam
Anti-Ndufs3	NADH deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	ab10246	Abcam
Anti- abPAH- ph8-TYR + TRP + PHE Hydroxylase	PAH	Ratón, mAb	WB, 1/1000	ab21170	Abcam
Anti- phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182),	p-P38	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9211	Cell Signalling
p38 (N-20)	p38	Conejo, pAb	WB, 1/1000	sc-728	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PK-M2	PK	Ratón, mAb	RPPma, 0,4ug/mL	Acebo et al., 2009	Lab. J.M. Cuezva
Anti-complex II Sub.B	SDH-B	Ratón, mAb	RPPma, 1/500	459230	Invitrogen
Anti-HADHA	TFP	Conejo, pAb	RPPma, 1/100	ab54477	Abcam
Anti- α -Tubulin	Tubulina	Ratón, mAb	WB, 1/5000	T9026	Sigma-Aldrich

mAb: Anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal

Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo-Alexa 555	IgG conejo	Cabra	A-31572	Invitrogen
Anti-conejo IgG-HRP	IgG conejo	Cabra	sc-2030	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón-Alexa 555	IgG ratón	Burro	A-31570	Invitrogen
Anti-ratón IgG-HRP	IgG ratón	Cabra	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology
Sondas Fluorescentes				
H ₂ DCFDA (2,7-dichlorodihydrofluorescence diacetate)	Sonda para detectar peróxido	FACS/ 5uM	D399	Invitrogen
DHE(Dihidroetidio)	Sonda para detectar O ₂ ⁻	IF	37291-25mg	Sigma
Mitotracker Red CM-H2Ros	Marcaje Mitocondrias	IF/ 500nM	M-7512	Invitrogen

mAb: Anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal

1.8 Oligonucleótidos

Tabla 8. Oligonucleótidos

Gen	Nombre	# Secuencia 5'-3'	Tm °C	Uso
<i>Atp5b</i>	<i>Mus-Atp5b-L</i>	AAGAGCACGGGTCGTGAG	59	qPCR
<i>Atp5b</i>	<i>Mus-Atp5b-R</i>	TGAGCTCTCGCTTGATATGG	59	qPCR
<i>Arbp</i>	<i>m-ARPB-F</i>	GATGCCAGGGAAGACAG	58	qPCR
<i>Arbp</i>	<i>m-ARBP-R</i>	TCCAAAAGTTGGATGATCTTGA	56	qPCR
<i>Neo</i>	Neo	TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC	79	Genotipado
<i>PAH</i>	PAH-cDNA F	CATGTGCCCTTGTTCAG	55	RT-PCR
<i>PAH</i>	PAH-cDNA R	TTCACAGCTGACAGACCACA	58	
<i>Pah</i>	Pah-mRNA F	CTAGTGCCCTTGTTCAGA	56	RT-PCR
<i>Pah</i>	Pah-mRNA R	AGGATCTACCACTGATGGGT	58	
<i>Pah</i>	HRM Pah1 F	CCTTGGGGAGTCATACCTCA	61	Genotipado
<i>Pah</i>	HRM Pah2 R	CGGTTCAAGGTGTGTACATGG	61	
<i>PCCA</i>	APA2	GTACAGCTTGGGCCCTGGT	62	Secuenciación
<i>PCCA</i>	APA3	AGCTACCTCAACATGGATGC	58	Secuenciación
<i>PCCA</i>	APA5	GAAAGGCATGCGCATTGCTT	58	Secuenciación
<i>PCCA</i>	APA6	TCTTAGAGTCCACAAGGAAC	56	Secuenciación
<i>PCCA</i>	APA9	GCCTCAGTTCTATCAGAGCC	61	Secuenciación
<i>PCCA</i>	K298R F	GAAATCAGAGGGTGGTGGAGGAAGCACC	77	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	K298R R	GGTGCTTCTCCACCACCCTCTGATTC	77	
<i>PCCA</i>	E148G F	GGATTCCTTTAGGAAACAAAGAATTTGCCAG	75	Mutagénesis
<i>PCCA</i>	E148G R	CTGGCAAATCTTTGTTCTGAAAGGAATCC	75	
<i>Pcca</i>	Ex4	AGAACTGGCATCAACATCACTGTG	67	Genotipado
<i>Pcca</i>	IVS2	CTAGAAAGTAAATGTTTACCAGAA	55	
<i>Pcca</i>	UPS	GGCAGCAAAGATGGTCTCAGGC	71	Genotipado
<i>PCCB</i>	209	AACAGGTAGGAGGTGCTTTTAC	63	Secuenciación
<i>PCCB</i>	780	AAGAATAAGTTTCTGGAGACAG	59	Secuenciación
<i>PCCB</i>	781	TACTCCCCAGCCCTAACAGACTT	65	Secuenciación
<i>PCCB</i>	782	TTCTTGGCATAATTGGGCATGATC	62	Secuenciación
<i>PCCB</i>	783	CATGGTGGACATCATACTCTG	63	Secuenciación
<i>PCCB</i>	G188R F	GAATGTTACGGCATCCAGAGTCATCCCTCAGATTC	78	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	G188R R	GAAATCTGAGGGATGACTCTGGATGCCGTAACATTC	78	
<i>PCCB</i>	G255S F	CACACCACCATGTCAAGTGAGAGGCC	77	Mutagénesis
<i>PCCB</i>	G255S R	GGCTCTCACITGACATGGTGGTGTG	77	
<i>PCCB</i>	minigen	CACACCACCATGTCAAGTGAGAGGCC	77	Minigenes
<i>PCCB</i>	minigen	GGCTCTCACCTGACATGGTGGTGTG	77	
<i>pSPL3</i>	SD6 F	CCTCTGAGTCACCTGGACAACC	66	Minigenes
<i>pSPL3</i>	SA2 R	ATCTCAGTGGTATTGTGAGT	55	
<i>rn45s pre 18s</i>	<i>M-18s-F</i>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	61	qPCR
<i>rn45s pre 18s</i>	<i>M-18s-R</i>	CGCTCCACCAACTAAGAACG	61	qPCR
12s-rRNA	<i>M-12S-L</i>	CCTCTTAGGGTTGGTAAATTTTCG	57	qPCR
12s-rRNA	<i>M-12S-R</i>	CGAAGATAATTAGTTGGGTTAATCG	57	qPCR

Oligonucleótidos antisentido (AONs)					
Gen	Nombre	Tipo	# Secuencia 5'-3'	Uso	Origen
<i>PAH</i>	<i>LNA-ex11</i>	LNA	ACCACCTCACCTTAC	<i>Exon skipping</i>	Exiqon
<i>PAH</i>	<i>PMO-ex11</i>	PMO	CACCTTTGTCACCACCTCACCTTAC	<i>Exon skipping</i>	GeneTools
<i>PAH</i>	<i>PMO-ex12a</i>	PMO	GTCCTAAGACCAAACACAGGCT	<i>Exon skipping</i>	GeneTools
<i>PAH</i>	<i>PMO-ex12b</i>	PMO	CGTAAGGTGTAATACTTACTGTT	<i>Exon skipping</i>	GeneTools
<i>Pah</i>	<i>VMO-ex11</i>	VMO	ATCCTCTTTGGTAACCTCACCTCAC	<i>Exon skipping</i>	GeneTools
<i>Pah</i>	<i>VMO-ex12</i>	VMO	AGCAGGTGTGAGCTACTTACTATTA	<i>Exon skipping</i>	GeneTools

El oligonucleótido subrayado representa la localización de la mutación introducida por mutagénesis dirigida.

1.9 Soporte informático y análisis in silico

Tabla 9. Bases de datos y programas útiles

Nombre	Utilidad	Página web
AST (<i>Analyzer Splice Tool</i>)	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	http://ibis.tau.ac.il/ssat/SpliceSiteFrame.htm
BDGP (<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>)	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice
BLAST	Alineamiento de secuencias	http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Brain Atlas	Localización de cortes de distintas partes del cerebro	http://www.bioeng.nus.edu.sg/cfa/brain_atlas.html
Chromas	Procesamiento y análisis de secuencias de DNA	
Ensembl	Consulta de secuencias cDNA y gDNA	http://www.ensembl.org/index.html
Fiji v1.0	Cuantificación fluorescencia	http://fiji.sc/Fiji
Flowjo vx 07	Análisis ensayos citometría	
GenBank NCBI	Consulta de secuencias cDNA y gDNA	http://ncbi.nih.gov
GenEx versión 5.3.7	Análisis de qPCR	
HGMD (<i>Human Gene Mutation Database</i>)	Consulta de mutaciones reportadas	http://www.hgmd.cf.ac.uk
HSFinder v2.4	Predicción de secuencias de reconocimiento de factores de <i>splicing</i>	http://www.umd.be/HSF
Human Genome Variation Society	Nomenclatura de las mutaciones	http://www.hgvs.org
MaxEntScan	Valores de <i>splicing</i>	http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
MED Associates activity monitor	Procesamiento datos comportamiento	
PDB (<i>Protein Data Bank</i>)	Consulta de proteínas	http://www.expasy.org/sprot
Polyphen-2	Efecto funcional de las variaciones nucleotídicas de cambio de aminoácido	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
ProbeFinder version 2.50 for mouse (Roche)	Diseño de oligonucleótidos	http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp
Prophet 5.0	Búsqueda de dianas de restricción	-
Pymol	Modelado de estructuras proteicas	http://www.pymol.org/
Quantity one (BioRad)	Cuantificación de bandas WB y geles de agarosa	Bio Rad
SIFT	Efecto funcional de las variaciones nucleotídicas de cambio de aminoácido	http://sift.bii.a-star.edu.sg
<i>Splicing</i> ESE Finder version 3.0	Predicción de secuencias de reconocimiento de factores de <i>splicing</i>	http://rulai.cshl.edu/tools/ESE
SPSS	Análisis estadístico	http://www-01.ibm.com/software/es/analytics/spss/
Swiss Prot	Consulta de proteínas	http://www.uniprot.org/

2 Métodos

2.1 Técnicas de ácidos nucleicos

65

2.1.1 Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos

El aislamiento de ácidos nucleicos de las distintas muestras utilizadas en este trabajo se realiza siguiendo el protocolo y las recomendaciones de los proveedores de cada uno de los kits de aislamiento empleados. La preparación de las muestras se realiza del siguiente modo:

Los precipitados de células se obtienen tras la tripsinización de las células en cultivo y posterior lavado con PBS. Los órganos de los animales se extraen tras el sacrificio en una cámara con CO₂, y se congelan inmediatamente en N₂ líquido para su posterior homogenización mediante el uso de tornillos estériles congelados.

Para la extracción de gDNA de tejidos de ratón se utiliza un máximo de 10 mg de tejido en polvo congelado a -70°C, se añaden 200 µl de MagnaPure DNA Tissue Lysis buffer y se homogenizan con 10 pases de aguja (21G). En el caso de corazón y músculo, las muestras se incubaron previamente con proteinasa K a 55°C durante toda la noche.

Tabla 10. Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos

Ácido nucleico	Origen de la muestra	Método o kit de aislamiento	Uso
gDNA	Oreja de ratón	<i>DNeasy Blood & Blood & Tissue Kit</i>	Genotipado
gDNA	Cola de ratón	NaOH 50 mM a 95°C y Tris-HCl 1M, pH 8	Genotipado
gDNA	Tejidos de ratón	<i>MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I-Large Volume</i>	qPCR
RNA	Fibroblastos y líneas establecidas	<i>Trizol Reagent</i>	RT-PCR
RNA	Tejidos de ratón	<i>QIAmp RNA blood mini kit</i>	RT-PCR
DNA	Plasmídico	<i>Wizard Plus Miniprep DNA Purification System QIAGEN Plasmid Maxi</i>	Expresión de mutaciones

2.1.2 Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y la pureza de ácidos nucleicos se analiza en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), teniendo en cuenta la relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$. El análisis de los fragmentos de cDNA, DNA plasmídico y gDNA se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente con tampón de electroforesis TAE (**Tabla 6**). Tras la electroforesis, el tamaño de las bandas se analiza con un transiluminador acoplado a una cámara por comparación de las bandas obtenidas con distintos marcadores de peso molecular conocido *DNA Molecular Weight Marker V, II y Ø29* (CBMSO).

2.1.3 Amplificación de gDNA y de cDNA

Amplificación de gDNA: se emplea un protocolo de PCR estándar (Mullis y Faloona, 1987) teniendo en cuenta la longitud del amplicón y la temperatura de *melting* (T_m) o de disociación del par de oligonucleótidos diseñados (**Tabla 8**). Se amplifican entre 250-500 ng de gDNA utilizando la polimerasa *Fast Start* en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Tras la amplificación, los productos de PCR se analizan en un gel de agarosa del % adecuado al tamaño esperado con bromuro de etidio (BrEt) al 4% (v/v).

Amplificación de cDNA: se obtiene cDNA por retrotranscripción (RT-PCR) partiendo de 1,5 μ g de RNA total (extraído de fibroblastos de piel, células establecidas y/o tejidos de ratón) mediante el kit *SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* y oligodT según las recomendaciones del proveedor. Posteriormente se amplifica el cDNA obtenido mediante PCR con oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) y la polimerasa *Fast Start*. Los productos de PCR se separan y se visualizan en un gel de agarosa para determinar su tamaño y/o purificar las bandas para su posterior secuenciación.

2.1.4 Purificación de productos de PCR y secuenciación

Tras la amplificación, los fragmentos de DNA (inferiores a 1 kb) se purifican con *SpinClean PCR Purification Kit*, para su posterior secuenciación. Los fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se purifican utilizando el kit *QIAEX II Gel Extraction*. Los fragmentos de DNA purificados se secuencian mediante el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977). Se emplean 300 ng de DNA para los productos de PCR; 300-500 ng para construcciones plasmídicas; oligonucleótidos específicos a una concentración de 5 μ M (**Tabla 8**) y el kit *BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Los productos obtenidos se resuelven por electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism[®] 3730* de Applied Biosystems.

2.1.5 Genotipado de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y *Pah*^{enu2/+}

Para determinar el genotipo de los ratones hipomorfos *Pcca*^{-/-} (A138T) se corta una pequeña porción de la cola del ratón con un cauterizador y se extrae el gDNA. El fragmento de tejido se digiere en NaOH 50 mM a 95°C a 1.400 revoluciones por minuto (rpm) durante al menos 30 min. La digestión se neutraliza añadiendo un décimo del volumen de la digestión de Tris-HCl 1M, pH 8 y se separan los restos no digeridos mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se utiliza 1 μ L de gDNA (200-400ng) presente en el sobrenadante para realizar la PCR con los oligonucleótidos específicos indicados en la **Tabla 8**. Se realizan dos PCR para el genotipado de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T). Una para detectar la presencia del alelo endógeno *Pcca* con el par de oligos IVS2/Ex4 que hibridan en el intrón 2, y en el exon 4 del gen *Pcca*, respectivamente (generando un fragmento de 340 pb). Y otra PCR para confirmar la inserción del gen de resistencia a neomicina

utilizando los oligos UPS y *neo* que hibridan corriente arriba (*upstream*) de los exones del gen *Pcca* eliminados y en una región del gen de resistencia a neomicina introducido (generando un fragmento de aproximadamente 900 pb).

El genotipado de los ratones C57BL/6 *Pah*^{enu2/+} se realiza a partir de biopsias de oreja de ratón. La purificación del gDNA se realiza con *el kit DNeasy Blood & Tissue* según el protocolo de la casa comercial, incubando el tejido con proteinasa K a 56°C durante toda la noche en agitación. Se realiza una PCR convencional con 2 µL de DNA purificado para amplificar el exon 7 del gen *Pah* utilizando los oligonucleótidos específicos indicados en la **Tabla 8**. La mutación (p.Phe263Ser; c.789T>C) presente en el gen *Pah* de los ratones C57BL/6 *Pah*^{enu2/+} genera un sitio de restricción (G T C T C N) que permite distinguir el alelo *Pah*^{enu2} del alelo *wildtype* mediante una digestión. El DNA amplificado se digiere con la enzima de restricción Alw26I durante toda la noche a 37°C, y el resultado de la digestión se analiza en un gel de agarosa al 4%. Se obtienen los siguientes fragmentos en función del genotipo: PKU- C57BL/6 *Pah*^{enu2/enu2}: 122pb, 58 pb y 34 pb; heterocigoto C57BL/6 *Pah*^{enu2/+}: 122 pb, 92 pb, 58 pb y 34 pb; *wildtype* C57BL/6: 122 pb y 92 pb.

2.1.6 Determinación del número de copias de DNA mitocondrial en muestras de tejido de ratón

La extracción del gDNA de los distintos tejidos de ratón, así como la cuantificación y pureza de las muestras se realiza tal y como se describe anteriormente en los apartados 2.1.1 y 2.1.2, respectivamente. El diseño de los oligonucleótidos se realiza con ProbeFinder versión 2.50 para ratón. Las PCRs cuantitativas (qPCR) fueron llevadas a cabo por el servicio de genómica del CBMSO.

Se emplean volúmenes finales de reacción de 10 µL por pocillo en el equipo BioRad CFX 384, conteniendo 5 ng de gDNA de la muestra en 0,1 µL (excepto en el control NTC (*No Template Control*) en el que se añaden todos los reactivos menos la muestra); 3,9 µL de H₂O (4 µL en NTC) y 1 µL de mezcla del par de oligonucleótidos específicos a 5 µM (**Tabla 8**) y 5 µL de *master mix SsoFast EvaGreen SuperMix* en todos los genes analizados. Se realizan triplicados técnicos para corregir errores de pipeteo en la carga de la placa y se consideran como válidos los valores cuya desviación estándar de los triplicados sea menor de 0,3 Ct. Antes de la cuantificación de DNA se realiza una curva de eficiencia para cada par de oligonucleótidos usando diluciones seriadas de un pool de gDNA de todos los tejidos. El protocolo de amplificación es el siguiente: 30'' a 95 °C + (5'' a 95 °C + 5'' a 60 °C) x 40 + (5'' a 60 °C + 5'' a 95 °C). La adquisición de fluorescencia se realiza en el paso final de la elongación durante la amplificación y a lo largo de toda la rampa de temperatura en el ciclo de disociación o *melting* comprobando que no existen dobles picos. Los datos se estandarizan utilizando varios genes normalizadores de expresión constitutiva (18S y ARBP). El procesamiento de los datos y análisis estadístico se realiza en el software GenEx versión 5.3.7, el cual nos permite la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.1.7 Mutagénesis dirigida

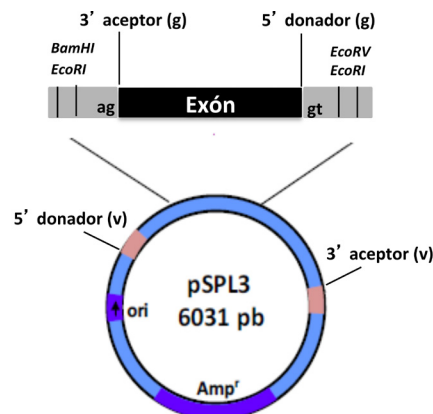
Para obtener las diferentes variantes alélicas de los genes humanos *PCCA* (p.R288G, p.E149G, p.K298R) y *PCCB* (p.G188R, p.G255S) se partió de los plásmidos *wildtype* pRcMVB52 y pCMVA45-12 (**Tabla 4**) que codifican para los cDNAs respectivos. La mutagénesis dirigida se realiza mediante PCR con el kit *Quickchange™ Site Directed Mutagenesis* siguiendo las recomendaciones del proveedor y empleando oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) que incorporan el cambio que deseamos introducir.

2.1.8 Minigenes

Las secuencias de interés a clonar en el vector de *splicing* pSPL3 se amplifican con oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) a partir de gDNA de controles y de los pacientes portadores de los cambios nucleotídicos. Los productos de estas amplificaciones se clonan en el vector *TOPO TA versión 2.1* según las recomendaciones del proveedor. Se transforman bacterias *E. coli XL1 Blue* (**Tabla 8**) y se seleccionan los clones positivos, mediante escisión con el enzima de restricción *EcoRI*. Una vez liberado el fragmento introducido en cada caso se clona en el vector de *splicing* pSPL3 (**Fig.6**) digerido previamente con la misma enzima, utilizando el kit *Rapid DNA ligation*. En algunos casos, el vector pSPL3 digerido se desfosforiló previamente con TSAP (*Thermostable Alkaline Phosphatase*). Finalmente las construcciones normales y mutantes con orientación correcta se seleccionan por secuenciación.

A continuación se transfectan con JetPEi las distintas construcciones en células Hek293 como se describe en el apartado 2.5.2. Se recolectan las células a las 24-48 h, se extrae el RNA con *Trizol reagent* y se llevan a cabo las correspondientes RT-PCR con los oligonucleótidos SA2 y SD6 (**Tabla 8**). Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa y se analiza el perfil transcripcional.

Fig.6 Esquema del vector pSPL3. Se muestran los sitios 3'aceptor y 5'donador de *splicing* de la secuencia genómica de estudio, las dianas de restricción utilizadas en el clonaje, así como el vector (v), el gen de resistencia a ampicilina (Amp^r) y el origen de replicación (ori).



2.2 Técnicas de proteínas

2.2.1 Preparación de homogenados para inmunodetección

Muestras de tejidos de ratón: se parte de 50 mg de tejido en polvo congelado a -70°C que se resuspende en 500 μL de tampón de lisis (**Tabla 6**) a 4°C con inhibidor de proteasas *Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail*. La homogenización se realiza en un homogenizador *Qiagen TissueLyser II*. Se añade una bola de acero de 5 mm a cada una de las muestras, se equilibran cuidadosamente en cada uno de los brazos del homogenizador y se realizan dos rondas consecutivas de agitación a 20Hz de 90 seg de duración cada una. A continuación, se centrifuga el extracto lisado a 4°C y 13.000 x g durante 30 min y se guarda el sobrenadante a -70°C hasta la determinación de la cantidad de proteína.

Muestras de cultivos celulares: se levantan las células Hep3B por tripsinización, se lavan con PBS y se centrifugan durante 5 min a velocidad máxima. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden en tampón de lisis (**Tabla 6**) con el inhibidor de proteasas indicado anteriormente. A continuación, se procede a la ruptura de las células empleando tres ciclos de congelación-descongelación en N_2 líquido - 37°C . Se centrifugan a 1.300 rpm durante 5 min y se conserva el sobrenadante, que corresponde al lisado celular total, en hielo.

Se lavan los fibroblastos con PBS, se coloca la placa en hielo, se añade tampón de lisis (**Tabla 6**) con inhibidor de proteasas (*Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail*) y e inhibidor de fosfatasas (*PhosphoStop*) y se procede a levantar las células con un raspador estéril. La lisis se realiza a 4°C en agitación durante 20 min, posteriormente se centrifuga el lisado a 1.300 rpm durante 10 min y se guarda el sobrenadante en hielo.

2.2.2 Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE

Tras cuantificar la cantidad de proteína de los extractos proteicos mediante la técnica de Bradford se carga en un gel entre 20-50 μg de extracto total. A esta cantidad de extracto se le añade 1 μL de DTT 1 mM y el correspondiente tampón de carga *NuPAGE LDS Sample buffer 4x* (**Tabla 6**) y se hierven las muestras durante 5 min.

La separación electroforética se lleva a cabo en los sistemas *NuPAGE (Invitrogen)*. Cada una de las muestras se carga en geles *NuPAGE Bis-Tris* al 10% o geles *NuPAGE Bis-Tris* de gradiente del 4-12% utilizando como tampón de electroforesis MES (**Tabla 6**). Para determinar los pesos moleculares de las proteínas empleamos como marcadores de peso molecular *ProSieve Protein Marker* o *Novex Sharp Pre-Stained protein Standard*. Los geles se corren a voltaje constante (120V) durante 1.5h - 2h.

2.2.3 Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Tras la electroforesis, los geles se transfieren a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μM con el equipo *Mini Protean III* durante 1 h a 100V o con el sistema iBlot empleando *iBlot Gel transfer Stacks nitrocellulose Regular* durante 7 min a 20V. Se comprueba la eficiencia de la transferencia tiñendo las membranas con Rojo Ponceau y a continuación se lavan con TBS Tween 0,05%. Se bloquean las membranas con solución de bloqueo, leche al 5% en TBS Tween 0,05%, durante 1 hora en agitación y se incuban en solución de bloqueo con el anticuerpo primario correspondiente en agitación. (Ver condiciones para cada uno de los anticuerpos utilizados en **Tabla 7**). Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizan tres lavados de 10 min cada uno con TBS Tween 0,05% y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa (HRP) durante 1 h en agitación. Se lava de nuevo tres veces con el tampón de lavado y se realiza la detección por quimioluminiscencia utilizando ECL y películas de rayos X RP2 PLUS.

En algunos casos se realiza una segunda detección sobre la misma membrana, para ello, se deshibrida la membrana con tampón de deshibridación (**Tabla 6**) durante 20 min a 80°C. A continuación, se bloquea de nuevo con la solución de bloqueo y se procede con la inmunodetección según el protocolo descrito anteriormente.

2.2.4 Detección de proteínas carboniladas en muestras de tejido de ratón

El análisis de la carbonilación de proteínas se realiza utilizando el kit *OxyBlot protein oxidation detection* (Millipore).

Preparación de las muestras de tejido de ratón: los órganos de los animales se extraen tras el sacrificio en una cámara con CO_2 , y se congelan inmediatamente en N_2 líquido para su posterior homogenización mediante el uso de tornillos estériles congelados. Una vez triturados se parte de aproximadamente 20 mg de tejido en polvo congelado a -70°C que se resuspende en 700 μl de buffer de lisis con inhibidor de proteasas (**Tabla 6**) y se procede a la homogenización con TissueLyser. Para ello se añade una bola de acero de 5 mm a cada una de las muestras, se equilibran en cada uno de los brazos del homogenizador y se realizan tres rondas consecutivas de agitación a 20 Hz de 90 seg de duración cada una. A continuación, se centrifuga el extracto lisado a 4°C y 13.000 g durante 30 min y el sobrenadante se conserva a 4°C hasta la cuantificación de proteínas por Bradford. Se emplean 15 μg de proteína y se procede a la derivatización de cada una de las muestras añadiendo 6 μl de SDS al 10% y 8 μl de solución 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) y se incuba durante 15 min, a continuación se añaden 6 μl de buffer de neutralización y 5 μl de tampón de carga (**Tabla 6**) y se procede a cargar toda la muestra en geles *NuPAGE* al 10% según las condiciones de electroforesis descritas en el apartado 2.2.2 y las condiciones de electrotransferencia e inmunodetección descritas en el apartado 2.2.3. El anticuerpo primario se emplea a una dilución 1:150 y el anticuerpo secundario a una dilución 1:300.

2.2.5 Microarray de proteínas de fase reversa (RPPma)

Preparación de las muestras de tejido de ratón: los animales son anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de hidrato cloral y sacrificados por dislocación cervical. Se extraen los órganos (corazón, hígado, músculo y cerebro) y se congelan inmediatamente en N₂ líquido para su posterior homogenización mediante el uso de tornillos estériles congelados en N₂ líquido. Una vez triturada la muestra se resuspende el polvo congelado en tampón de extracción de proteínas (**Tabla 6**) con los inhibidores de proteasas y fosfatasas mencionados anteriormente. Tras la extracción de proteínas, se centrifugan las muestras a 15.000 x g a 4°C durante 30 min y se guarda el sobrenadante. La concentración de proteína se determina por Bradford y a continuación se diluyen las muestras en PBS a una concentración de 0,75 mg/mL antes de la impresión. La impresión, el procesamiento y el revelado de las muestras en el array se llevó a cabo por el grupo de J.M Cuezva (CBMSO, Madrid). Se realiza como se describe en (Aldea et al., 2011) utilizando BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer printer equipado con una punta sólida (MCP310S) a humedad y temperatura constantes. Cada muestra se imprime por duplicado. Para asegurar la calidad de la impresión y la respuesta lineal del reconocimiento de los anticuerpos usados se utiliza una curva creciente de extracto de proteínas de células HCT-116 procedentes de carcinoma de colon (diluido 0-0,8 mg/mL) y otra curva creciente de BSA (1 mg/mL) como control negativo. Thyphoon 9410 scanner nos permite determinar la fluorescencia emitida que será proporcional al número de complejos antígeno-anticuerpo de la muestra. La cuantificación de fluorescencia en cada punto se realiza con el programa Fiji, se emplean unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia con respecto a la curva estándar de proteínas de células HCT-116 y los datos se normalizan con respecto a β -actina en cada tejido.

71

2.3 Determinación de metabolitos

2.3.1 Determinación de los niveles de L-Phe en sangre de ratón

Antes de proceder a la extracción de sangre se retira el alimento a los animales para que ayunen durante un periodo de 4-6 h. Los animales se inmovilizan en un cepo y se colocan durante un tiempo breve bajo una lámpara de luz infrarroja para dilatar las venas laterales de la cola. A continuación, se procede con una cuchilla a realizar una pequeña incisión en un lateral del extremo de la cola para extraer 5 μ L de sangre que se impregna en un papel de filtro especial (tarjeta de Guthrie). La concentración de fenilalanina se determina mediante un análisis de espectrometría de masas en tándem. Este análisis se realiza de manera rutinaria en el servicio de bioquímica del Hospital Infantil de Zúrich (Kinderspital, Zurich).

2.3.2 Determinación de TBARs en muestras de tejido de ratón

Preparación de las muestras de tejido de ratón: se anestesia a los animales con una inyección i.p. de hidrato de coral y una vez dormidos se perfunden transcárdialmente, con aproximadamente 50 mL de suero salino (NaCl 0,9%). Se extraen lo más rápidamente posible los distintos órganos y se congelan inmediatamente en N₂ líquido para su posterior homogenización mediante el uso de tornillos estériles congelados en N₂ líquido. Una vez triturados se parte de aproximadamente 50 mg de tejido en polvo congelado a -70°C que se resuspende en hielo con 1 mL de BHT (Butilhidroxitolueno) diluido en PBS. Se homogeniza cada tejido con 20-30 pases en un *potter* y se centrifuga a 4°C durante 5 min a 1.000 x g. El sobrenadante se guarda a 4°C para utilizarlo en fresco en el ensayo.

La medida de la cantidad de malondialdehído (MDA) en tejido se realiza con el kit *OxiSelect TBARS assay kit*. Se prepara una curva estándar de concentraciones decrecientes mediante diluciones seriadas y se incuba con 100 µL de tampón de lisis con SDS cada una de las muestras, incluidos los estándares, durante 5-10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 250 µL de ácido tiobarbitúrico a cada muestra y se incuba a 95°C durante 40 min. Después se dejan enfriar en hielo durante 5 min y se centrifugan a 3.000 rpm durante 15 min. También se realiza una extracción con n-butanol del sobrenadante obtenido para evitar la interferencia de la hemoglobina y sus derivados. A continuación, se transfieren 150 µL de cada una de las muestras a una placa de 96 pocillos y se procede a la medida de fluorescencia a 540/590 nm (y/o espectrofotométrica a 532 nm) en un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). Dicha medida se normaliza por la cantidad de proteína del homogenado, cuantificada por el método de Bradford. La concentración de MDA se calcula interpolando los valores obtenidos en la curva estándar.

2.4 Ensayos enzimáticos

2.4.3 Actividad propionil-CoA carboxilasa

La determinación de la actividad enzimática se realiza siguiendo el protocolo descrito por (Suormala *et al.*, 1985). Para ello partimos de un precipitado de fibroblastos que se resuspende en un tampón Tris-HCl 20mM pH 8, glutatión 0,025 % (p/v). Para lisar las células y obtener el extracto celular se someten a tres ciclos sucesivos de congelación/descongelación en N₂ líquido-37°C.

Cada ensayo se lleva a cabo en un volumen final de 200 µl, en la siguiente mezcla de reacción: 20 µmoles Tris-HCl pH 8, 0,15 µmoles DTT, 0,628 µmoles Na₂-ATP.3H₂O, 1,2 µmoles MgCl₂.6H₂O, 20 µmoles KCl, 5% (v/v) Tritón X-100, 0,2 µmoles propionil-CoA o 0,2 µmoles 3metilcrotonil-CoA y 8 µmoles NaHCO₃. Se utiliza como isótopo radiactivo NaH [¹⁴C] O₃ con una actividad de 44,8 mCi/mmol.

La reacción enzimática se dispara al añadir 30 μL del extracto proteico celular, se mezcla bien en el vortex y se incuba a 30°C durante 20 min. La reacción enzimática se detiene al añadir 140 μL de TCA 30% (p/v); este ácido junto con una centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min favorece la separación de las proteínas precipitadas. El sobrenadante se transfiere a un vial de centelleo y se somete a evaporación a temperatura ambiente durante un periodo de 24-48 h. Posteriormente es resuspendido en 500 μL de agua miliQ y se añaden a cada vial 5 mL de líquido de centelleo *Optiphase Hisafe 2*, se mezcla bien en el vortex y 24h después se procede a la determinación de cuentas por minuto (cpm) en un contador 1209 *Rackbeta Liquid Scintillation Counter* (Wallac). La actividad específica residual PCC se expresa en unidades de pmoles [^{14}C] O_2 incorporado/min/mg proteína total. La cuantificación de proteínas totales en los extractos proteicos se realiza según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.4.4 Actividad fenilalanina hidroxilasa

La cuantificación de actividad enzimática de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) en extractos totales de hígado/riñón de ratón se realiza mediante un ensayo sensible y cuantificable aplicando Cromatografía Líquida (LC) acoplada a Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray (ESI-MS/MS). Este método nos permite cuantificar la cantidad de tirosina producida a partir de fenilalanina (Heintz *et al.*, 2012b).

Preparación de las muestras de tejido de ratón: se parte de 100 mg de tejido en polvo congelado a -70°C y se lisa en 1 mL de tampón de homogenización para actividad (**Tabla 6**). La homogenización se realiza a 4°C empleando *Qiagen TissueLyser II*. Se añade una bola de acero de 5 mm a cada una de las muestras, se equilibran cuidadosamente en cada uno de los brazos del homogenizador y se realizan dos rondas consecutivas de agitación a 20Hz de 90 seg de duración cada una. A continuación, se centrifuga el extracto lisado a 4°C y 13.000 g durante 30 min y el sobrenadante se conserva a 4°C para la medida en fresco de la actividad enzimática.

Las condiciones del ensayo incluyen una pre-incubación a 25°C con L-Phe (1 mmol/L) durante 4 min, a continuación se añade $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (100 mol/L) y se incuba durante un minuto. Después de los 5 min totales de pre-incubación se añade BH_4 (75 mol/L) para iniciar la reacción. Se usan en el ensayo 2,5 y 5 μL de proteína total del lisado de tejido de ratón. La reacción se lleva a cabo durante 2 min a 25°C y agitación. La cantidad de tirosina L-Tyr producida se determina por ESI-MS/MS. Antes del análisis los aminoácidos son derivatizados a cloroformiato de propilo usando el kit comercial *PhenomenexEZ Faast*. La concentración de proteínas se determina usando *Pyrogallol Red protein dye binding assay*. La actividad específica de la PAH se expresa en nmol L-Tyr producida por min y por mg total de proteína.

2.4.5 Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

La medida de las actividades enzimáticas de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se llevó a cabo por el grupo de Miguel Ángel Martín en el Hospital 12 de Octubre (H12O) de Madrid.

Preparación de las muestras de tejido de ratón: se anestesia a los animales con una inyección i.p. de hidrato de cloral y una vez dormidos se perfunden trans-cardialmente en frío, con aproximadamente 50 mL de suero salino (NaCl 0,9%) para lavar bien los ventrículos del corazón y eliminar los restos de hemoglobina que pueden intervenir con la medida de los complejos. Se extrae el corazón y músculo del cuádriceps de los ratones, se pesan rápidamente los tejidos y se congela en N₂ líquido entre 20-30 mg de cada uno. A continuación, las muestras se llevaron al H12O en nieve carbónica y se mantuvieron a -70°C hasta la realización de los ensayos.

La determinación de la actividad se llevó a cabo según los métodos previamente descritos (Martinez *et al.*, 2001; Smeitink *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005). Los valores obtenidos, tanto para músculo como para corazón, se expresan relativos a la actividad citrato sintasa.

2.5 Cultivos celulares

2.5.1 Mantenimiento de los cultivos

Los cultivos primarios de fibroblastos procedentes de biopsia de piel, así como células establecidas de Hepatoma (Hep3B) y HEK293T se cultivan en botellas de 25 o 75 cm² o placas estandarizadas de 6 pocillos P6 (35mm). Las células se cultivan a 37°C en una atmósfera de humedad relativa del 95% y 5% CO₂, utilizando como medio de cultivo Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal (FBS) al 5 o 10% (v/v), penicilina 100U/mL y estreptomycin 100 µg/mL. Las células son recogidas con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% y sedimentadas mediante centrifugación. Las líneas celulares se conservan congeladas en suero fetal con DMSO al 5% en N₂ líquido. En todos los ensayos salvo en los que los fibroblastos requieren un tratamiento diferente al descrito previamente, las células se encuentran antes de realizar el experimento entre el 70-80% de confluencia.

2.5.2 Transfección

Según los experimentos, se ha utilizado como reactivo de transfección JetPEI o lipofectamina LTX. Las células se siembran el día anterior en placas de P6 (35 mm) a 3,5 x 10⁵ células por pocillo en 2 mL de MEM completo suplementado con FBS al 10%, glutamina y antibióticos. Al día siguiente, las células deben estar a una confluencia del 70-80% aproximadamente.

El protocolo de transfección comienza con la preparación de las mezclas de DNA y JetPEI, donde las cantidades necesarias vienen determinadas en función de la relación N/P (número de residuos de nitrógeno de JetPEI por fosfato de DNA). La entrada eficiente en la célula requiere partículas cargadas positivamente por lo cual empleamos una relación N/P=5, y se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

Se siembran 4×10^5 células (5626T o 14046T) por pocillo de P6 (35 mm), con 2 mL de medio MEM con FBS al 10% suplementado con glutamina y antibióticos. Al día siguiente se procede con la transfección, de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Se mezclan 2 μ g de DNA en 500 μ L de optiMEM con 10 μ L LTX, se incuba durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añade sobre las células sin medio y a continuación se añaden 3 mL de MEM con FBS al 10% suplementado con glutamina y sin antibióticos. Se mantiene la placa durante 6h a 37°C y transcurrido este tiempo se cambia el medio a MEM con FBS al 10% suplementado con glutamina y antibióticos. 72 h después de la transfección se recogen las células para su análisis posterior.

Transfección de AONs tipo PMO y LNA

Para ello se siembran 4×10^5 células de Hek293 por pocillo en placas P6. Al día siguiente se transfectan los PMOs específicos (**Tabla 8**) a distintas concentraciones finales entre 2,5-20 μ M empleando *endoporter* a una concentración final de 6 μ M.

- Se cambia el medio por 1 mL de MEM con FBS al 5% suplementado con glutamina y antibióticos a cada uno de los pocillos.
- Se añade el PMO directamente a cada pocillo y se mueve ligeramente la placa para favorecer la mezcla.
- Se añaden 6 μ L de endoporter a cada pocillo y se mueve rápidamente la placa para que se mezcle bien.
- Entre 48 y 72h después se procede a levantar las células para su posterior análisis.

Para los oligonucleótidos de tipo LNA (*Locked Nucleic Acid*) se emplea Lipofectamina 2000. Se siembran 2.5×10^5 células de Hep3B por pocillo en placas P6.

- Se diluye la cantidad necesaria de Lipofectamina 2000 en 50 μ L de OptiMEM, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se diluye el LNA en 50 μ L de OptiMEM, se mezcla bien y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Se añade la mezcla de LNA sobre la mezcla de lipofectamina, se mezcla bien y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.
- Se añade medio fresco a las células y se añade la mezcla de transfección a cada pocillo.
- Entre 48 y 72h después se procede a recoger las células para su posterior análisis.

En otros casos, los AONs de tipo LNA se transfectaron con dendrímeros carbosilanos catiónicos. Se obtuvieron gracias a la colaboración establecida con el grupo de Rafael Gómez (Biodendrímeros de Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá). En este trabajo se emplearon los dendrímeros 2G-NN16 y BDBRo11.

Se siembran $2,5 \times 10^5$ células de Hep3B por pocillo en placas P6. Se transfectan en presencia de dendrímero y oligo, en un volumen final de 1 mL de OptiMEM.

Mezcla de transfección:

- Mezcla O: Oligo (30 μ M) + optiMEM
- Mezcla D: Dendrímero (según ratio, 2:1, 4:1 y 8:1) + optiMEM

Se adiciona la mezcla D sobre la mezcla O y se incuba 20 min a temperatura ambiente. Se retira el medio a las células, se lavan con PBS, se añaden 600 μ L de optiMEM y la mezcla D+O. Se incuban durante 4-8 h a 37°C en atmosfera de CO₂, se retira el medio, se lavan con PBS y se añade MEM completo suplementado con FBS al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Entre 24 y 48h después se procede a levantar las células, lavarlas, precipitarlas y a extraer el RNA y proteína para estudiar el perfil transcripcional por RT-PCR y la presencia o ausencia de proteína por western blot.

2.5.3 Detección de apoptosis temprana por citometría de flujo

La detección de apoptosis se realiza con el kit comercial *Annexin V- DY634 Apoptosis Detection Kit* que contiene Anexina V marcada con DY634 (rojo fluorescente). Se siembran 60.000 células por pocillo de P6 (35 mm). Al día siguiente se lavan las células con PBS, se levantan y se centrifugan 5 min a 1.400 rpm. Cada precipitado de células se resuspende en 2,5 μ L de Anexina V y 100 μ L de *binding buffer* y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añaden 100 μ L de *binding buffer* y 2,5 μ L de Ioduro de propidio (IP) y se pasan rápidamente por un sistema de citometría de flujo FACs Calibur (BDBioscience) con software Cell Quest. Se usan como controles de compensación: un control positivo para Anexina V, al cual se añade estaurosporina 5 μ M (1h), un control positivo para IP, al cual se le añade NaCl 4M y además un control sin tratar para detectar la autofluorescencia basal de las células. Los resultados se expresan como una razón de la fluorescencia de la sonda Anexina V de cada muestra con respecto al control. Los datos se procesan con el programa Flowjo (Tree Star, Inc).

2.5.4 Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular por citometría de flujo

Se siembran 200.000 células por pocillo de P6 (35 mm). Se lavan con PBS, se levantan con tripsina, y se centrifugan a 1.400 rpm durante 5 min. A continuación, se incuban con la sonda H₂DCFDA 5 μ M a 37°C durante 30 min en oscuridad. Tras dicho tiempo se añade 1 mL de PBS a cada muestra, se centrifuga otros 5 min a 1.400 rpm y el precipitado de células se resuspende en 200 μ L

de una solución de PBS con IP al 0,05% (v/v). A continuación se pasan las células por un citómetro de flujo FACSCalibur con software Cell Quest. Se usan como controles de compensación: un control positivo para DCF, al cual se le añade H_2O_2 (100 μ M concentración final), un control positivo para IP, al cual se le añade NaCl 4M y además un control para detectar la autofluorescencia basal de los fibroblastos. Cada muestra se mide por triplicado y se detectan al menos 10.000 eventos celulares por muestra. Los datos se procesan con el programa Flowjo. Los resultados se expresan como el incremento de la fluorescencia de cada muestra con respecto al control y como el porcentaje de fluorescencia con respecto a cada uno de las muestras sin tratamiento.

2.5.5 Marcaje de la red mitocondrial

Se colocan cubres redondos de 10 mm sobre cada uno de los pocillos de una placa P24 donde se siembran 1×10^5 células por pocillo, con 1 mL de medio MEM con FBS al 10% suplementado con glutamina y antibióticos. Al día siguiente se lavan las células con PBS y se incuban con Mitotracker en medio fresco a una concentración final de 500 nM durante 40 min, a 37°C y en oscuridad. Se lavan con PBS y se fijan las células añadiendo lentamente por la pared 0,5 mL por pocillo de formalina al 10% durante 20 min. Se lavan tres veces con PBS y se incuban con DAPI diluido 1/1.000 durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavan tres veces con PBS y con una pinza se levantan los cubres y se montan boca abajo sobre un porta objetos en el cual previamente hemos colocado 4 μ L por cubre de medio de montaje (*prolong gold antifade*). Se deja secar hasta el día siguiente y se analizan los resultados en un microscopio Anxiovert200 invertido (Zeiss, Jena Germany) empleando un objetivo 63x y los filtros DsRed y DAPI.

2.6 Técnicas histológicas, microscopía óptica y confocal

2.6.1 Preparación de muestras de tejido de ratón para histología

Se anestesia a los animales con una inyección i.p. de hidrato de cloral y una vez dormidos se perfunden transcárdialmente, lavando primero con aproximadamente 50 mL de suero salino (NaCl 0,9%) y, a continuación, se fija con 50 mL de formalina al 10%. Se extrae el corazón y el cerebro y se mantienen en PBS a 4°C. Se lava bien cada uno de los órganos con PBS y se dejan fijando en formalina al 10% durante 24h a temperatura ambiente o 48 h a 4°C. Las muestras son procesadas en el servicio de histología del CNB según el siguiente protocolo:

Procesamiento para cortes en OCT (componente de Temperatura de Corte Óptima): tras la fijación se lavan los órganos tres veces en PBS durante 15 min y se dejan en sacarosa 30 % durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente se incluyen en bloques de OCT (Tissue-Tek 4583 sakura), que se tallan y se cortan en secciones en un criostato CM 1900 (Leica). Se realizan cortes de

corazón en longitudinal y cortes de cerebro en coronal ambos de 20 μm de grosor. Las secciones se hicieron seriadas, formando series que contienen 1 corte cada aproximadamente 5 μm y se recogen directamente del criostato por adherencia al porta objetos *Superfrost ultra plus* y se congelan a -70°C .

Procesamiento para cortes en parafina: tras la fijación las muestras se lavan dos veces en PBS y se introducen en el procesador automático de tejidos para deshidratar, aclarar e incluir las muestras. Dicho procesador realiza un ciclo de 22h consistente en: 2h en etanol al 70%, 2h en etanol al 80%, 2h en etanol al 96%, otras 2h en etanol al 96%, 2h en etanol al 100%, otras 2h en etanol al 100%, 2h en mezcla 50% de etanol 100% y 50% de xilol, 2h en xilol, otras 2h en xilol, 2h en parafina líquida y otras 2h en parafina líquida. Dejamos enfriar la parafina líquida a -5°C para formar el bloque. A continuación, se corta el bloque en un criotomo RM 2115 (Leica). Los cortes de corazón se realizan en longitudinal y los cortes de cerebro en coronal, ambos de 5 μm de grosor. Se estiran los cortes en un baño de agua a 40°C y se monta en un porta objetos *Superfrost ultra plus*. Tras montarlos se dejan secando en un horno seco a $37-40^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

2.6.2 Detección de especies superóxido en tejidos de ratón con DHE

Se emplean cortes criopreservados en OCT de muestras de 20 μm de grosor, obtenidos como se ha indicado previamente en el apartado de preparación de muestras histológicas. Las muestras se descongelan entre 2-3 h a temperatura ambiente antes de su uso. Se elimina la autofluorescencia incubando las muestras con NH_4CL 50 mM durante 10 min. Se lava 15 min con PBS y se incuba con la solución de bloqueo (**Tabla 6**) durante al menos 30 min para bloquear la autofluorescencia de los grupos aldehído. Se lava con PBS 5 min y se incuba con DAPI (1/1.000) durante toda la noche en agitación suave. Al día siguiente se lava con PBS tres veces durante 15 min y se incuba con DHE 10 μM durante 45 min a 37°C en una cámara humidificada y protegida de la luz. Se lava tres veces con PBS durante 15 min, se incuba la muestra durante 5 min con etanol al 70% y se cubren los cortes con un análogo de Sudan-Black (*autofluoresce eliminator reagent*) durante 5 min para disminuir la autofluorescencia. Se lava 3 veces con etanol al 70%, se monta la preparación con 4 μL de *prolong gold antifade* por corte y se deja secar durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se observan las muestras en un microscopio de barrido laser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) con software ZEN 2010. Se toman al menos diez fotos por corte con un objetivo de 40x. Se analizan al menos 4-6 cortes por muestra. Se calcula la media de la intensidad de fluorescencia con el programa Fiji (N.I.H, USA).

2.6.3 Detección de apoptosis tardía en tejidos de ratón mediante TUNEL

Se emplean cortes en parafina de corazón y cerebro de muestras de 5 μm de grosor, obtenidos, como se ha indicado previamente en el apartado de preparación de muestras histológicas (2.6.1). El ensayo se realiza con el kit DNA *fragmentation/ Fluorescence staining*. Se someten los cortes a un proceso de desparafinización que consiste en: lavar 3 veces con xileno, 2 veces con etanol al 100%, una vez con etanol al 90%, una vez con etanol al 80% y dos veces en agua destilada. Cada lavado de 3 min de duración. A continuación, se lava el portaobjetos con PBS durante 30 min a 37°C y se procede según las especificaciones con el protocolo del proveedor. Las fotos se toman en un microscopio de barrido laser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager M2 (Zeiss) con software ZEN 2010un. Se toman fotos con un objetivo de 40x. Se analizan al menos 2 cortes por muestra. Se calcula la media de la intensidad de fluorescencia de cada célula con el programa Fiji (N.I.H, USA).

2.7 Técnicas con ratones

2.7.1 Generación de ratones diabéticos con estreptozotocina

Los ratones diabéticos fueron empleados como controles positivos para la detección de superóxido (Arora *et al.*, 2009). Se emplean animales *wildtype* C57Bl/6 adultos a los cuales se les retira la comida 4 h antes del tratamiento. Se realiza una única inyección i.p de 180 mg/kg de estreptozotocina (STZ) y se extrae sangre de la cola del ratón a la semana para medir la cantidad de glucosa utilizando tiras reactivas de *accutrend glucose* con el glucómetro accutrend Plus system.

2.7.2 Tratamiento *in vivo* con Vivomorpholinos (VMO)

Para el estudio de la eficiencia de AON *in vivo* se emplearon ratones machos y hembras de 4 a 12 semanas de edad. Antes de cada inyección se examina brevemente al animal y se les duerme utilizando un equipo de anestesia con isoflurano. Mientras el animal se va quedando dormido se coloca una lámpara de luz infrarroja para favorecer la dilatación de las venas laterales de la cola. Una vez dormido se coloca en un cepo junto con una mascarilla de anestesia adaptada al hocico. Se realizan inyecciones intravenosa (i.v.) e i.p. con distintas cantidades de VMO, desde 6 a 50 mg/kg. Después de cada inyección se despierta al animal manteniendo el calor corporal con la lámpara de luz infrarroja y se le monitoriza durante 20-30 min.

2.7.3 Tests de comportamiento

Test de campo abierto

80

Este test de locomoción global nos informa de manera general de cualquier posible alteración en la capacidad motora y/o exploratoria de los animales. Para evitar que cualquier factor externo modifique la capacidad exploratoria de los animales no se realiza ningún cambio de cubeta 24 h antes del experimento. Las cubetas se trasladan a la sala de comportamiento para su aclimatación al menos una hora antes de realizar el experimento y se trata con delicadeza a cada uno de los animales para evitar estresarlos. El test se lleva a cabo en cajas cuadradas de dimensiones 29 x 29 cm donde se coloca al ratón en el centro y se le deja mover libremente durante 30 min. Estas cajas se encuentran monitorizadas, para recoger cualquier movimiento del ratón, con 16 fotocélulas para medir actividad horizontal y 8 fotocélulas para medir actividad vertical (Med Associates, Inc). Tras dicho tiempo se hace un recuento del número de defecaciones y orinas de cada animal y se devuelve cada uno a su correspondiente cubeta. Los niveles de actividad son grabados y analizados utilizando *MED Associates' Activity Monitor* y *MED Associates' activity Monitor Data Analysis software*. Dicho software informático nos da información acerca de numerosos parámetros relacionados con la actividad locomotora, exploratoria y la ansiedad del animal, como por ejemplo la distancia recorrida, velocidad total, número de saltos, tiempo de descanso, estereotipias, etc.

Rota-rod

La actividad motora se mide utilizando un *accelerating rota-rod apparatus* (Ugo Basile, Comerio, Italy). Antes de llevar a cabo las pruebas, cada ratón es entrenado durante los dos días previos. El primer día de entrenamiento consiste en 4 sesiones de 1 min a velocidad fija de 4 rpm con intervalos de 30 min entre la primera y segunda sesión, 1 h entre la segunda y la tercera sesión y 30 min entre la tercera y la cuarta sesión. El segundo día de entrenamiento se aumenta el tiempo a 2 min: el primer min a 4 rpm seguido de 1 min a 8 rpm manteniendo los mismos intervalos de tiempo que el primer día entre sesiones. Una vez realizados los entrenamientos, el tercer día se procede a la realización de las pruebas, que se desarrollan durante 5 min con una aceleración progresiva de 4 a 40 r.p.m. En los ensayos de aceleración se mide la latencia en caer de cada ratón.

2.8 Análisis estadístico

Los p-valores del análisis estadístico de los resultados se estimaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) de un factor con la corrección *posthoc* de *Bonferroni* y t-test *stu=dent*. Se utilizó el *software* SPSS. Cada valor representa la media y desviación estándar de al menos 2 o 3 conjuntos de datos. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

Resultados

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NOVEL GENOTYPES AND CELLULAR OXIDATIVE STRESS STUDIES IN PROPIONIC ACIDEMIA

Propionic acidemia (PA), caused by a deficiency of the mitochondrial biotin dependent enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC) is one of the most frequent organic acidurias in humans. PA is caused by mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes encoding the α - and β -subunits of the PCC enzyme, which is assembled as a $\alpha_6\beta_6$ dodecamer. In this study, we have investigated the molecular basis of the defect in ten PA patients-derived fibroblasts. Using homology modeling with the recently solved crystal structure of the PCC holoenzyme and an eukaryotic expression system we have analyzed the structural and functional effect of novel point mutations in *PCCA* (p.E148G, p.K298R and p.R288G) and *PCCB* gene (p.G188R and p.G255S), also revealing a novel splice defect by minigene analysis. In addition, we have investigated the contribution of oxidative stress to cellular damage measuring intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and apoptosis parameters in patient fibroblasts, as recent studies point to a secondary mitochondrial dysfunction as a pathophysiological mechanism in this disorder. The results showed an increase in intracellular ROS content compared to controls, correlating with the activation of the JNK and p38 signaling pathways. Highest ROS levels were presented in cells harboring functionally null mutations, including one severe missense mutation. Altered mitochondrial morphology was also observed in some patients' fibroblasts that showed high intracellular ROS levels. In addition, we have also analyzed the capability of different antioxidants to scavenge ROS production in PA patients' cells. *Tiron*, trolox, resveratrol and MitoQ significantly reduced ROS content in patients and controls' fibroblasts. Changes in the levels of two antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD2) and glutathione peroxidase (GPx1), were observed in PA patients-derived fibroblasts after *tiron* and resveratrol treatment. Our results in PA cellular models provide a molecular insight into the pathogenicity of molecular variants and indicate that oxidative stress may be an important contributing factor to the cellular damage. Successful reduction of ROS production *in vitro* provides a proof of concept for the potential use of antioxidants as an adjuvant therapy for PA and paves the way for future assessment of antioxidant strategies in the murine model of PA.



1 Caracterización funcional de nuevos genotipos, estudios de estrés oxidativo y terapia *in vitro* con antioxidantes en acidemia propiónica

85

En esta primera parte del trabajo se ha analizado una cohorte de 10 pacientes con acidemia propiónica genotipados en el laboratorio (8 *PCCA* y 2 *PCCB*) (**Tabla 11**). El genotipado del paciente P1 reveló que era portador en homocigosis de la mutación c.923dupT, detectada sólo en uno de los progenitores. Para confirmar los resultados previamente obtenidos en el laboratorio y consistentes con una disomía uniparental (UPD) se llevó a cabo un análisis de microsatélites.

Dentro de las variantes alélicas identificadas en estos pacientes las mutaciones *missense* son los cambios más comunes y dado que su efecto funcional es a priori desconocido, se ha indagado en los mecanismos moleculares subyacentes a este tipo de cambios. Se han estudiado 3 mutaciones *missense* identificadas en el gen *PCCA*, c.443A>G (p.E148G); c.893A>G (p.K298R); c.862A>G (p.R288G) y dos mutaciones *missense* identificadas en el gen *PCCB*, c.562G>A (p.G188R) y c.763G>A (p.G255S), siendo las tres últimas mutaciones nuevas descritas por primera vez en este trabajo. Para ello se ha caracterizado el efecto estructural y funcional de estas mutaciones mediante su localización en un modelo por homología del holoenzima PCC humana, el análisis *in silico* con programas de predicción bioinformáticos y el análisis funcional *in vitro* en un sistema de expresión eucariota. Asimismo, también se ha analizado el efecto sobre el *splicing* de la variante c.763G>A mediante análisis *in silico* y la utilización de un sistema de minigenes.

Además se ha investigado la contribución del estrés oxidativo al daño celular y a la posible disfunción mitocondrial secundaria descrita en la literatura, midiendo los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), analizando el porcentaje de células apoptóticas, la activación de vías implicadas en la mediación de respuesta a estrés (SAPK) y posibles cambios en la morfología mitocondrial de los fibroblastos de los pacientes. Por último, se ha analizado la capacidad de cinco compuestos antioxidantes para neutralizar los niveles elevados de ROS observados en los fibroblastos de estos pacientes y para alterar los niveles de enzimas antioxidantes.

Tabla 11 Pacientes PCCA y PCCB

Paciente	Gen	Variante 1	Variante 2	Edad de diagnóstico / Evolución clínica	Referencia
P1	PCCA	c.923dupT (p.L308fs)	c.923dupT (p.L308fs)	Neonatal /problemas de lenguaje con 13 años	(Perez, 2012)
P2	PCCA	c.1209+3A>G (p.V356_E403del48)	c.1209+3A>G (p.V356_E403del48)	n.d. /vivo con 2,5 años	(Desviat, 2006)
P3	PCCA	c.184-618del4779 (p.T62_S100del39)	c.184-618del4779 (p.T62_S100del39)	n.d.	(Desviat, 2009)
P4	PCCA	c.2041-2924del3889 (p.V681_A706del26)	c.2041-2924del3889 (p.V681_A706del26)	1 mes / retraso en el desarrollo, Rbdomiosarcoma a los 3,5 años	(Desviat, 2009; Martin Hernandez, 2012)
P5	PCCA	c.862A>G (p.R288G)	c.862A>G (p.R288G)	4 meses / suave retraso en el desarrollo con 3 años	(En este trabajo)
P6	PCCA	c.443A>G (p.E148G)	c.443A>G (p.E148G)	Neonatal / vivo con 8 meses	(Kraus, 2011)
P7	PCCA	c.893A>G (p.K298R)	c.1066-?_1845+?del (p.V356_Q615del260)	Neonatal /n.d	(Desviat, 2009)
P8	PCCA	c.1891C>G (p.G631R)	c.1891C>G (p.G631R)	Neonatal / desenlace mortal	(Perez, 2003)
P9	PCCB	c.562G>A (p.G188R)	c.1606A>G (p.N536D)	15 años / estado epiléptico y cardiomiopatía dilatada. Trasplante de corazón.	(En este trabajo)
				Asintomático hasta los 15 años	
P10	PCCB	c.763G>A (p.G255S)	c.1534C>T (p.R512C)	14 meses / suave retraso en el desarrollo con 9 años. Pubertad precoz	(En este trabajo)

n.d = no hay datos

1.1 Análisis de microsatélites para confirmar una disomía uniparental en un paciente con AP

Como parte de la rutina en el diagnóstico genético, tras la confirmación de una variante alélica en el caso índice, se procedió al análisis de la presencia de dicha variante en los padres. El genotipado del paciente P1 reveló que era portador en homocigosis de la mutación c.923dupT (p.L308fs), sin embargo el análisis genético de los padres mostró que sólo uno de ellos era portador de la mutación. En el laboratorio, se utilizó la técnica MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) y un array de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), los resultados descartaron la existencia de una gran deleción que explicase estos resultados y mostró la existencia de una región de pérdida de heterocigosidad sin variación en la dosis génica en el cromosoma que alberga el gen *PCCA*, interpretable con una disomía uniparental parcial. Para confirmar los resultados previos obtenidos en el array de SNP se llevó a cabo un análisis por microsatélites. Los resultados del análisis por microsatélites a lo largo del cromosoma 13q mostraron un patrón biparental de segregación normal hasta el marcador D13S158 (**Fig.7**) para el cual el paciente no compartió ningún alelo con su padre, mostrando un genotipo homocigoto. Este hecho indicó la existencia de una isodisomía materna que fue consistente con los resultados obtenidos previamente en el array de SNP y con la herencia discordante de la mutación.

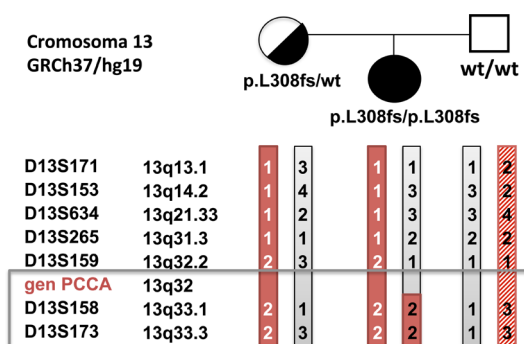


Fig.7 Pedigrí del caso P1. El esquema muestra los alelos de un conjunto de microsatélites a lo largo del cromosoma 13q. Estos están representados por números, el 1 corresponde al alelo de menor tamaño. El recuadro resalta el fenotipo homocigoto del paciente.

1.2 Análisis de mutaciones *missense* en los genes *PCCA* y *PCCB*

Para evaluar los efectos estructurales de las mutaciones *missense* se localizaron los residuos mutados en el hetero-tetrámero de la holoenzima PCC humana modelado por el servicio de bioinformática del CBMSO a partir de la holoenzima de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso PDB 3n6r) (Huang et al., 2010), la subunidad α análoga de *S.aureus* unida al ATP (código de acceso PDB 2vpq) (Mochalkin et al., 2008) y la biotina y el bicarbonato unidos al sitio activo del dominio biotina carboxilasa (BC) incorporados de la estructura de *E. coli* (código de acceso PDB 3g8c) (Chou et al.,

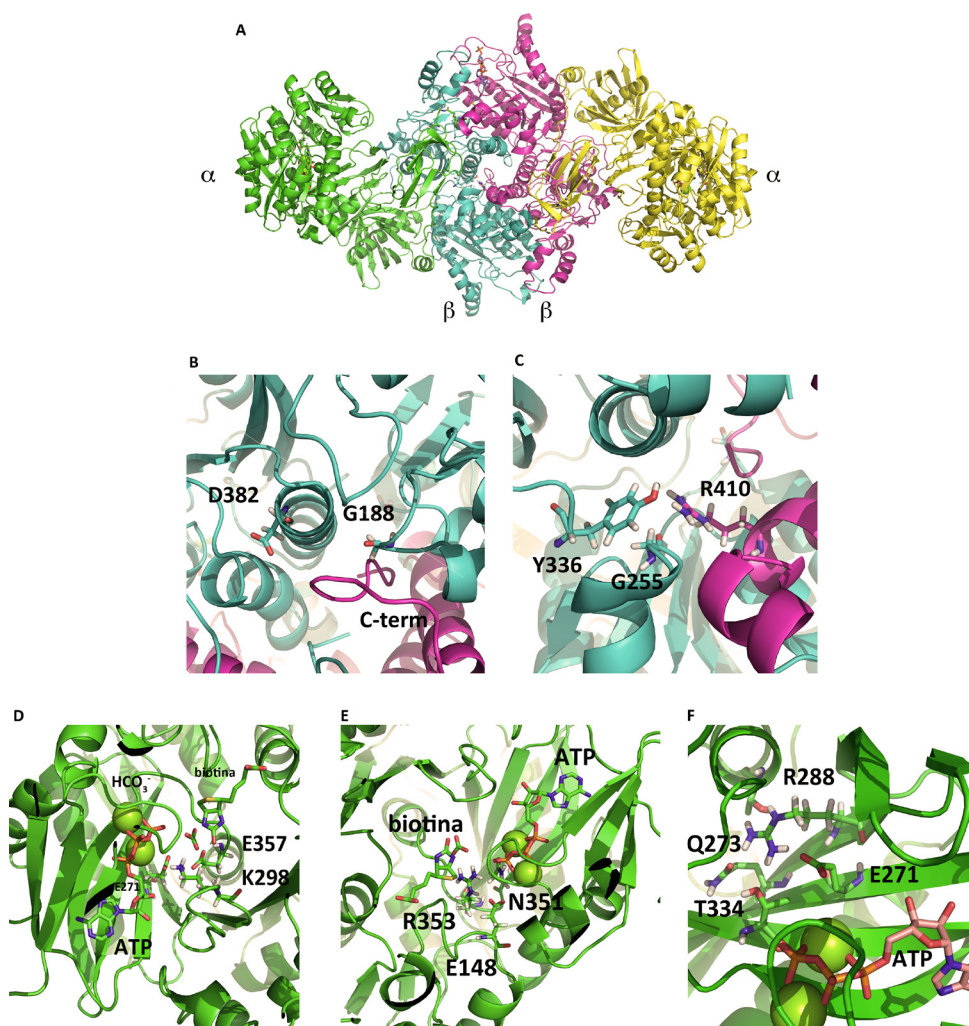


Fig.8 Localización de mutaciones *missense* causantes de enfermedad identificadas en los genes *PCCA* y *PCCB*. A) Representación del hetero-tetramero $2\alpha 2\beta$ de la enzima PCC humana modelado a partir del holoenzima de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso PDB 3n6r), la subunidad α de *S.aureus* unida al ATP (código de acceso PDB 2vpq) y la unión de biotina y el bicarbonato al sitio activo del dominio biotina carboxilasa de *E. coli* (código de acceso PDB 3g8c). B-F) Localización de los aminoácidos afectados por mutaciones *missense*: B) Gly 188, C) Gly 255, D) Lys 298, E) Glu 148, F) Arg 288. Las subunidades α están representadas en color amarillo ($\alpha 1$) y verde ($\alpha 2$) y las subunidades β en azul ($\beta 1$) y rosa ($\beta 2$). Los residuos afectados por mutaciones *missense* y todos aquellos que interaccionan con ellos están resaltados como palos (*sticks*) según el siguiente código de colores por átomo: hidrógeno, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; fósforo, naranja; azufre, amarillo; carbono, en el mismo color que la cadena polipeptídica donde se localiza. Los átomos de magnesio están representados como esferas verdes. Se empleó pyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.

2009). Además se añadió la estructura del acetyl-CoA (sustituto del sustrato original propionil-CoA) (Fig.8 A-C).

Los residuos E148, K298 y R288 se localizan en la subunidad α cerca del centro activo. El residuo E148 está próximo al sitio de unión del ATP, entre $\beta 4$ y αG (Huang et al., 2010) (Fig.8). E148 participa en la coordinación del magnesio quelado con los grupos β y γ fosfato del ATP y forma un enlace de hidrógeno con la asparagina N351 y un puente salino con la arginina R353, residuos que a su vez forman enlaces de hidrógeno con el fosfato γ del ATP, los cuales permiten el correcto posicionamiento del ATP para la catálisis (Fig.8 E). El residuo K298 se localiza en el bucle anterior a

β 14 en la subunidad α , e interacciona con el ATP, la glutamina E271 (localizada en β 12) y la glutamina catalítica E357 (localizada en el bucle antes de la hélice α N) (**Fig.8 E**). El residuo R288 se localiza en la lámina β donde se encuentran los residuos de T334 y Q273 con los que forma enlaces de hidrógeno a través de su cadena lateral, contribuyendo fuertemente a la estabilidad de la lámina. También interacciona con E271, lo cual contribuye al posicionamiento de la hélice α (**Fig.8 F**). El residuo G188 se localiza en la unión β - β en el dominio amino de la subunidad β , justo en el bucle que conecta α 4 con β 8 (**Fig.8 B**). El residuo G255 se localiza también en la unión β - β del bucle situado entre α 7 y β 12, en el dominio amino de la subunidad β (**Fig.8 C**).

Con la finalidad de conocer mejor el efecto de las mutaciones *missense* estudiadas, se realizó un estudio *in silico* de la patogenicidad de las mismas utilizando distintos programas de predicción: Polyphen-2, SIFT y MutPred. Estos programas predicen el impacto del cambio de un aminoácido en la estructura y función de la proteína humana basándose en la pérdida o ganancia de distintas propiedades funcionales y estructurales de la proteína *wildtype* y mutante y la conservación del residuo afectado. Los resultados mostrados en la **Tabla 12** indican que las 5 mutaciones se predicen como patogénicas, con la excepción del cambio p.G255S el cual se predice patogénico por Polyphen pero benigno por SIFT.

Tabla 12. Análisis *in silico* e *in vitro* del efecto funcional de mutaciones *missense* en los genes *PCCA* y *PCCB*.

Gen	Mutación <i>missense</i>	PolyPhen-2 (score) ^a	SIFT (score) ^b	MutPred (score) ^c	Actividad PCC residual ^d
<i>PCCA</i>	p.E148G	Patogénica (1.0)	Patogénica (0.0)	0.96	2 ± 2%
<i>PCCA</i>	p.R288G	Patogénica (1.0)	Patogénica (0.0)	0.95	3 ± 0%
<i>PCCA</i>	p.K298R	Patogénica (1.0)	Patogénica (0.0)	0.74	1.6 ± 0,2%
<i>PCCB</i>	p.G188R	Patogénica (1.0)	Patogénica (0.0)	0.89	13.3 ± 5.3%
<i>PCCB</i>	p.G255S	Patogénica (1.0)	Tolerada (0.09)	0.89	63.8 ± 0,5%

^aPolyPhen-2: (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) rango de score de benigno (0) a patogénico (1) ^bSIFT: (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.) rango de score de patogénico (0) a benigno (1) ^cMutPred: (<http://mutpred.mutdb.org/>) la probabilidad de que la mutación sea patogénica es factible (score>0.5; p<0.05), confiable (score>0.75; p<0.05), muy confiable (score>0.75; p<0.01) ^d con respecto a la actividad *wildtype*.

Finalmente, se analizó la actividad residual de la proteína PCC con las mutaciones *missense* en un sistema de expresión eucariota. Se emplearon líneas celulares inmortalizadas deficientes en *PCCA* (5626T) y en *PCCB* (14046T) transfectadas con vectores de expresión eucariota portadores del cDNA *PCCA* y *PCCB wildtype* y/o sus variantes p.E148G, p.K289R, p.R288G y p.G255S y se procedió a determinar la actividad enzimática PCC de cada uno de los mutantes con respecto al *wildtype*. Los resultados de la **Tabla 12** muestran una actividad residual inferior al 3% de los mutantes p.E148G, p.K289R, p.R288G en el gen *PCCA* y p.G188R en el gen *PCCB* lo cual demuestra su naturaleza patogénica. Sin embargo la mutación p.G255S presentó una actividad residual alta (63,8%).

1.3 Análisis del efecto sobre el proceso de *splicing* de la mutación c.763 G>A en el gen *PCCB*

Aproximadamente entre un 10-15% de las mutaciones puntuales patogénicas asociadas a enfermedades genéticas (según HGMD) afectan al correcto procesamiento del mRNA, estas mutaciones han sido encontradas tanto en los sitios conservados de *splicing* como en regiones reguladoras intrónicas o exónicas. Este hecho hace que se considere importante evaluar si los cambios de secuencia identificados pueden además de cambiar un aminoácido por otro, provocar alteraciones en el proceso de *splicing*. Las consecuencias más comunes de las mutaciones de *splicing* son la eliminación de exones que no se incluyen en el mRNA maduro (*exon skipping*) y la activación de nuevos sitios crípticos cuya consecuencia es la inclusión de secuencias intrónicas aberrantes (pseudoxones) y/o la eliminación de ciertas secuencias codificantes, lo cual podría generar en última instancia la aparición de una proteína truncada.

La mutación puntual c.763 G>A; analizada como mutación *missense* p.G255S en el apartado anterior, presenta una transversión de G>A que se localiza justo en el último nucleótido del exon 7, adyacente a la secuencia consenso del sitio 5' donador de *splicing* (**Fig.9**), este hecho junto con los resultados del análisis *in silico* e *in vitro* (alta actividad residual y posible cambio benigno) nos llevó a plantearnos la posible implicación del cambio en la alteración del procesamiento del mRNA.

Como primera aproximación se evaluó *in silico* el cambio empleando algunas de las plataformas bioinformáticas disponibles como *Berkeley Drosophila Genome Project Splice Site Prediction* (BDGP), *Analyzer Splice Tool* (AST) y *Human Splicing Finder* (HSF), que nos permiten conocer si las variaciones nucleotídicas podrían afectar o no a secuencias consenso implicadas en el proceso de *splicing*. Estos programas predicen valores (*scores*) que indican la fortaleza de la unión a proteínas que intervienen en el *splicing*, un valor mayor indica una mayor probabilidad de unión. Los tres programas mostraron una disminución del score de *splicing*: BDGP de 0,95 a 0,63, HSF de 96,51 a 85,93 y AST de 89,7 a 77,7 (**Fig.9**)

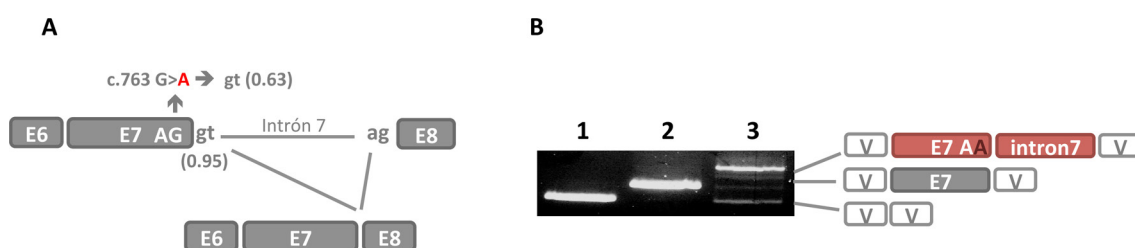


Fig.9 Análisis funcional mediante minigenes del cambio c.763 G>A en el gen *PCCB*. **A)** Representación esquemática del perfil de *splicing* con la mutación c.763 G>A marcada en rojo, junto con los *scores* de los sitios de *splicing* calculados con el software BDGP (http://www.fluitfly.org/seq_tools/splice). **B)** El gel muestra el análisis por RT-PCR en células Hep3B transfectadas con el vector pSPL3 vacío (carril 1), el minigen *wildtype* (carril 2) y el minigen mutante (carril 3). A la derecha se muestra una representación esquemática de los transcritos obtenidos tras su caracterización por secuenciación. V: secuencia exónica vector.

Para analizar funcionalmente el efecto de una mutación sobre el procesamiento del mRNA es necesario analizar el perfil transcripcional del alelo mutante, bien directamente en células del paciente, o bien mediante un sistema *ex vivo* de minigenes. El análisis mediante minigenes se llevó a cabo utilizando el vector pSPL3. Para ello se introdujo en el vector una versión simplificada de un gen, es decir, un fragmento genómico con el exon 7 del gen *PCCB* y sus secuencias intrónicas adyacentes. El análisis del perfil transcripcional por RT-PCR de las células Hep3B transfectadas con las construcciones *wildtype* y mutante se muestra en la **Figura 9 B**. El minigen con la construcción *wildtype* generó un único transcrito (carril 2) correspondiente a la inclusión del exon 7, mientras que el minigen de la construcción mutante generó un perfil transcripcional distinto (carril 3) con una banda mayoritaria correspondiente a la retención parcial del intrón 7, como consecuencia del uso de la maquinaria de *splicing* de un sitio críptico dentro del vector. Debajo de la banda mayoritaria se observa una tenue banda que no se pudo secuenciar debido a su pequeño tamaño pero que se localiza a la misma altura de la banda correspondiente al perfil transcripcional normal y una banda que corresponde al *skipping* del exon.

1.4 Análisis de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para estudiar el papel del estrés oxidativo en relación con la posible disfunción mitocondrial secundaria descrita en pacientes con AP (de Keyzer *et al.*, 2009; Schwab *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2003) se analizaron los niveles intracelulares de ROS en las muestras de fibroblastos de los 10 pacientes con AP descritos anteriormente (**Tabla 11**) y en muestras de fibroblastos control empleando 2',7'diclorodihidrofluoresceína di-acetato (H₂DCFDA).

Los pacientes P1 y P6 mostraron un incremento de 2,5 veces en los niveles de ROS con respecto al

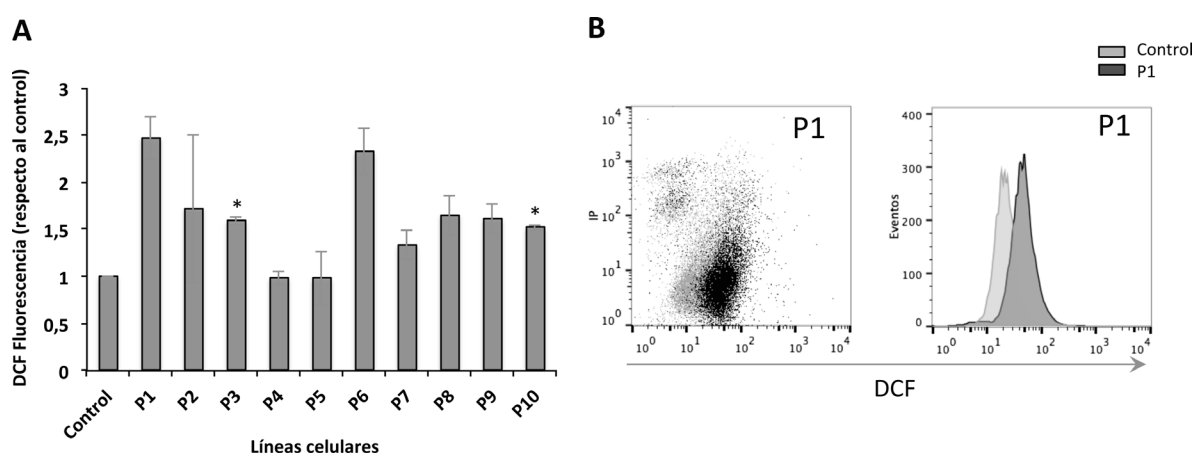


Fig.10 Análisis de los niveles de ROS intracelular en fibroblastos de pacientes con AP. **A)** Detección intracelular de ROS en fibroblastos de pacientes P1-P10 mediante el marcaje con H₂DCFDA y análisis por citometría de flujo. El análisis cuantitativo se realizó como la media de intensidad de fluorescencia relativa de cada paciente con respecto al control. El valor control fue obtenido como una media de intensidad de fluorescencia de cuatro líneas control. Cada valor representa la media ± SD de al menos tres experimentos independientes por triplicado (*p<0,05). **B)** Gráfico de puntos de dos dimensiones (*dot-blot*) e histogramas del análisis mediante citometría de flujo del paciente P1 con respecto al control.

control. El resto de muestras de pacientes (excepto P4 y P5) mostraron un incremento en los niveles intracelulares de ROS de al menos 1,5 veces con respecto al control, como se muestra en la **Fig.10**.

Para confirmar la relación entre la pérdida de funcionalidad de la enzima PCC y el estrés oxidativo observado en fibroblastos de pacientes con AP, se analizaron los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes *PCCA* (P2 y P6) transfectados transitoriamente con los cDNAs *PCCA* y *PCCB* *wildtype*. El análisis por citometría de flujo con H₂DCFDA mostró una disminución entre un 50-60% de los niveles intracelulares de ROS en los fibroblastos corregidos mediante la expresión de las construcciones *PCC* *wildtype* con respecto a los niveles de ROS de los fibroblastos transfectados con el vector vacío (**Fig.11**). La actividad enzimática PCC en los fibroblastos de los pacientes transfectados con la construcción *wildtype* mostró una recuperación de hasta un 30% con respecto a la actividad basal de los fibroblastos de los pacientes P2 y P6.

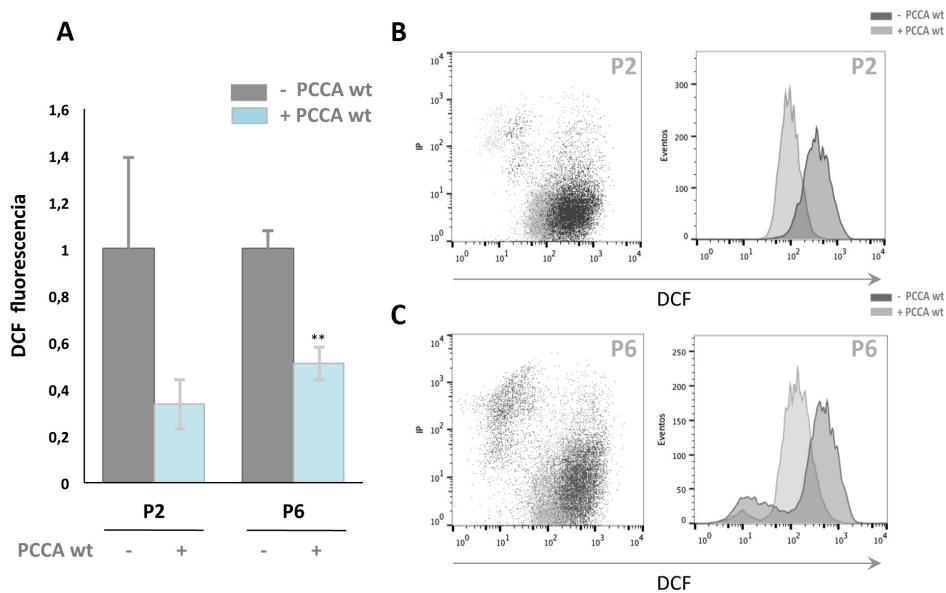


Fig.11 Análisis de los niveles intracelulares de ROS tras la expresión transitoria de la proteína PCC *wildtype* en fibroblastos de pacientes con AP. Detección de los niveles intracelulares de ROS mediante el marcaje con H₂DCFDA y análisis por citometría de flujo en fibroblastos de pacientes transfectados transitoriamente con los vectores pRcCMVB52 y pCMVA45-12 que codifican para los cDNAs *PCCA* y *PCCB* *wildtype*, respectivamente. **A)** El análisis cuantitativo se realizó como la media de intensidad de fluorescencia de las células de los pacientes P2 y P6 transfectadas con la proteína *wildtype* (+*PCCA* wt) relativo a la misma línea transfectada con el vector vacío (-*PCCA* wt). Cada valor representa la media ± SD de al menos tres experimentos independientes por triplicado (***p*<0,01). **B** y **C**) Gráfico de puntos de dos dimensiones (*dot-blot*) e histogramas del análisis por citometría de flujo de las células de los pacientes P2 (B) y P6 (C) transfectadas con los cDNAs que codifican para la proteína *wildtype* (+*PCCA* wt) con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (-*PCCA* wt).

1.5 Análisis de la morfología mitocondrial

Un incremento de los niveles de ROS se ha relacionado con posibles cambios en la morfología de la red mitocondrial controlada por eventos de fusión y fisión de la masa mitocondrial. En los fibroblastos, las mitocondrias presentan una forma de filamento alargado, esta morfología se asocia con eventos de fusión, mientras que estructuras en forma de grano han sido relacionadas con la fisión mitocondrial. Para estudiar estos posibles cambios en la dinámica mitocondrial se tiñeron muestras de fibroblastos de pacientes y controles con Mitotracker Red CM-H2Ros. Los fibroblastos de los pacientes P2 y P6 presentaron una fisiología de la red mitocondrial alterada, mostrando un mayor número de estructuras en forma de grano con respecto a los fibroblastos control (**Fig. 12**).

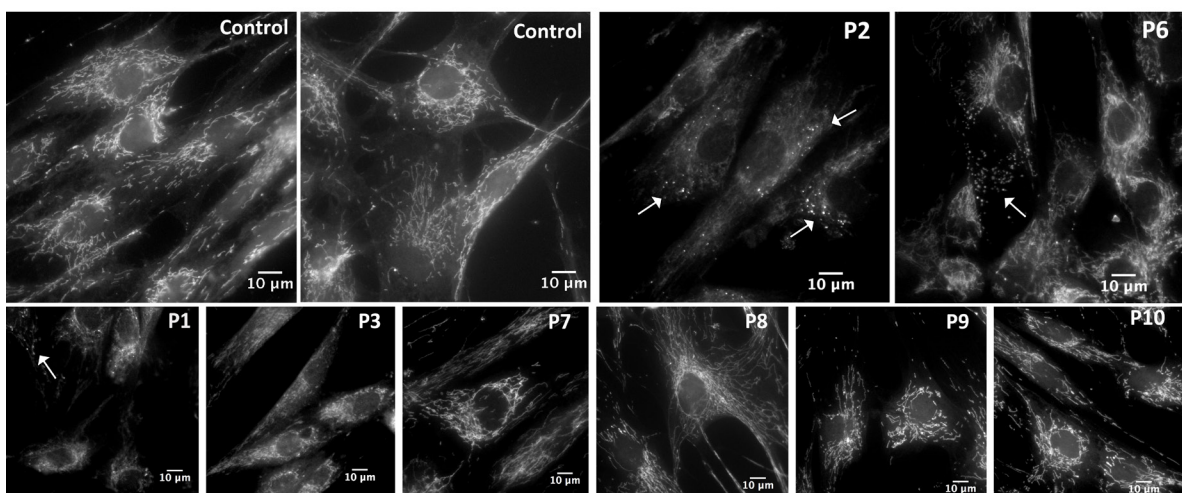


Fig.12 Análisis de la morfología mitocondrial de fibroblastos de pacientes con AP (P1, P2, P3, P6, P7, P8, P9 y P10) mediante el marcaje con Mitotracker Red CM-R2Ros. Las flechas blancas señalan las mitocondrias en forma de grano.

1.6 Análisis de los niveles de la proteína superóxido dismutasa (SOD2)

SOD2 es la principal enzima antioxidante que protege a la célula del estrés oxidativo generado por la mitocondria. Se ha descrito una relación entre el aumento de estrés oxidativo y la inducción de SOD2 en pacientes con deficiencia en el complejo I de la CTE (Filosto *et al.*, 2002). Los resultados de la inmunodetección de SOD2 mostraron un aumento entre 7-10 veces la cantidad de proteína en P1, P2, P4, P9 y P10 con respecto a los controles y un aumento entre 3-6 veces en P6, P7 y P8 (**Fig.13**).

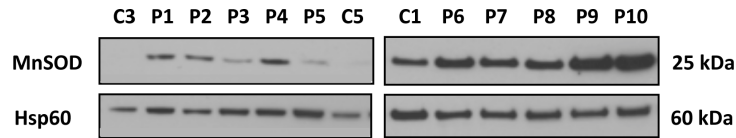


Fig.13 Análisis de los niveles de superóxido dismutasa (SOD2) en fibroblastos de pacientes con AP. El análisis de la expresión de SOD2 se realizó por western blot en fibroblastos control (C1, C3 y C5) y en fibroblastos de pacientes con AP (P1-P10). Las membranas se deshidraron e incubaron con anticuerpo anti-Hsp60 (control de carga).

1.7 Análisis de los niveles de apoptosis

Las especies reactivas de oxígeno pueden activar varias vías de señalización celular incluyendo aquellas que regulan la muerte celular. Para evaluar una posible relación entre los niveles intracelulares de ROS y el daño celular en pacientes con AP se analizó el porcentaje de células anexina V positivas por citometría de flujo en condiciones basales y en células tratadas con H₂O₂. Los resultados muestran un aumento del número de células anexina V positivas en los pacientes P1, P2 y P3 con respecto al control en condiciones basales (**Fig.14 A y B**). Con el objetivo de determinar si el incremento de ROS está directamente relacionado con un aumento de células apoptóticas se trataron los fibroblastos de pacientes P1-P5 con H₂O₂ y se comparó el porcentaje de células anexina V positivas de fibroblastos tratados y sin tratar con H₂O₂. Los resultados muestran un incremento en

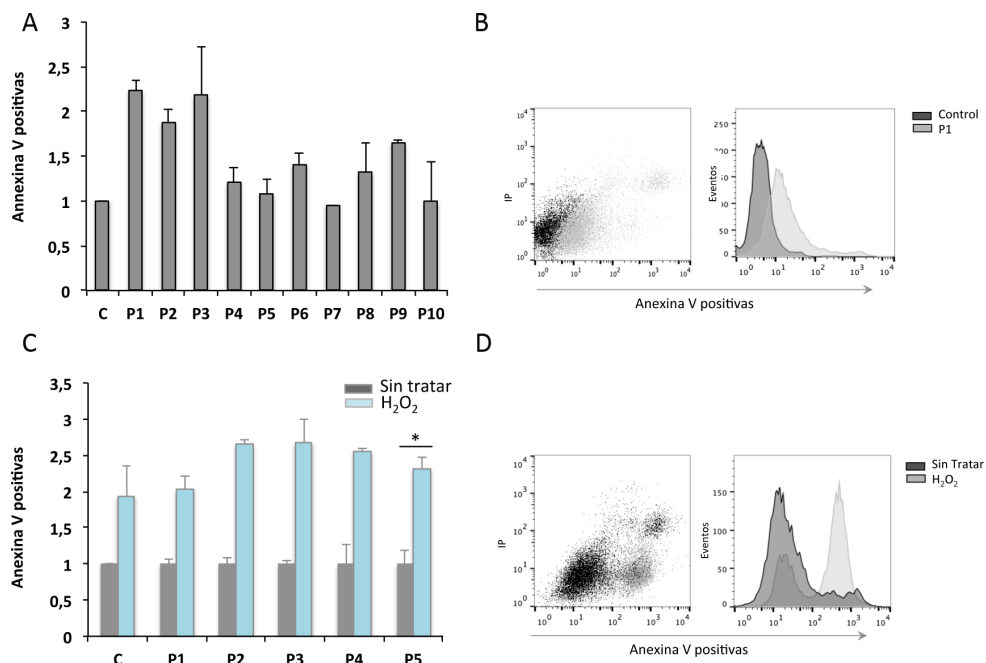


Fig.14 Análisis de los niveles de apoptosis en fibroblastos de pacientes con AP. El análisis de apoptosis se llevó a cabo mediante doble marcaje con Anexina-V-DY634/IP por citometría de flujo. **A y C**) El análisis cuantitativo se realizó como la media de intensidad de fluorescencia relativa al control o a las células sin tratar con H₂O₂. El valor control fue obtenido como una media de intensidad de fluorescencia de dos líneas control. Cada valor representa la media ± SD de tres experimentos independientes por triplicado (*p<0,05). **B y C**) Gráfico de puntos de dos dimensiones (*dot-blot*) e histogramas del análisis mediante citometría de flujo del paciente P1 con respecto al control (**B**) y del paciente P1 tratado y sin tratar con H₂O₂(**C**). Las células fueron tratadas durante 1h con 1mM de H₂O₂ antes de la doble tinción con Anexina-V-DY634/IP.

el porcentaje de células anexina V positivas en todos los fibroblastos de los pacientes analizados tras el tratamiento con H₂O₂ (Fig.14 C y D).

1.8 Análisis de los niveles de proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) p38 MAPK y JNK

95

Las SAPK juegan un papel esencial en la mediación de la respuesta celular a estrés mediante la modulación de distintos factores de transcripción. Con el fin de determinar la posible activación de la vía en pacientes con AP se analizaron los niveles de proteínas p38 MAPK y JNK fosforiladas por western blot. Los resultados mostraron un incremento significativo en la cantidad de p38 MAPK activada en todos los pacientes con respecto a las líneas control (2-5 veces) (Fig.15). Los pacientes (P1, P3, P4, P5 y P10) mostraron una mayor cantidad de JNK activada con respecto a las muestras control (4-10 veces) (Fig.15).

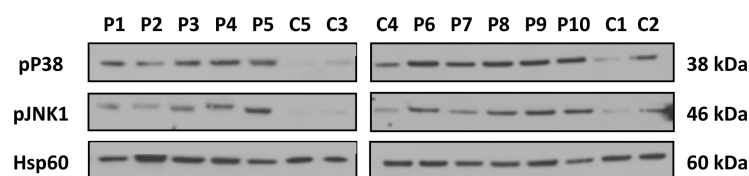


Fig.15 Análisis de los niveles de proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) p38 MAPK y JNK en fibroblastos de pacientes con AP. Análisis por western blot de la expresión de pP38 MAPK (38kDa) y pJNK1 (46kDa) en fibroblastos control (C1-C5) y fibroblastos de pacientes con AP (P1-P10). Las membranas se deshidraron e incubaron con anticuerpo anti-Hsp60 como control de carga (panel inferior).

1.9 Análisis del efecto de antioxidantes

La mayor parte de las especies reactivas de oxígeno generadas en la célula son neutralizadas por antioxidantes que pueden ser sintetizados endógenamente por las propias células o ingeridos en la dieta. Sin embargo, cuando existe un incremento de los niveles intracelulares de ROS que no puede ser neutralizado satisfactoriamente por los mecanismos de defensa antioxidantes de la célula, la acumulación de ROS provoca daño oxidativo. Dado que es posible que el estrés oxidativo juegue un papel relevante en la fisiopatología de la enfermedad de AP, una nueva estrategia para el tratamiento podría ser el uso de distintos antioxidantes, ya que pueden actuar previniendo la formación de ROS, potenciando la neutralización de estos radicales libres o facilitando la reparación del daño causado por los mismos. Por ello, se propuso realizar un estudio del posible potencial antioxidante de una batería de compuestos: *tiron* (1,2-dihidroxibenzeno-3,5-disulfonato), trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilchroman-2-carboxilic ácido), MitoQ, melatonina y resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihidroxistilbeno) en los fibroblastos primarios de los pacientes P1-P10.

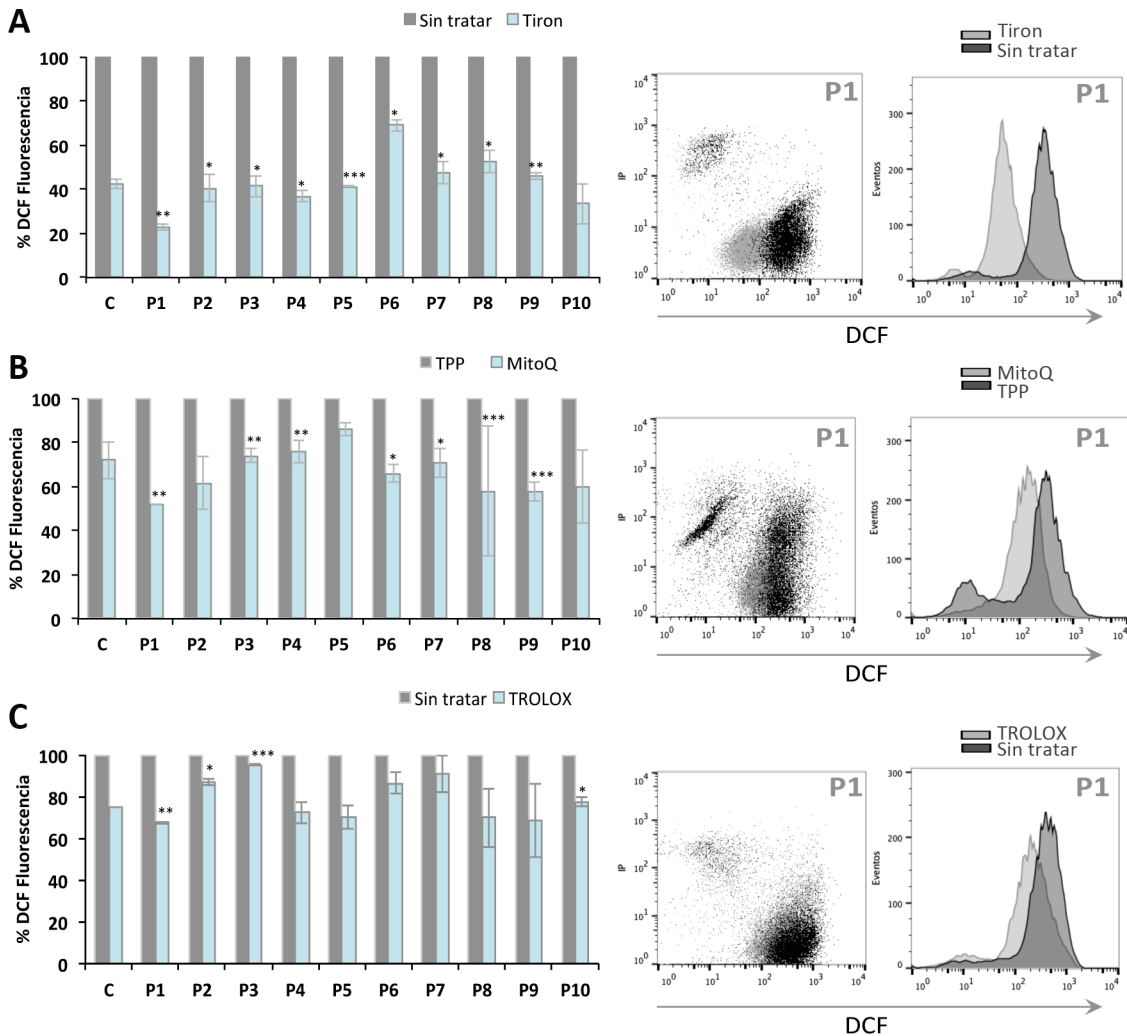


Fig.16 Análisis del efecto de antioxidantes en los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes con AP. La detección intracelular de ROS se realizó mediante el marcaje con H₂DCFDA y citometría de flujo en fibroblastos de pacientes P1-P10 tratados con distintos antioxidantes. El análisis cuantitativo se realizó como una media de intensidad de fluorescencia relativa al control sin tratamiento. Cada valor representa la media ± SD de al menos tres experimentos independientes por triplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). **A)** Tratamiento con *tiron* 40mM durante 18h. **B)** Tratamiento con TPP 200nM y con MitoQ 200nM independientemente durante 24h. **C)** Tratamiento con trolox 1mM durante 72h.

El tratamiento con *tiron* en los fibroblastos de los pacientes P1-P10 produjo una disminución entre un 50-80 % de los niveles de ROS (**Fig.16 A**). La disminución más destacable, hasta un 80%, se observó en los fibroblastos del paciente P1, que presentaron niveles intracelulares de ROS más elevados (**Fig.10**). Los fibroblastos de los pacientes P3, P7, P8 y P9 que habían mostrado niveles intracelulares de ROS ligeramente aumentados (1,5 veces) con respecto a las líneas control presentaron una disminución de los niveles intracelulares de ROS hasta un 50% tras el tratamiento con *tiron* (**Fig.10 y Fig.16 A**). Los resultados del tratamiento de los pacientes P1-P10 con MitoQ mostraron una disminución moderada entre un 25-50% de los niveles intracelulares de ROS con respecto a

los fibroblastos tratados únicamente con el vehículo TPP. P1 y P8 mostraron una disminución de los niveles intracelulares de ROS de un 50% y un 40%, respectivamente tras el tratamiento con MitoQ (Fig.16 B).

El tratamiento con melatonina (20-100 μ M) durante 24-72h no mostró cambios apreciables en los niveles intracelulares de ROS.

El tratamiento con trolox fue capaz de disminuir moderadamente, entre un 15-30%, los niveles intracelulares de ROS en los fibroblastos de los pacientes P1-P10. La mayor disminución, hasta un 30%, se observó en los fibroblastos del paciente P1. Los fibroblastos del grupo de pacientes P4, P5, P8 y P9 mostraron una disminución de ROS intracelular entorno a un 20% con respecto a las células sin tratar (Fig.16 C).

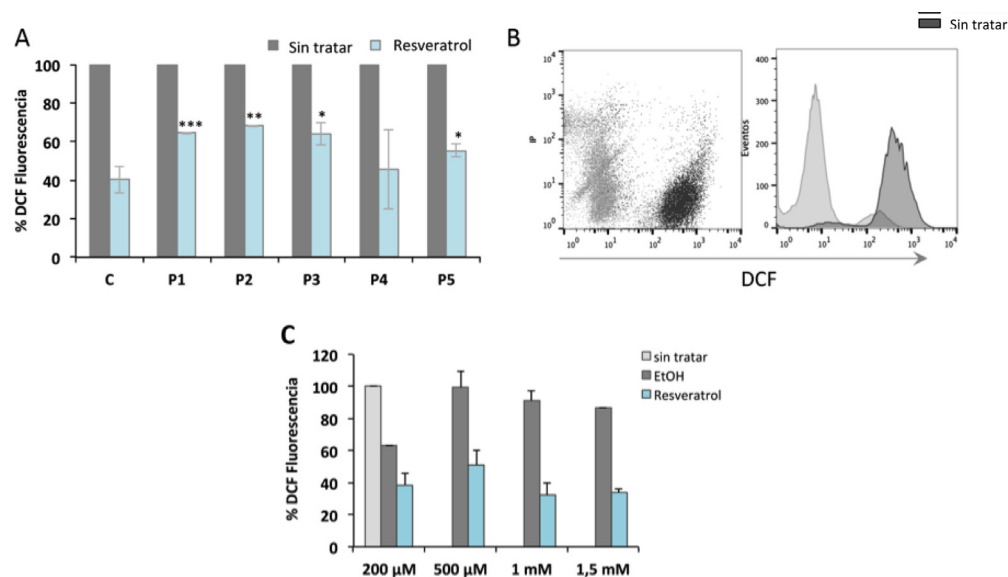


Fig.17 Análisis del efecto de resveratrol en los niveles intracelulares de ROS en fibroblastos de pacientes P1-P5. La detección intracelular de ROS se realizó mediante marcaje con H_2DCFDA y citometría de flujo. **A)** Tratamiento con resveratrol 1mM durante 3h. El análisis cuantitativo se realizó como una media de intensidad de fluorescencia relativa al control sin tratamiento. Cada valor representa la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes por triplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **B)** Gráfico de puntos de dos dimensiones (*dot-plot*) e histogramas del análisis por citometría de flujo de las células del paciente P1. **C)** Tratamiento con resveratrol (200 μ M, 500 μ M, 1mM y 1,5 mM) durante 3h.

El tratamiento con resveratrol disminuyó los niveles intracelulares de ROS entre un 30-40% en los fibroblastos de los pacientes P1-P5 (Fig.17 A y B). Sin embargo, algunos fibroblastos de pacientes tratados con resveratrol a dicha concentración mostraron cierta toxicidad celular (Sassi *et al.*, 2014). Concentraciones más bajas de resveratrol entre 200-500 μ M disminuyeron moderadamente los niveles intracelulares de ROS (20%) (Fig.17 C).

La superóxido dismutasa (SOD2) y la glutatión peroxidasa (GPx1) son dos enzimas antioxidantes que juegan un papel importante como componentes de la defensa antioxidante primaria en la mitocondria, catalizan la conversión de aniones superóxido en peróxidos de hidrógeno y de peróxidos de hidrógeno en agua, respectivamente. La actividad de estas dos enzimas está fuertemente regulada por cambios en el estado redox de la célula (Evans *et al.*, 2002).

Para estudiar la correlación del incremento de ROS con los niveles de enzimas antioxidantes se analizó la cantidad de SOD2 y GPx1 en extractos proteicos de fibroblastos de pacientes con AP tras el tratamiento individual con *tiron* y resveratrol.

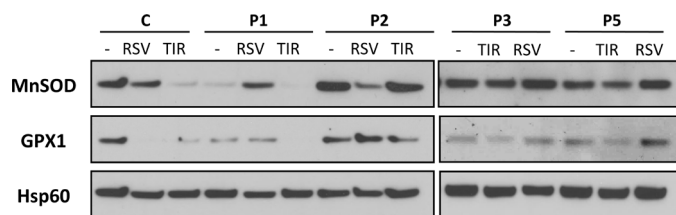


Fig.18 Análisis de los niveles de superóxido dismutasa (SOD2) y glutatión peroxidasa (GPX1) en fibroblastos control y de pacientes con AP (P1, P2, P3 y P5). Los fibroblastos fueron tratados de forma individual con resveratrol (1mM) durante 3h y con *tiron* (40mM) durante 18h. Las membranas se deshidraron e incubaron con anticuerpo anti-Hsp60 como control de carga (panel inferior). RSV (resveratrol); TIR (*tiron*).

Los resultados muestran una disminución de la cantidad de GPx1 y un aumento de SOD2 en la mayoría de los fibroblastos de los pacientes sin tratar (**Fig.18**). Tras el tratamiento con resveratrol la mayoría de los fibroblastos de pacientes mostraron un moderado aumento en la cantidad de SOD2 y GPx1. Mientras que en los fibroblastos de pacientes y líneas control tratados con *tiron* se detectó una disminución significativa en la expresión de SOD2 y GPX1.

OXIDATIVE STRESS STUDIES AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN A HYPOMORPH MURINE MODEL OF PA

PCC deficiency in PA leads to the accumulation of endogenous organic acids and other metabolic products, which are thought to cause secondary mitochondrial dysfunction, this impairment could explain the multiorgan complications observed in PA patients. The hypomorph mouse model of PA (*Pcca*^{-/-}(A138T)) survives to adulthood and has elevations in markers associated with pathology similar to those observed in PA patients. Using this murine model we have studied in relevant tissues the expression of several proteins involved in mitochondrial function by Reverse Phase Protein Microarray (RPPma), measured OXPHOS activities and mtDNA copy number. We found decreased levels and activity of several OXPHOS complexes and mtDNA depletion in heart and muscle, while brain displayed an increase of OXPHOS complexes, glycolytic enzymes, IF1 (H⁺ATP synthase inhibitor), catalase and in mitochondrial mass. In addition, we have found a moderate increase of ROS production in brain and heart and increased lipid peroxidation in heart. These data support the hypothesis that an impairment of energy metabolism due to mitochondrial dysfunction and concomitantly increased ROS production may play a key role in the pathophysiology of PA, and pave the way for the evaluation of the therapeutic potential of antioxidants and other compounds potentiating mitochondrial function.



2 Estudios de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)

Para estudiar *in vivo* el estrés y daño oxidativo relacionados con la disfunción mitocondrial secundaria observada en pacientes con AP (de Keyzer *et al.*, 2009; Schwab *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2003) se utilizó un nuevo modelo murino de AP, el ratón hipomorfo *Pcca*^{-/-} (A138T) (Guenzel *et al.*, 2013) que mimetiza la sintomatología clínica y bioquímica de los pacientes. Este modelo murino fue cedido en colaboración por el grupo de Michael A. Barry (Mayo Clinic, Minnesota, USA).

101

2.1 Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético

En la búsqueda de nuevos marcadores moleculares alterados y relacionados con la disfunción mitocondrial se llevó a cabo un perfil de expresión de proteínas mitocondriales y de proteínas implicadas en el metabolismo energético en el modelo hipomorfo *Pcca*^{-/-} (A138T), mediante un microarray de proteínas de fase reversa (RPPma) que fue realizado por el grupo de J.M Cuezva (CBMSO, Madrid). Se analizaron muestras de corazón, hígado, cerebro y músculo de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype* de 4-5 meses de edad. El estudio se basó en la cuantificación por inmunofluorescencia de ciertos marcadores mitocondriales, como distintas subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (NDUFS3, SDHB, C-III, COX-II, COX-IV, β -F1), enzimas antioxidantes (catalasa y SOD2), el factor inhibidor 1 de la H⁺ATP sintetasa (IF1), la proteína trifuncional mitocondrial (TFP) implicada en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, enzimas implicadas en la vía glucolítica como piruvato kinasa (PKM2), gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH), lactato deshidrogenasa (LDHA), piruvato deshidrogenasa (PDH) y proteínas estructurales como β -actina y Hsp60.

La mayoría de los órganos analizados mostraron una disminución significativa en la cantidad de marcadores mitocondriales en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto a los *wildtype*, salvo en cerebro donde se observó un aumento. Los resultados obtenidos en las muestras de hígado de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) mostraron una disminución significativa en: el complejo III (9%), en catalasa (10%), en IF-1 (7%) y en HADHA (14%) con respecto a los ratones *wildtype* (**Fig.19 A**). Los resultados en músculo mostraron una disminución significativa en 5 subunidades de los complejos OXPHOS (NDUFS3 (10%), SDBH (9%), C-III (21%), COX-II (16%), COX-IV (9%)), en HADHA (19%) y en LDHA (17%) (**Fig.19 D**). En las muestras de corazón sólo se observó una disminución en HADHA (21%) y en la subunidad B del complejo SDH (10%) (**Fig.19 C**), mientras que las muestras de cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) mostraron un incremento significativo con respecto a los ratones *wildtype* en la expresión de distintas subunidades de los complejos OXPHOS (NDUSF3 (35%), SDHB (15%), C-III (11%), COX-II (15%), COX-IV (24%)), catalasa (38%), IF1 (32%), PKM2 (46%), PDH (15%) y un incremento de la masa mitocondrial (Hsp60 (37%)) (**Fig.19 B**).

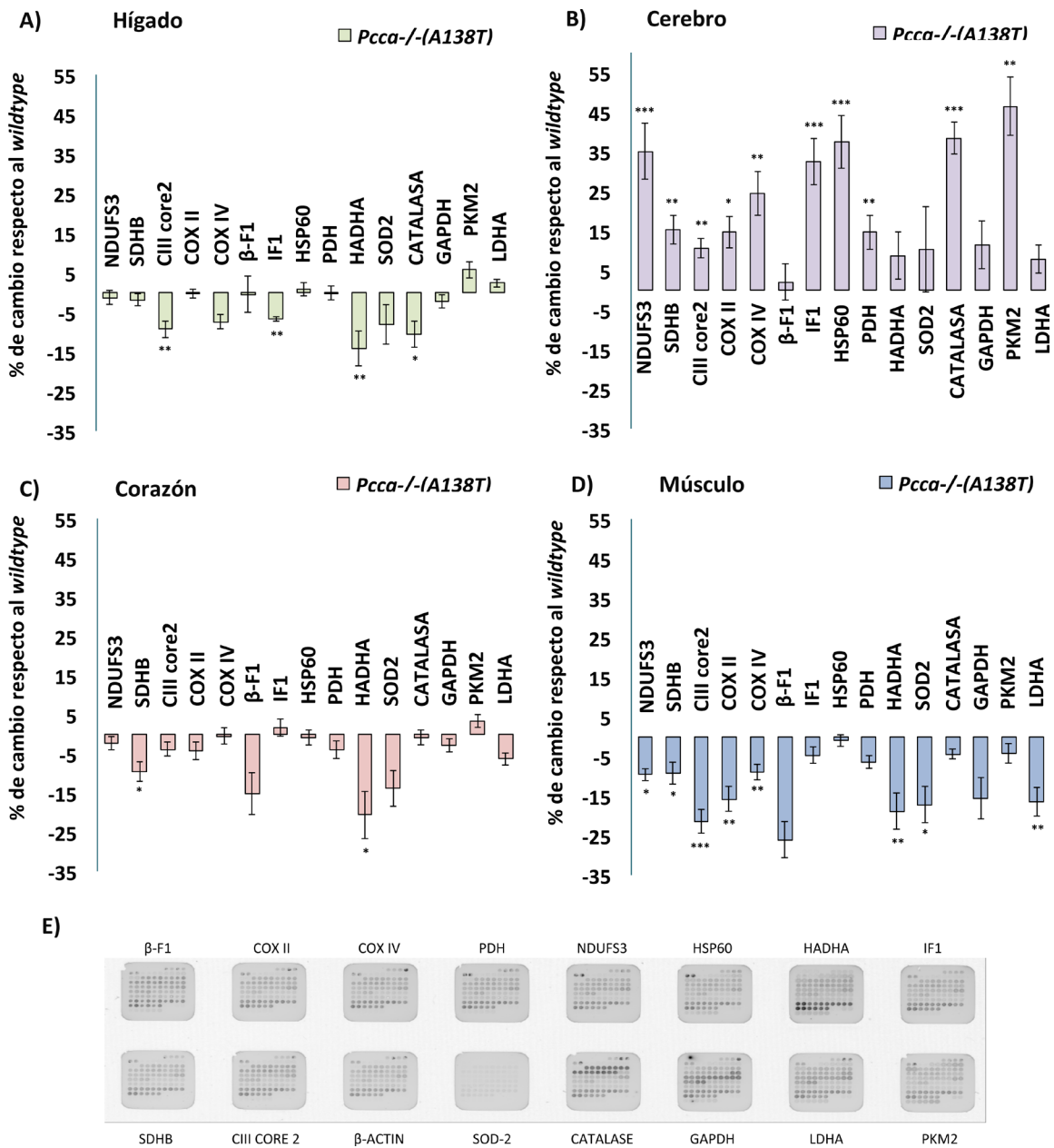


Fig.19 Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) y ratones *wildtype* de 4-5 meses de edad mediante un array de proteínas de fase reversa (RPPma). Cada histograma muestra el % de cambio con respecto al *wildtype* de la media de intensidad de fluorescencia de cada marcador analizado. **A)** en hígado, **B)** en cerebro, **C)** en corazón, **D)** en músculo. Se analizaron muestras por duplicado de n=4 ratones *wildtype* y n=4 ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Las barras de error representan SEM (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), **E)** Array representativo con cada uno de los anticuerpos utilizados.

2.2 Análisis de la actividad de los complejos de la CTE

En muestras de músculo, hígado, riñón y corazón de pacientes con AP se ha detectado una disminución en la actividad de algunos complejos de la CTE (De Keyzer Y et al., 2009; Schwab MA et al., 2006) (**Tabla S3**). Este hecho junto con el aumento observado en la cantidad de algunas subunidades de la CTE en el array de proteínas de fase reversa nos llevó a estudiar la actividad de los complejos en el modelo hipomorfo. Las medidas se realizaron en el Hospital 12 de Octubre (Madrid) por el grupo de Miguel Ángel Martín.

Se emplearon muestras de corazón y músculo de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype* de 4-5 meses de edad y se midió la actividad de los complejos I, II+III, I+III, III, IV y la actividad citrato sintasa (CS) como control de la cantidad de mitocondrias. Los resultados del análisis en corazón mostraron una disminución de un 24% de la actividad del complejo I, NADH deshidrogenasa, y un aumento de la actividad CS (10%) en las muestras de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto a los *wildtype* (**Fig.20 A**). En músculo se observó una disminución significativa de un 23% de la actividad del complejo III, citocromo c oxidoreductasa, en las muestras de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto a los *wildtype* (**Fig.20 B**).

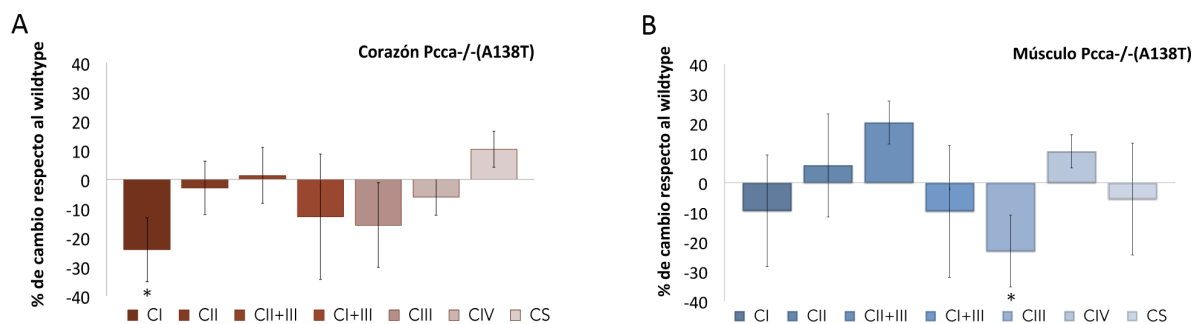


Fig.20 Análisis de la actividad de los complejos de la CTE en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) de 4-5 meses de edad. Cada histograma muestra el % de cambio con respecto al *wildtype* de la actividad de los distintos complejos de la CTE (CI, CII+CIII, CI+CIII, CIII, CIV) en corazón **A**) y en músculo **B**) de ratones *wildtype* y *Pcca*^{-/-} (A138T). La actividad de cada complejo fue normalizada con respecto a la actividad citrato sintasa (CS). Se analizaron muestras por duplicado de n=4 ratones *wildtype* y n=4 ratones *Pcca*^{-/-} (A138T). Las barras de error representan SD (*p<0,05).

2.3 Análisis del número de copias de DNA mitocondrial

Se ha descrito en algunos pacientes con AP una depleción mitocondrial en músculo (Yano *et al.*, 2003), lo que se ha correlacionado con la inhibición de la succinil-CoA sintetasa por el propionil-CoA. Este hecho, junto con la hipótesis de que el contenido de DNA mitocondrial en distintos fluidos y tejidos del cuerpo podría constituir un buen marcador de disfunción mitocondrial (Malik y Czajka, 2013) nos llevó a analizar mediante PCR cuantitativa (qPCR) el contenido de DNA mitocondrial en diversos tejidos (corazón, músculo, hígado y cerebro) de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype*. Los resultados demostraron que existe una disminución de la cantidad de DNA mitocondrial en corazón y músculo de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) (**Fig.21**). En hígado y cerebro no se observaron diferencias significativas en el contenido de DNA mitocondrial.

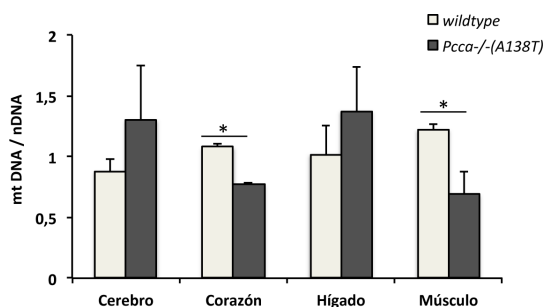


Fig.21 Análisis del número de copias de DNA mitocondrial en corazón y músculo de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) de 4-5 meses de edad. Determinación del ratio de DNA mitocondrial (mtDNA): DNA nuclear (nDNA) mediante qPCR en muestras de cerebro, músculo, hígado y corazón de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=4) y ratones *wildtype* (n=4). Las barras de error muestran SD. (*p<0,05).

2.4 Análisis histológico de la presencia de radicales superóxido en corazón y cerebro de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)

ROS se generan en varios compartimentos de la célula como consecuencia del metabolismo celular. La mitocondria es considerada la principal fuente de aniones superóxido (O_2^-) sobre todo en aquellas células con una alta demanda energética como son las del sistema nervioso y del sistema cardiaco. Con el objetivo de analizar si existe una sobreproducción de ROS en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) se realizó una tinción con DHE para detectar los niveles intracelulares de O_2^- presentes en muestras de cortes congelados de corazón y cerebro de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype*. El análisis de la media de intensidad de fluorescencia de 2-OH-Et-DNA en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) mostró un ligero incremento de la señal de 1,3 veces en las muestras de corazón (**Fig.22 A y B**) y 1,2 veces en las muestras de cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto a los ratones *wildtype* (**Fig.22 C y D**).

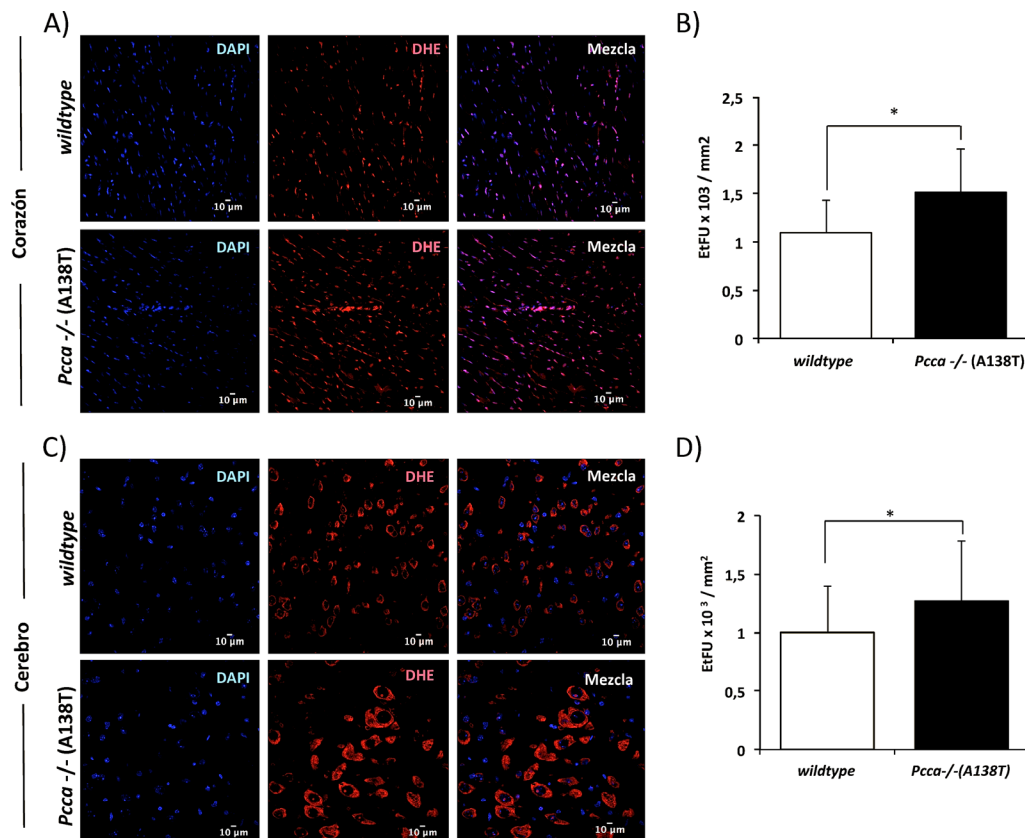
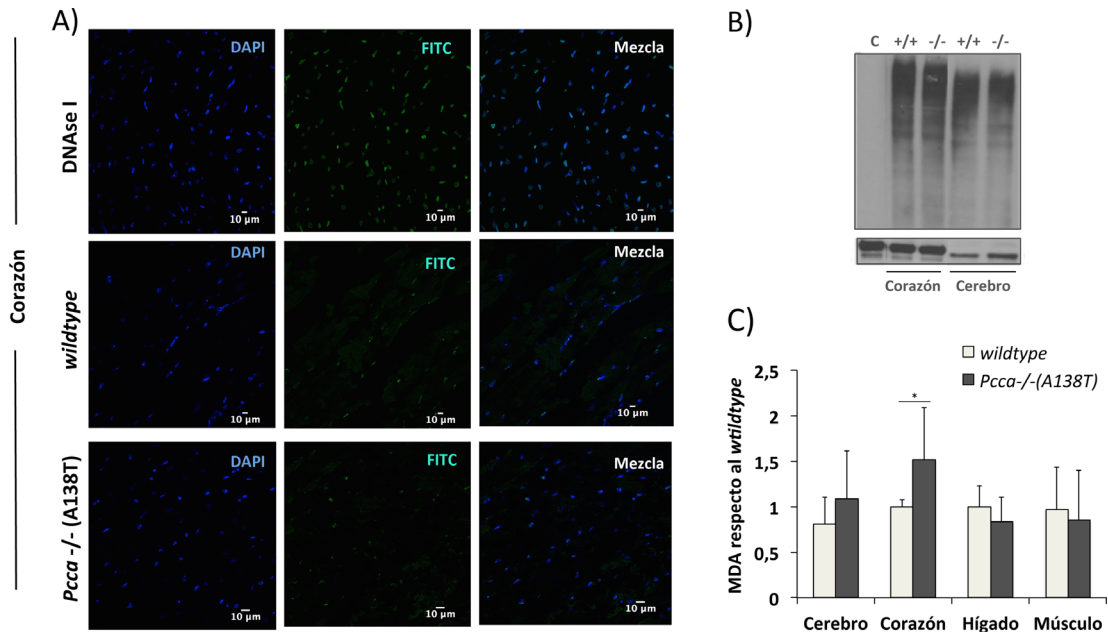


Fig.22 Análisis de los niveles intracelulares de aniones superóxido (O_2^-) en muestras de corazón y cerebro de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) de 3 meses de edad. Detección de O_2^- en secciones congeladas de tejidos de corazón **A)** y cerebro **C)** marcado con dihidroetidio (DHE) y DAPI. El análisis cuantitativo se realizó como una media de intensidad de fluorescencia relativa (EtUF), **B)** en secciones de corazón y **D)** en secciones de cerebro. Se analizaron 3-4 cortes de cada ratón (n=4 ratones *wildtype* y n=4 ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)). Las barras de error representan SD. (*p<0,05).

2.5 Análisis del daño oxidativo en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)

ROS tienen una gran capacidad para reaccionar con una gran variedad de biomoléculas, lo que justifica su implicación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Cuando el incremento de los niveles intracelulares de ROS no puede ser neutralizado satisfactoriamente por los mecanismos antioxidantes de la célula, la acumulación de ROS puede provocar daños en la estructura y función celular mediante la degradación oxidativa de lípidos, proteínas y DNA. Con el objetivo de detectar la existencia del daño oxidativo causado por el incremento de ROS se analizó el daño al DNA mediante ensayos de TUNEL, el daño a lípidos mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) mediante la técnica de TBARS y el daño oxidativo a proteínas mediante un estudio de carbonilación de proteínas, en distintos tejidos del modelo hipomorfo *Pcca*^{-/-} (A138T).



El ensayo de TUNEL permite detectar uno de los cambios característicos de las células en apoptosis tardía como es la presencia de cortes o fragmentos de DNA. Se analizaron cortes de secciones de corazón y cerebro de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype* mediante microscopía confocal. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las muestras de corazón de los ratones *wildtype* y los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) (**Fig.23 A**).

La consecuencia daño oxidativo más común en proteínas es la carbonilación de las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina arginina, lisina, y treonina que genera derivados de aldehído o cetonas. Estos derivados son químicamente estables y sirven como marcadores de estrés oxidativo. Los resultados de la inmunodetección de los grupos derivatizados no mostraron diferencias significativas en muestras de corazón y cerebro de ratones *wildtype* y ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) (**Fig.23 B**).

El daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación) desencadenado por ROS afecta principalmente a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs *polyunsaturated fatty acids*) como las membranas celulares. Los resultados del ensayo de monitorización de lipoperoxidación mediante TBARs mostraron un aumento de los niveles de MDA (1,5-2 veces) en muestras de cerebro y corazón de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto al *wildtype*, siendo solo significativo en corazón (**Fig.23 C**).

BEHAVIOURAL PHENOTYPING IN A HYPOMORPH MURINE MODEL OF PA

Pathological metabolites that accumulate in PA patients are proposed to act as neurotoxins that inhibit specific enzymes of brain-energy metabolism. Complications in the nervous system are common in PA patients. Some frequent manifestations of the disease, such as brain edema and acute injury of basal ganglia, result in motor and mental retardation, causing movement disorders including hypotonia, lethargy, myoclonus and hyperreflexia. Intraventricular infusions of propionic acid in rodents can produce brain and behavioral changes similar to those observed in autism spectrum disorders. Here we have characterized behaviour and locomotive activity of the hypomorph mouse model *Pcca*^{-/-} (A138T) by open field test (OFT) and rota-rod performance. The results showed a remarkable temporal and reversible hyperactivity (less resting time and increased velocity, time and number of jumps and stereotypic counts) at 12 weeks of age in *Pcca*^{-/-} (A138T) mice. Motor coordination studies carried out at 6 and 12 weeks showed similar ability of *Pcca*^{-/-} (A138T) and wildtype mice to maintain balance. Differences in latency to fall are evident at 24 and 32 weeks in *Pcca*^{-/-} (A138T) mice, suggesting the existence of a possible age-dependent deficit in motor coordination. 6 and 32 weeks *Pcca*^{-/-} (A138T) mice showed lower endurance in the later stages of the latency to fall test compared to wildtype mice. Further experiments are needed to further define the locomotive activity and social interactions in these mice. This will allow us to understand the relationship between the accumulation of propionic acid and neurological complications observed in patients including the less frequent symptoms such as autism and hyperactivity.



3 Estudios de comportamiento en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T)

Dentro de los síntomas neurológicos más comunes en pacientes con AP se encuentra la hipotonía y la letargia, causados por alteraciones en el tono muscular y el movimiento. Estos síntomas se asocian con lesiones en una de las regiones del cerebro implicadas en la coordinación del movimiento como son los ganglios basales. Se han descrito episodios de ictus, necrosis, hipotenuación e infarto de los ganglios basales de pacientes con AP (Schreiber *et al.*, 2012). Con el objetivo de determinar la existencia de alteraciones en el comportamiento de los animales transgénicos se llevó a cabo un análisis de la capacidad locomotora, exploratoria y de la coordinación motora en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y ratones *wildtype*.

109

3.1 Análisis de la capacidad locomotora y exploratoria

Ratones a 6, 12 y 24 semanas de edad de ambos genotipos *Pcca*^{-/-} (A138T) y *wildtype* se sometieron a un test de campo abierto (*Open Field Test*) de locomoción general para analizar la capacidad locomotora y exploratoria. Éste evalúa de forma amplia el estado de los ratones referente a parámetros de exploración, tipos de movimiento, velocidades, estereotipias etc. El test se realizó a cada animal por separado durante 30 min. El análisis a las 6 semanas de edad en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) mostró una disminución significativa durante los primeros 5 min del ensayo en los siguientes parámetros: número de estereotipias (6%), distancia y número de episodios ambulatorios (25% y 20%, respectivamente) y velocidad media y total (31% y 14%, respectivamente). Estos resultados muestran cierta hipo-actividad a las 6 semanas de edad en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) frente a los *wildtype* (**Fig.24 A**).

A las 12 semanas de edad el análisis mostró un aumento significativo de los siguientes parámetros en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) frente a los *wildtype*: tiempo de salto (47%), número de estereotipias (15%), velocidad media y total (19% y 45%, respectivamente) y una disminución en el tiempo de descanso de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) con respecto a los *wildtype* (6,5%) (**Fig.24 B**). A las 24 semanas de edad se observó un aumento en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) en tiempo de salto (34%) durante los minutos 5-20 y (48%) durante los minutos 20-30 del experimento (**Fig.24 C**).

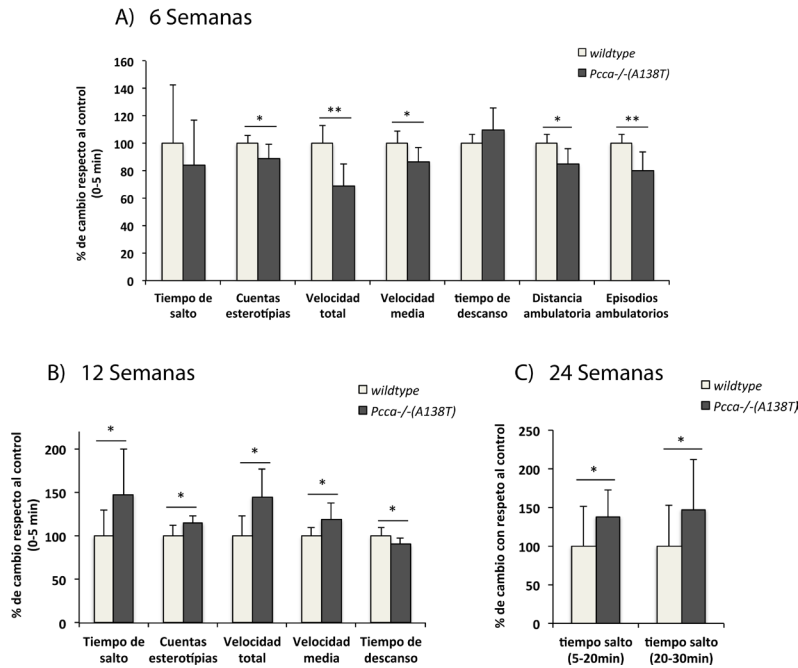


Fig.24 Análisis del test de comportamiento de campo abierto en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) y *wildtype* de 6 a 24 semanas de edad. Los histogramas muestran el porcentaje de cambio respecto al control de distintos parámetros analizados durante 30 min del test de campo abierto. **A)** Parámetros que sufrieron cambio a las 6 semanas, durante los minutos 0-5 de experimento. **B)** Parámetros que sufrieron un cambio significativo a las 12 semanas, durante los minutos 0-5 de experimento. **C)** Parámetros que sufrieron un cambio significativo a las 24 semanas, durante los minutos 5-30 de experimento. Se analizaron n=4 ratones *wildtype* y n=11 ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Las barras de error representan SD. (*p<0,05; **p<0,01).

3.2 Análisis de la coordinación motora

Ratones machos de cada genotipo con 6, 12, 24 y 32 semanas de edad, se sometieron a un test de coordinación motora usando una rueda giratoria o rota-rod para evaluar la capacidad de equilibrio y aprendizaje. Después de entrenar a los ratones a velocidad constante, se programó el aparato para una aceleración de 4 a 40 rpm durante 5 min y fueron analizadas 4 rondas (*trials*) a intervalos de 30 min y 1 h. El rendimiento fue evaluado midiendo la latencia hasta que los ratones se caían completamente o se agarraban al rodillo dando tres vueltas sin caminar sobre el mismo. En los test realizados a 6 y 12 semanas de edad no se observaron diferencias significativas en la coordinación motora de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) frente a los *wildtype* (**Fig.25 A y B**). Sin embargo, como se aprecia en las **Figuras 25 C y D** a partir de las 24 y 32 semanas de edad los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) presentaron una mayor tendencia a caer en las pruebas con aceleración frente a los *wildtype*.

En el promedio de las 4 rondas de las pruebas realizadas a 24 y 32 semanas de edad sólo entre el 27-36% de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) frente al 100% de los *wildtype* permanecieron en el rota-rod cuando éste llegaba a la velocidad máxima. El tiempo total promedio en el rodillo a las 24 y 32 semanas de edad fue de 204 ± 39 segundos para los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) frente a 263 ± 18 segundos para los ratones *wildtype* (Fig.25 E). Los resultados obtenidos en la última ronda de la prueba de aceleración a 6 y 32 semanas de edad mostraron una disminución de la latencia a caída a 32 semanas con respecto a 6 semanas de edad de un 13,46% en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) mientras que en los ratones *wildtype* la latencia a caída en el rota-rod a las 32 semanas no fue significativamente diferente con respecto a los resultados obtenidos a las 6 semanas de edad (Fig.25 F). Estos resultados muestran que existe una disminución progresiva de la coordinación motora en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T).

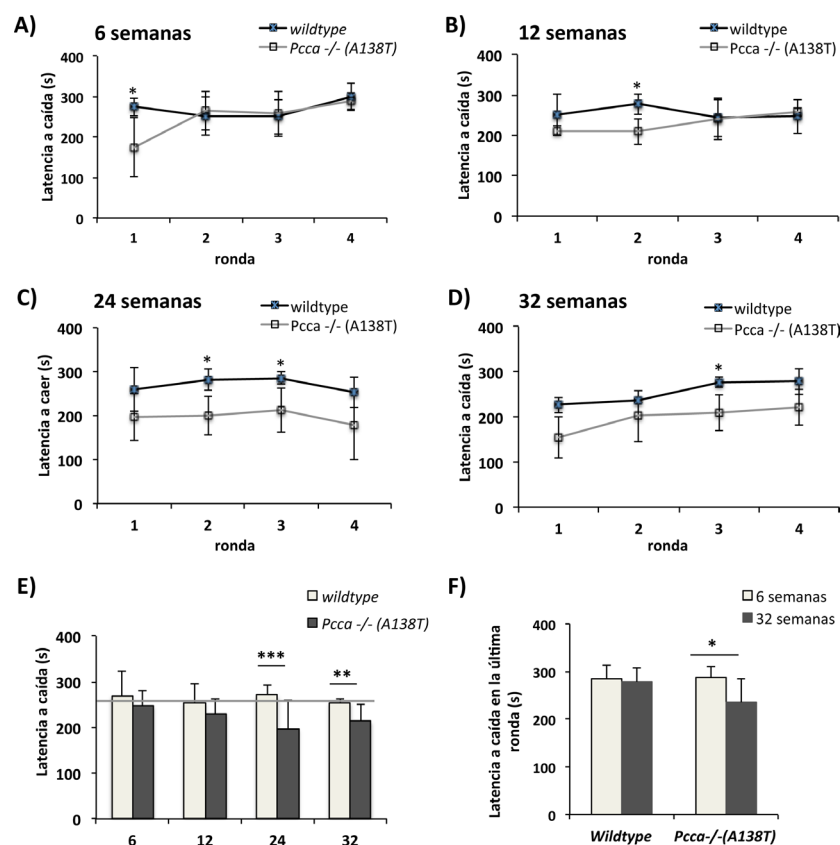


Fig.25 Análisis de la coordinación motora en ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) y *wildtype* de 6 a 32 semanas de edad mediante un rota-rod. Los histogramas muestran la media de la latencia a caída en segundos por ronda **A)** A las 6 semanas de edad. **B)** A las 12 semanas de edad. **C)** A las 24 semanas de edad. **D)** A las 32 semanas de edad. **E)** El histograma muestra la media de las 4 rondas a las distintas edades. **F)** Comparación de la latencia a caída en la última ronda a 6 y 32 semanas de edad. Se analizaron n=2-3 ratones *wildtype* y n=11 ratones *Pcca*^{-/-} (A138T). Las barras de error representan SD. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



A SENSITIVE ASSAY SYSTEM TO TEST ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR SPLICE SUPPRESSION THERAPY IN THE MOUSE LIVER

Antisense mediated splicing modulation is a useful tool that can be exploited in different ways as a promising therapy for rare genetic diseases. Efficacy of antisense therapy for splicing defects in cellular models of metabolic diseases, suppressing the use of cryptic splice sites or pseudoexon insertions, has been previously demonstrated in our lab. To date, no animal models with these defects are available. As an alternative, we propose exon skipping of the phenylalanine hydroxylase (*Pah*) gene expressed in liver and kidney to generate systemic hyperphenylalaninemia in mice as a sensitive *in vivo* assay to test splice suppression. Systemic elevation of blood L-Phe can be quantified using tandem MS/MS. Exon 11 and/or 12 skipping for the normal *PAH* gene was validated in hepatoma cells by comparing two oligonucleotide chemistries: morpholinos (PMO) and locked nucleic acids (LNAs). Subsequently, Vivo-morpholinos (VMO) were tested in wildtype and in phenotypically normal *Pah*^{enu2/+} heterozygous mice to target exon 11 and/or 12 of the murine *Pah* gene using different VMO dosing, mode of injection and treatment regimes. Consecutive intravenous injections of VMO resulted in transient hyperphenylalaninemia correlating with complete exon skipping and absence of PAH protein and enzyme activity. Sustained effect required repeated injection of VMOs. Our results provide not only a sensitive *in vivo* assay to test for splice-modulating antisense oligonucleotides, but also a simple method to generate murine models for genetic liver diseases.



4 Desarrollo de un sistema *in vivo* para probar la eficiencia de la modulación del *splicing* mediante oligonucleótidos antisentido

El uso de oligonucleótidos antisentido (AONs) para modular el *splicing* es una herramienta útil que está siendo explotada de diferentes maneras como una terapia prometedora en enfermedades genéticas. En el laboratorio se ha demostrado la prueba de concepto del potencial terapéutico de esta aproximación utilizando células de pacientes con EMH que presentan mutaciones de *splicing* específicas. Actualmente apenas existen animales modelo disponibles de enfermedades metabólicas con defectos de *splicing* que permitan validar la terapia antisentido. Con el objetivo de probar la eficiencia de AONs *in vivo* decidimos utilizar AONs dirigidos contra distintos exones del gen endógeno *Pah* para generar un transcrito no funcional y la ausencia de proteína y de actividad enzimática en hígado y riñón de ratón. La actividad PAH puede ser indirectamente monitorizada midiendo fácilmente la concentración de Phe en sangre, lo cual constituye un biomarcador sensible para probar la eficiencia *in vivo* del tratamiento antisentido.

115

4.1 Estudios *in vitro* en células Hep3B

El gen *PAH* humano está compuesto por 13 exones. Se ha descrito recientemente que el exon 11 presenta un sitio débil de *splicing* que es vulnerable a mutaciones que afectan a las secuencias reguladoras de *splicing* (Heintz *et al.*, 2012a). Además se ha descrito que mutaciones en el gen *PAH* de pacientes con PKU como c.1066-3C>T o c.1315+1G>A provocan *exon skipping* de los exones 11 y 12 respectivamente, y se asocian con un fenotipo de PKU severo (ver <http://www.pahdb.mcgill.ca> o <http://www.biopku.org>). Con el fin de probar la eficiencia *in vitro* para generar *exon skipping* se decidió dirigir el diseño de AONs contra estos exones, y además se compararon distintas químicas de oligonucleótidos disponibles comercialmente, de tipo PMO (oligonucleótido morfolino fosforodiamidato) y LNA (*Locked Nucleic Acid*). Los oligonucleótidos dirigidos contra los exones 11 y 12 del gen *PAH* humano y de ratón se muestran en la **Figura 26 A y B**.

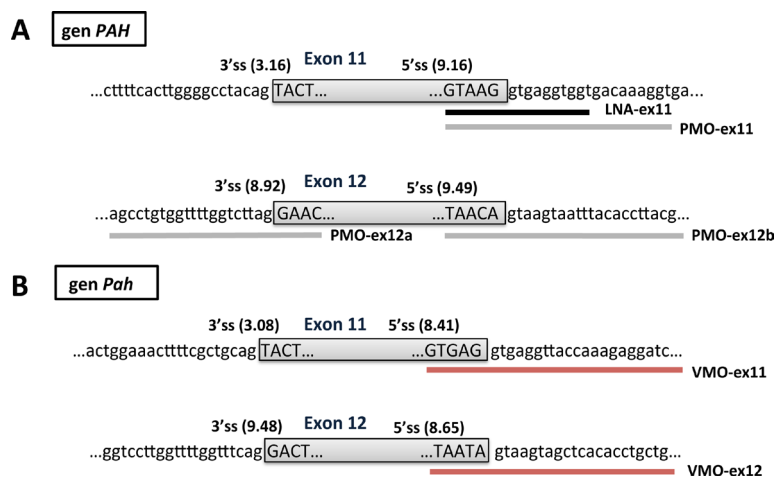


Fig.26 AONs utilizados en este trabajo. La figura muestra las secuencias de las regiones correspondientes a los exones 11 y 12 del gen **A) PAH** humano y **B) Pah** murino y las bases donde se unen los AONs diseñados. Las letras mayúsculas corresponden a bases exónicas y letras minúsculas a bases intrónicas. La extensión de los distintos AONs se indican con barras de colores: negro para LNA, gris para PMO y rojo para VMO. Los valores de *splicing* para los sitios 5' y 3' de *splicing* obtenidos mediante MaxEnt (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq_scoreseq.html) se indican entre paréntesis.

Los resultados de la transfección de células Hep3B con diferentes cantidades de PMO (2,5 – 20 μ M) y el análisis a las 24h por RT-PCR mostraron que dosis de 2,5 – 20 μ M PMO-ex11 son capaces de inducir eficientemente el *skipping* del exon 11 y provocar la ausencia de proteína PAH (**Fig.27 A y B**). Dosis inferiores a 2,5 μ M de PMO-ex11 provocaron un 70-85% de *skipping* del exon 11 (**Fig.27 C**), aunque también se observó un porcentaje de *exon skipping* en células sin tratar con PMO y tratadas con un PMO de secuencia aleatoria, lo cual confirma la vulnerabilidad del exon 11 para producir *exon skipping* (Heintz *et al.*, 2012a).

Los AONS dirigidos contra el exon 12 resultaron en un *exon skipping* parcial. Los mejores resultados se obtuvieron con una dosis de 10-20 μ M de PMO-ex12b dirigido contra el sitio 5' de *splicing*, que provocó un 70-84% de *exon skipping* y ausencia parcial de PAH (**Fig.27 A y B**).

Los resultados con LNA dirigido contra el sitio 5' de *splicing* del exon 11 sólo consiguieron un *skipping* parcial del exon 11 (57%) (**Fig.27 D**). Esta baja eficiencia nos llevó a plantearnos la posibilidad de acomplejar los LNA con dendrímeros carbosilanos catiónicos (2G-NN16 y BDBRo11, cedidos en colaboración por el Dr. R Gómez de la Universidad de Alcalá de Henares) con el objetivo de conseguir mejorar la eficiencia de transporte al interior de las células. Sin embargo, distintas proporciones o

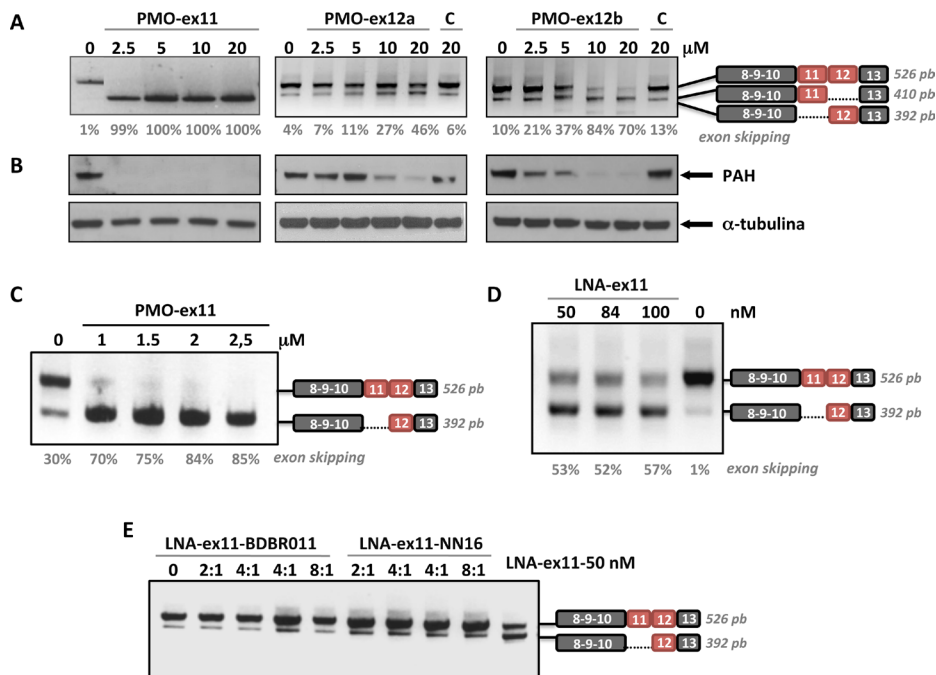


Fig.27 Tratamiento antisentido para suprimir la expresión de la proteína PAH humana en células Hep3B. Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional de células Hep3B tras el tratamiento con **A)** PMOex11, PMOex-12a y PMOex12b. Se muestra debajo de cada gel el porcentaje de *exon skipping*. **B)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con α -tubulina. **C)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional de células Hep3B tras el tratamiento con dosis inferiores a 2,5 μ M de PMO-ex11. **D)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional de células Hep3B tras el tratamiento con LNA-ex11. **E)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional de células Hep3B tras el tratamiento con LNA unido a los dendrímeros BDBR011 y NN16. La identidad de las bandas se muestra en forma de esquema al lado derecho de cada gel. C: oligonucleótido de secuencia aleatoria, utilizado como control negativo.

ratios de LNA-ex11-BDBR011 y LNA-ex11-NN16 no consiguieron incrementar el *skipping* del exon 11 (Fig.27 E).

4.2 Ensayos *in vivo* en ratones *wildtype*

Los resultados obtenidos *in vitro* junto con los informes de un posible riesgo de hepatotoxicidad (Swayze *et al.*, 2007) y baja especificidad de secuencia de los LNA (Aartsma-Rus *et al.*, 2004) hicieron centrar nuestro estudio en el uso de PMO dirigidos contra los exones 11 y 12 del gen *Pah* (Fig.26 B). Para asegurar un eficiente transporte y captación celular *in vivo* se emplearon Vivo-morfolinos (VMO), formados por un morfolino que lleva unido covalentemente un dendrímero de octaguanidina rico en argininas que facilita el transporte a través de las membranas celulares tras la administración sistémica.

En ratones *wildtype*, se llevaron a cabo dos inyecciones consecutivas de 10 y 12,5 mg/kg, o 4 inyecciones consecutivas de 12,5 mg/kg, resultando en un total de dosis de 20, 25 y 50 mg/kg (ver esquema Fig.28 A). A continuación, los animales se sacrificaron 4 días después de la primera inyección y se analizó el perfil transcripcional por RT-PCR, los cantidad de proteína PAH por western

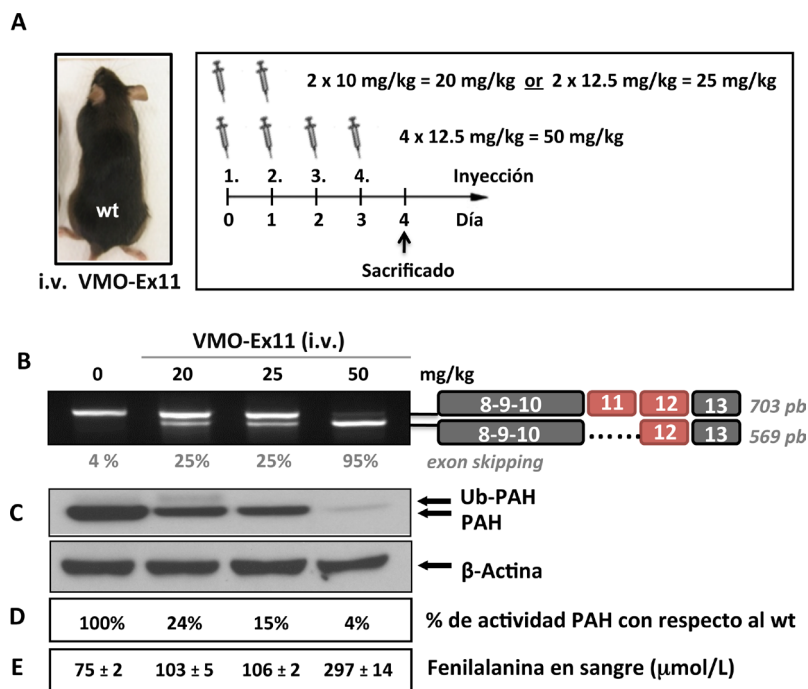


Fig.28 Tratamiento con VMO-Ex11 en ratones *wildtype*. **A)** Ratones *wildtype* fueron tratados con dos inyecciones intravenosas (i.v.) consecutivas de 10 y 12,5 mg/kg, correspondientes a una dosis total de 20 y 25 mg/kg, respectivamente o con 4 inyecciones i.v. consecutivas de 12,5 mg/kg, una dosis total de 50 mg/kg. Al día 4 después de la primera inyección los animales fueron sacrificados para su análisis como se muestra en el esquema. **B)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional del mRNA-*Pah* de muestras de hígado de ratones *wildtype* tras el tratamiento con distintas dosis de VMO-Ex11. A la derecha del gel se muestra un esquema con la identidad de las bandas y el % de exon skipping. **C)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con β -actina. **D)** % de actividad enzimática PAH con respecto a ratones *wildtype* (100%) sin tratar, en extractos de proteína de hígado. **E)** Niveles de fenilalanina en sangre determinados a día 4. Se muestran medias de duplicados y SD.

blot, la actividad enzimática PAH y los niveles de Phe en sangre. Los resultados en hígado del análisis por RT-PCR, mostraron casi un *skipping* total del exon 11 (95%) con la dosis total de 50 mg/kg de VMO-Ex11 (**Fig.28 B**). Aunque se observó una disminución significativa de la cantidad de proteína PAH (**Fig.28 C**) y de la actividad enzimática PAH (4% con respecto al control sin tratar) (**Fig.28 D**), los niveles de Phe en sangre tras esta dosis de 50 mg/kg mostraron sólo un aumento moderado con respecto a los niveles normales (297 $\mu\text{mol/L}$; nivel normal de Phe en sangre $<100 \mu\text{mol/L}$) (**Fig.28 E**). Estos resultados indican que para conseguir un *skipping* total en ratones *wildtype* es necesario incrementar la dosis de VMO-Ex11, sin embargo altas dosis de VMO en general se asocian con una alta toxicidad.

4.3 Ensayos *in vivo* en ratones *Pah*^{enu2/+}

El siguiente objetivo fue probar la eficiencia de *exon skipping* en los ratones *Pah*^{enu2/+}, los cuales presentan una deficiencia parcial de PAH en hígado pero mantienen los niveles de Phe dentro del rango de la normalidad. Con este modelo se incrementó la probabilidad de conseguir disminuir la actividad PAH por debajo de un 5% y así mimetizar el fenotipo PKU con una dosis menor de oligonucleótidos antisentido. Inicialmente se probó con una sola inyección i.v. de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 y se analizaron los niveles de fenilalanina en sangre y la actividad enzimática PAH. Los resultados mostraron un rango de 5-6% de actividad PAH, sin embargo, los niveles de Phe en sangre

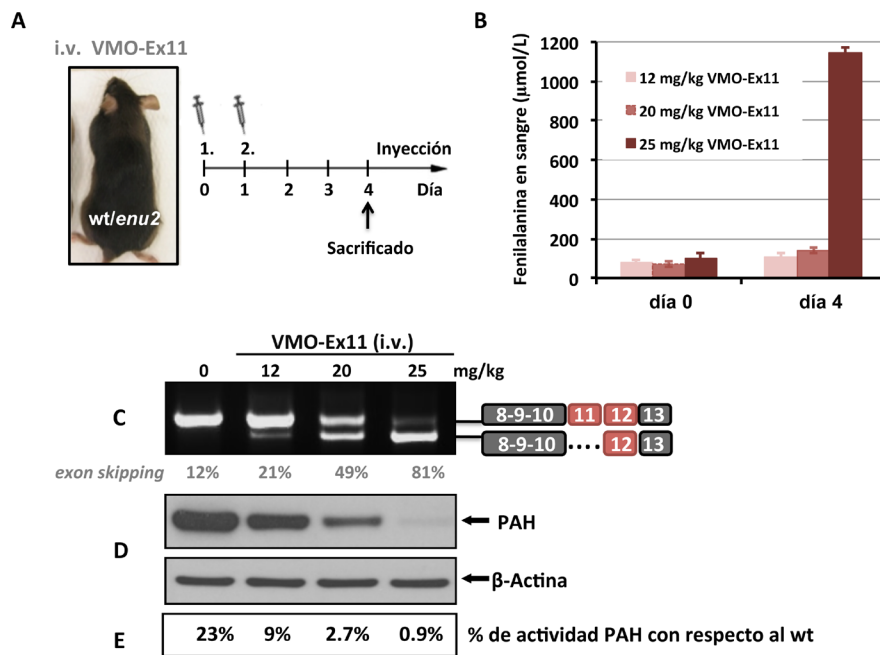


Fig.29 Tratamiento con VMO-Ex11 en ratones *Pah*^{enu2/+}. **A)** Se trataron ratones *Pah*^{enu2/+} con dos inyecciones i.v. consecutivas de 6, 10 y 12,5 mg/kg de VMO-Ex11, correspondientes a una dosis total de 12, 20 y 25 mg/kg, respectivamente y fueron sacrificados a día 4 después de la primera inyección. **B)** Niveles de fenilalanina en sangre determinados a día 4. Se muestran medias de duplicados y SD. **C)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional en hígado de ratones *Pah*^{enu2/+} tras el tratamiento con 12, 20 y 25 mg/kg de VMO-Ex11. A la derecha del gel se muestra un esquema con la identidad de las bandas y debajo el % de *exon skipping*. **D)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con β -actina. **E)** % de actividad enzimática PAH relativa al *wildtype* sin tratar (100%) en extractos de proteína de hígado.

se mantuvieron normales, por lo que se procedió a inyectar VMO-Ex11 a distintas dosis (12, 20 y 25 mg/kg) (**Fig.29 A**). Tras sacrificar a los animales al 4º día después de la primera inyección, el efecto del tratamiento con 12 y 20 mg/kg de VMO-Ex11 resultó en un *skipping* parcial (**Fig.29 C**), una actividad PAH relativa al *wildtype* de un 9 y 2,7%, respectivamente (**Fig.29 E**), y niveles normales de fenilalanina en sangre (**Fig.29 B**).

En los ratones *Pah*^{enu2/+} tratados con una dosis de 25 mg/kg de VMO-Ex11 los niveles de Phe en sangre aumentaron hasta valores correspondientes a una HPA severa (1,144 µmol/L), lo cual se corresponde con una mínima cantidad de transcritos de mRNA-*Pah*, casi ausencia de proteína PAH y un porcentaje de actividad enzimática PAH por debajo de un 1% (**Fig.29 B,C,D y E**).

Tras determinar un régimen de dos inyecciones consecutivas y una dosis final de 25 mg/kg como dosis óptima, se evaluó la eficacia a través de una vía de administración más sencilla como es la inyección intraperitoneal (i.p). Tratamos ratones *Pah*^{enu2/+} con la pauta y dosis óptima y se observó sólo un *skipping* parcial que se tradujo en un 20% de actividad PAH relativa al control sin tratar y niveles normales de Phe en sangre (<100 µmol/L).

Para demostrar que ambos alelos del ratón *Pah*^{enu2/+} responden de la misma manera al tratamiento con VMO-Ex11 se secuenció la banda obtenida mediante RT-PCR del perfil transcripcional normal y la banda correspondiente al *skipping* del exon 11 de muestras de hígado de un ratón *Pah*^{enu2/+} tratado con VMO-Ex11. Los resultados de la purificación y secuencia de ambas bandas mostraron que los picos de la mutación enu2 c.789T>C están igualmente representados, excluyendo cualquier preferencia del VMO-Ex11 por alguno de los transcritos (**Fig.30**).

Para determinar la duración del efecto *in vivo* del VMO, se trataron ratones *Pah*^{enu2/+} con dos inyecciones consecutivas i.v. de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 y se sacrificaron los animales a día

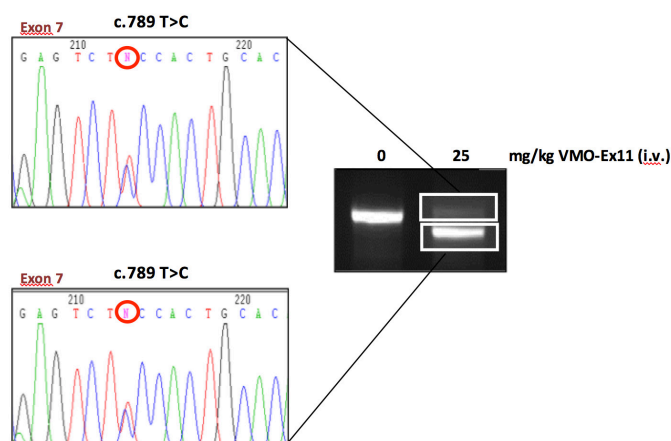


Fig.30 Análisis por secuenciación de los transcritos obtenidos tras el tratamiento con VMO-Ex11. El círculo rojo en los cromatogramas señala la mutación enu2 c.789T>C.

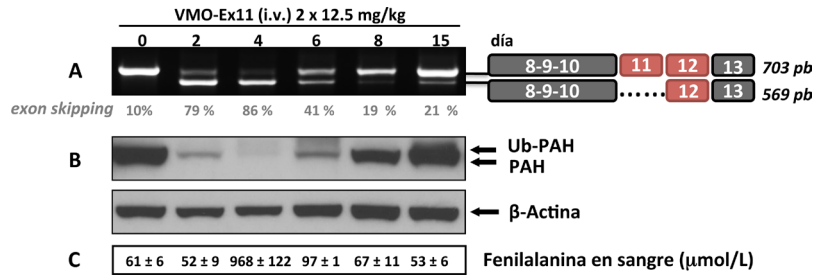


Fig.31 Duración del efecto del tratamiento con VMO-Ex11 en ratones *Pah^{enu2/+}*. Se trataron ratones *Pah^{enu2/+}* con dos inyecciones consecutivas de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 y se sacrificaron a día 0, 2, 4, 6, 8, y 15. **A)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional en hígado de ratones *Pah^{enu2/+}* tras el tratamiento con 25 mg/kg de VMO-Ex11. A la derecha del gel se muestra un esquema con la identidad de las bandas y debajo el % de *exon skipping*. **B)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con β-actina. **C)** Niveles de fenilalanina en sangre determinados el día del sacrificio del animal. Se muestran medias de duplicados y SD. El número de animales que se empleó por día de análisis fue n=2.

0, 2, 4, 6, 8, y 15 para analizar el porcentaje de *exon skipping*, la cantidad de proteína PAH y los niveles de Phe en sangre. Los resultados mostraron que el tratamiento con VMO-Ex11 tiene un máximo de efectividad a día 4 después de la primera inyección, presentando altos niveles de Phe en sangre ($968 \pm 122 \mu\text{mol/L}$) (**Fig.31 A**) y que además el efecto es reversible. A día 6 después de la primera inyección se recuperan los niveles normales de Phe en sangre y se incrementa la cantidad de proteína PAH (**Fig.31 A, B y C**).

Con el objetivo de demostrar la capacidad del uso de AONs para fenocopiar enfermedades genéticas en animales modelo se analizó la dosis y pauta de tratamiento con VMO-Ex11 necesaria

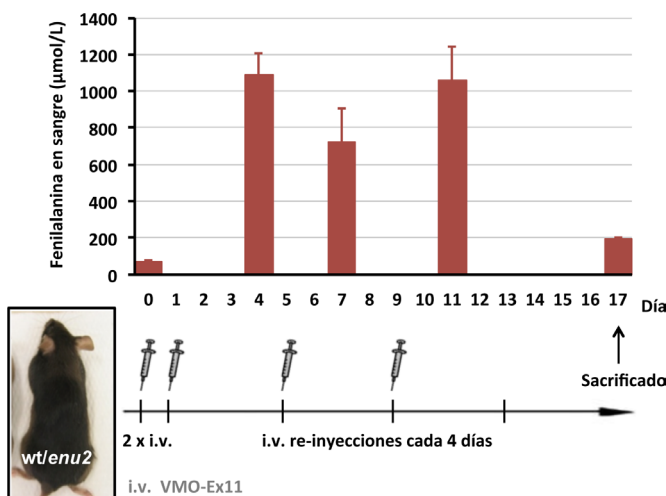


Fig.32 Niveles de L-Phe en sangre en ratones *Pah^{enu2/+}* tras el tratamiento continuado con VMO-ex11. Se monitorizaron los niveles de fenilalanina en un ratón heterocigoto *Pah^{enu2/+}* tratado inicialmente con 25mg/kg de VMO-Ex11 y reinyecciones cada 4 días. Los valores representados son medias de duplicados y las barras de error representan SD.

para mantener el fenotipo de HPA en ratones *Pah*^{enu2/+}. La eliminación de Phe en sangre inducida por la administración de VMO depende no sólo del índice de expresión del mRNA-*Pah* sino también de la vida media del VMO y de la proteína PAH. Los resultados mostraron que tras dos inyecciones consecutivas vía i.v de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 se consigue el máximo de eficiencia del VMO al 4º día después de la primera inyección siendo necesario re-inyectar dosis de 12,5 mg/kg cada 4 días (**Fig.32**) para mantener los niveles de Phe entre 700 y 1100 µmol/L, valores equivalentes a un fenotipo suave de PKU (Blau *et al.*, 2010).

Dado que se había descrito que el exon 11 del gen *PAH* tiene un sitio débil de *splicing* que es vulnerable a mutaciones que afectan a la secuencias reguladoras (Heintz *et al.*, 2012a) se planteó si el uso de VMO dirigidos contra el sitio 5' de *splicing* de otro exon mostraría la misma eficiencia de *exon skipping* que el VMO-Ex11. Para ello se trataron ratones *Pah*^{enu2/+} con dos inyecciones consecutivas vía i.v. de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 o VMO-Ex12. El análisis del perfil transcripcional, de la cantidad de proteína, de actividad enzimática PAH y los niveles de Phe en sangre mostraron un resultado

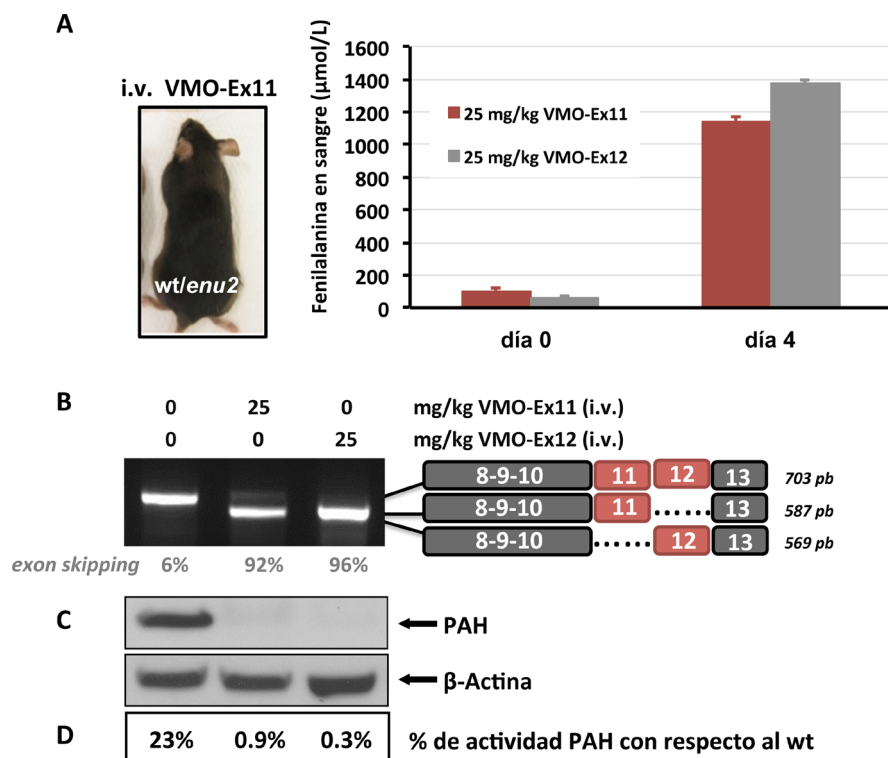


Fig.33 Análisis del efecto de VMOs dirigidos contra el exon 11 o el exon 12. Se trataron ratones *Pah*^{enu2/+} con dos inyecciones i.v. consecutivas de 12,5 mg/kg de VMO-Ex11 o VMO-Ex12 y fueron sacrificados a día 4 después de la primera inyección. **A)** Niveles de fenilalanina en sangre determinados a día 4. Se muestran medias de duplicados y SD. **B)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional en hígado de ratones *Pah*^{enu2/+} tras el tratamiento con 25 mg/kg de VMO-Ex11 o VMO-Ex12. A la derecha del gel se muestra un esquema con la identidad de las bandas y debajo el % de *exon skipping*. **C)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con β-actina. **D)** % de actividad enzimática PAH relativa al *wildtype* sin tratar (100%) en extractos de proteína de hígado.

similar en ambos casos (**Fig.33**). También se realizó un análisis del tratamiento combinado mediante una inyección de una mezcla de VMO-ex11 y VMO-ex12 a una concentración final de 25 mg/kg. Los resultados mostraron que no hay un efecto sinérgico, obteniéndose sólo un *skipping* parcial.

122

En ratones, la PAH se expresa principalmente en hígado pero existe también una considerable expresión en riñón (Heintz *et al.*, 2012b). Se analizaron también los niveles de mRNA-*Pah*, proteína y actividad enzimática de la PAH en muestras de riñón, observando un efecto similar al obtenido en hígado. Los resultados en riñón confirman que la administración de VMO vía i.p es menos eficiente (**Fig.34**) y que los VMOs dirigidos contra el exon 11 o el exon 12 muestran una eficiencia similar *in vivo*.

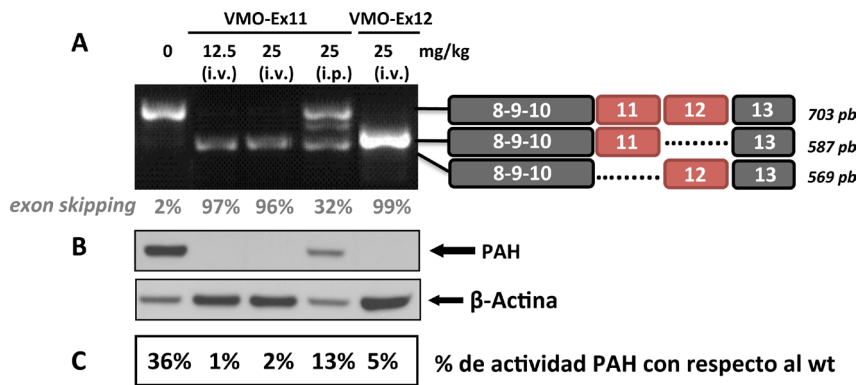


Fig.34 Análisis de muestras de riñón de ratones *Pah^{enu2/+}* tratados con VMO-Ex11 o VMO-Ex12. Se trataron ratones *Pah^{enu2/+}* con una o dos inyecciones (i.v. o i.p.) consecutivas de 12,5mg/kg de VMO-Ex11 o VMO-Ex12 y fueron sacrificados a día 4 después de la primera inyección. **A)** Análisis mediante RT-PCR del perfil transcripcional en muestras de riñón de ratones *Pah^{enu2/+}* tras el tratamiento con 12,5 o 25mg/kg de VMO-Ex11 o VMO-Ex12 (i.v. o i.p.). A la derecha del gel se muestra un esquema con la identidad de las bandas y debajo el % de *exon skipping*. **B)** Análisis por western blot de los niveles de proteína PAH, el panel de abajo muestra el control de carga con β-actina. **C)** % de actividad enzimática PAH relativa al *wildtype* sin tratar (100%) en extractos de proteína de riñón.

Discusión



1 Caracterización funcional de nuevos genotipos en acidemia propiónica

El análisis estructural y funcional de nuevos genotipos en AP nos ha permitido confirmar el efecto patogénico de las variantes analizadas y profundizar en los mecanismos moleculares implicados en cada variante. Esto nos permite estimar la severidad de las mutaciones y poder predecir la evolución de la enfermedad estableciendo una posible relación genotipo-fenotipo. Hasta la fecha se han descrito 101 mutaciones en el gen *PCCA* (44% mutaciones *missense*, 18% mutaciones de *splicing*, 18% grandes deleciones, 20% pequeñas inserciones y deleciones) y 102 mutaciones en el gen *PCCB* (59% mutaciones *missense*, 14% mutaciones de *splicing*, 3% grandes deleciones y 24% pequeñas inserciones y deleciones) (*Human Gene Mutation Professional Database*, Mayo 2015). En este trabajo hemos analizado molecularmente fibroblastos de 10 pacientes, 8 deficientes en *PCCA* y 2 deficientes en *PCCB*, y hemos caracterizado funcional y estructuralmente 5 nuevos cambios que no habían sido descritos con anterioridad, dos de ellos mutaciones en el gen *PCCB* (p.G188R y p.G255S) y tres en el gen *PCCA* (p.E148G, p.R288G y p.K298R).

La localización del residuo R288 en la estructura del nuevo modelo por homología del holoenzima hPCC (modelado por el servicio de bioinformática del CBM) sitúa la arginina cerca del sitio activo. Esta arginina está altamente conservada en el dominio biotina carboxilasa. El cambio de tamaño en la cadena lateral tras la sustitución de una arginina por una glicina provoca cambios en el patrón de enlaces de hidrógeno, perdiendo probablemente las interacciones con T334 y Q273 y favoreciendo la desestabilización de la lámina β donde se localiza. La expresión de la mutación en el sistema eucariota muestra una actividad residual de sólo un 3% de actividad PCC. Esto está de acuerdo con las predicciones *in silico* que muestran la patogenicidad del cambio p.R288G.

En el caso del cambio p.E148G, el residuo de glutamina interacciona mediante un enlace de hidrógeno y un puente salino con N351 y R353, respectivamente. Estos residuos forman a su vez enlaces de hidrógeno con el grupo γ fosfato del ATP proporcionando una posición adecuada para la catálisis. Predeciblemente el cambio de la glutamina por una glicina dificulta las interacciones con N351 y R353 excluyendo la orientación correcta de los grupos fosfato de la molécula de ATP. El residuo homólogo a R353 en la estructura biotina carboxilasa de *E. coli* corresponde a R292. Este residuo forma una interacción bidentada a través del grupo guanidino de la cadena lateral con dos de los átomos de oxígeno del bicarbonato en la biotina carboxilasa de *E. coli*. El cambio del residuo R292 por una alanina resulta en una disminución de 1.000 veces la actividad ATPasa dependiente de biotina, sin afectar a la K_m de la biotina (Blanchard *et al.*, 1999). El análisis *in silico* mediante programas bioinformáticos predijo la patogenicidad de la mutación, que finalmente fue confirmada mediante el análisis de actividad *in vitro* mostrando una actividad residual <3%.

En la mutación p.K298R el cambio de una lisina por una arginina que posee un grupo guanidino más grande puede desplazar el residuo catalítico E357 alterando la actividad de la enzima. En la proteína homóloga, biotina carboxilasa de *E. coli*, el cambio de la correspondiente lisina por una glutamina se ha descrito que altera la actividad enzimática (Levert *et al.*, 2000). La actividad residual <2% observada *in vitro* y el análisis *in silico* confirman la patogenicidad.

Es posible que la mutación p.G188R cause una distorsión en la hélice $\alpha 3$ debido a la formación de un puente salino entre la arginina mutada y D382. Esto estaría conforme con la predicción *in silico* que cataloga el cambio como una mutación dañina. Sin embargo, aunque p.G188R es no conservativa y la cadena lateral de la arginina es bastante voluminosa, existe la posibilidad de que el cambio sea acomodado en la estructura, ya que el espacio suficiente entre la región C-terminal de ambas subunidades β y la falta de estructura secundaria proporciona la flexibilidad necesaria para ello. Además el análisis *in vitro* mostró una actividad residual entre el 8-18%.

La mutación p.G255S pueden inducir un cambio en el patrón de enlaces de hidrógeno del residuo R410 que interaccionaría con el nuevo residuo de serina en lugar de interaccionar con el residuo Y336. El aminoácido G255 no es un residuo conservado, lo que sugiere que no es esencial para la actividad de la enzima PCC. De hecho, la sustitución del residuo de glicina por una serina es un cambio presente en la propionil-CoA carboxilasa de *Ruegeria pomeroyi*. Sin embargo, en este caso, el residuo Y336 está también sustituido por una fenilalanina, de manera que el enlace de hidrógeno se establece con una arginina presente en la misma cadena, mientras que esta arginina es sustituida por una valina en la proteína humana. El análisis *in silico* de la mutación p.G255S fue predicho como dañino por MutPred y Polyphen, sin embargo, se pronosticó como un cambio tolerado por SIFT. Este hecho pone de relieve la necesidad de utilizar varios programas predictivos (Thusberg *et al.*, 2011) y de confirmar la patogenicidad mediante estudios *in vitro*. En este caso, la mutación p.G255S presentó una actividad residual *in vitro* elevada (63,8%), lo cual se corresponde con el análisis estructural y la falta de conservación del residuo en distintas especies. Aunque estos datos argumentan en contra de su potencial patogenicidad, el cambio de nucleótido no fue encontrado en la secuencia de más de 5.000 individuos, según el servidor de variantes exómicas (Exome Variant Server <http://evs.gs.washington.edu/EVS>). Este cambio (c.763 G>A) en el último nucleótido del exon 7 del gen *PCCB* está dentro de la secuencia consenso del sitio 5' donador de *splicing*, por lo cual podría alterar el proceso de *splicing*. El análisis *ex vivo* mediante minigenes mostró un defecto parcial en el proceso de *splicing*. Estos resultados resaltan la necesidad de evaluar cuidadosamente el efecto de cada cambio nucleotídico en el proceso de *splicing*, incluso aquellos cambios que se sitúan fuera de los sitios consenso, para evitar clasificaciones erróneas, un hecho cada vez más evidente como se muestra en la literatura (Nielsen *et al* 2007). En el caso que presentamos en este trabajo, el análisis del perfil de transcripción en los fibroblastos del paciente no sugirió un posible defecto en el proceso de *splicing*, posiblemente debido a la degradación de transcritos aberrantes por el sistema NMD o por diferentes eficiencias de *splicing* en los fibroblastos en comparación con las células hepáticas. Los programas bioinformáticos son útiles para predecir cambios en la eficiencia de los sitios de *splicing*, aunque es necesario una confirmación definitiva del posible defecto mediante el uso de minigenes. En nuestro caso, el análisis de minigenes también indicó la posible presencia de transcritos normales con el cambio p.G255S, lo cual se correlaciona con los resultados de RT-PCR en fibroblastos y con el fenotipo leve que muestra el paciente, que puede ser atribuido a la alta actividad residual de la proteína mutante p.G255S.

El mapeo de las mutaciones causantes de enfermedad en el gen *PCCA* muestra que la mayoría de las mutaciones en la subunidad α afectan a residuos fuera del sitio activo y se predice que desestabilizan la enzima o interfieren con la unión al holoenzima, como muestran algunos estudios de expresión (Desviat 2004). Sin embargo, en este trabajo hemos presentado 3 mutaciones

en el gen *PCCA* (p.E148G, p.K298R y p.R288G) que se localizan próximas al centro activo con una actividad residual inferior al 3%. La mayoría de las mutaciones descritas en la subunidad β , afectan a residuos localizados cerca del centro activo alterando potencialmente la unión del cofactor y/o a la catálisis (Huang 2010). En este trabajo hemos presentado dos mutaciones *missense* en el gen *PCCB* (p.G188R y p.G255S) que se localizan en la interfase β - β y presentan una moderada y elevada actividad residual, respectivamente.

Aunque se han descrito algunas asociaciones entre ciertas mutaciones y fenotipos clínicos de enfermedad (leve o severo), en general no se ha observado una estrecha correlación entre el fenotipo y el genotipo (Kraus *et al.*, 2012; Perez-Cerda *et al.*, 2000). En este trabajo encontramos cierta relación entre aquellas presentaciones tardías con un fenotipo leve y aquellas mutaciones que retienen cierta actividad residual. Éste es el caso del paciente P10, asintomático hasta los 14 meses, que porta en un alelo la mutación c.763 G>A, mutación parcial de *splicing*, que resulta en cierta cantidad de transcritos correctamente procesados codificantes para una proteína mutante con una alta actividad residual. Y el paciente P9, quien fue asintomático hasta los 15 años de edad y porta dos mutaciones leves p.G188R y p.N536D que mostraron una elevada actividad residual *in vitro* (Desviat *et al.*, 2004). Por otro lado, aquellas mutaciones *missense* que presentaron una actividad residual <2%, están presentes en ambos alelos de aquellos pacientes que manifestaron una presentación neonatal de la enfermedad. Estos resultados están en línea con otras publicaciones que describen una correlación directa en algunas mutaciones específicas (Perez-Cerda *et al.*, 2000).

2 Estudios *in vitro*: estrés oxidativo y tratamiento con antioxidantes en acidemia propiónica

Numerosos estudios relacionan el estrés oxidativo con la patogenia de enfermedades neurodegenerativas (Mota *et al.*, 2015; Trushina y McMurray, 2007), enfermedades mitocondriales (Wu *et al.*, 2010) y errores congénitos del metabolismo (Ribas *et al.*, 2011; Richard *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2009). En este trabajo hemos demostrado por primera vez la existencia de un incremento en los niveles de ROS intracelular y células apoptóticas en fibroblastos de pacientes con AP. Además, hemos demostrado que una expresión transitoria de la enzima PCC en fibroblastos de pacientes (que recupera un 30% de actividad), consigue disminuir entre un 50-60% los niveles de ROS intracelular. Estos resultados sugieren que una disfunción en la enzima PCC puede alterar la producción de ROS. Los niveles de ROS están influenciados por diversos factores, incluyendo perturbaciones en la cadena respiratoria, oxidación de lípidos y la acumulación de metabolitos tóxicos entre otros. Algunos pacientes con AP presentan bajos niveles de GSH en plasma lo que les hace más vulnerables al estrés oxidativo (Salmi *et al.*, 2012). Los pacientes P1, P2 y P3 que presentan deleciones y mutaciones que afectan al marco de lectura y cursaron con una presentación severa de la enfermedad, mostraron niveles de ROS intracelular y apoptosis elevados. A pesar de la variabilidad observada en los niveles de ROS entre los fibroblastos de los pacientes analizados, se observa cierta relación entre los niveles más altos de ROS y mutaciones funcionalmente nulas en pacientes que mostraron preferentemente una presentación neonatal. También observamos algunos fibroblastos de pacientes (P4 y P5) que no mostraron cambios en los niveles de ROS con respecto a los controles. Esto está de acuerdo con

otros casos donde se ha descrito una disminución en la producción de ROS y enzimas antioxidantes (CAT y SOD), lo que sugiere que el estrés oxidativo puede no estar sistemáticamente incrementado en deficiencias OXPHOS (de Keyzer *et al.*, 2009). La mitocondria constituye una de las principales fuentes de ROS en la célula. H₂DCFDA es una de las sondas más empleadas para determinar ROS, sin embargo, sólo permite determinar los niveles intracelulares de H₂O₂ y ONOO⁻ sin determinar su origen. Aunque nuestros resultados no demuestran directamente la procedencia mitocondrial del incremento de ROS, si observamos una inducción de SOD2, un marcador de la producción de ROS mitocondrial. Este aumento de SOD2 podría constituir un mecanismo compensatorio ante el incremento de los niveles de O₂⁻ mitocondrial, como ocurre en otras enfermedades (Chandler *et al.*, 2009; Kunishige *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2013). Varios estudios han demostrado que la inducción de SOD2 puede proteger contra condiciones neurotóxicas (Holley *et al.*, 2012) y cardiomiopatías (French *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2006).

Las estructuras de la mitocondria en forma de grano se han relacionado con la fisión mitocondrial, un mecanismo implicado en el mantenimiento de la función mitocondrial, en la preservación del DNA mitocondrial y en la apoptosis (Suen *et al.*, 2008). El análisis de la morfología mitocondrial mostró que los fibroblastos de los pacientes P2 y P6 presentaron un mayor número de estructuras en forma de grano con respecto a los fibroblastos control. Este incremento de la fisión mitocondrial podría estar relacionado con los elevados niveles de ROS observados en los fibroblastos de estos pacientes, como se muestra también en otras acidemias orgánicas (Brasil *et al.*, 2015). Además, la fisión mitocondrial participa activamente en el proceso inicial de apoptosis (Otera y Mihara, 2012; Youle y Karbowski, 2005) lo que se relaciona con el aumento del número de células apoptóticas observado en P2 y P6.

En cuanto a las quinasas de estrés, existen evidencias de que una fuerte activación de p38 MAPK está asociada con apoptosis, mientras que bajos niveles de p38 MAPK tienden a asociarse con supervivencia (Cuadrado y Nebreda, 2010). Además la producción de ROS puede activar directa o indirectamente varias proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en múltiples tipos celulares (Cosentino-Gomes *et al.*, 2012; McCubrey *et al.*, 2006; Son *et al.*, 2011). ROS puede activar estas vías mediante la modificación de proteínas quinasas intracelulares (MAP3Ks) y la inactivación de quinasas fosfatasa activadas por mitógenos (MKPs). El mayor mecanismo por el cual estas proteínas pueden ser modificadas implica la oxidación de residuos de cisteína sensibles a cambios redox (Cosentino-Gomes *et al.*, 2012). La activación de p38 MAPK y JNK presenta un patrón similar en los fibroblastos de los pacientes con AP analizados, lo que podría indicar que la activación esté desencadenada por una MAP3K capaz de activar simultáneamente ambas vías. El efecto de ROS sobre la activación de MAPK depende de múltiples factores como la concentración, la cinética y el sitio de producción de ROS, la cantidad de antioxidantes celulares y el estado redox (Son *et al.*, 2011). Estos factores, junto con otros estímulos que podrían estar activando estas vías, podrían explicar la variabilidad de respuesta observada en los fibroblastos de los pacientes que no mostraron un aumento de ROS. Más estudios son necesarios para poder determinar por qué estas vías están sobreactivadas y sobre qué sustratos actúan p38 MAPK y JNK, ya que ambas quinasas están implicadas en múltiples procesos como la proliferación, diferenciación, inflamación, supervivencia, autofagia y apoptosis (Cuadrado y Nebreda, 2010; Cuenda y Rousseau, 2007; Zhou *et al.*, 2015).

Dada la posible implicación del estrés oxidativo en la patología de la enfermedad, una

estrategia adicional para el tratamiento de estos pacientes podría ser el uso de compuestos antioxidantes que actúen como un mecanismo complementario para neutralizar las especies reactivas de oxígeno. En este trabajo hemos demostrado que distintos antioxidantes son capaces de reducir con éxito la producción de ROS intracelular en fibroblastos de pacientes con AP, proporcionando por primera vez una evidencia de la viabilidad del uso del tratamiento antioxidante *in vitro* en esta enfermedad. Diferentes mecanismos pueden estar operando en las células deficientes en PCC tras el tratamiento con cada uno de los antioxidantes testados. El tratamiento con antioxidantes que se localizan preferentemente en la mitocondria como MitoQ y *tiron* proporcionaron una mayor disminución de los niveles de ROS intracelular, hasta un 80% y un 50%, respectivamente, en los fibroblastos de pacientes con AP, frente al tratamiento con aquellos antioxidantes que se localizan en el citosol. Esto parece indicar que la mitocondria podría ser la mayor fuente de ROS y que el anión superóxido podría contribuir críticamente al daño oxidativo en los fibroblastos de pacientes deficientes en PCC. MitoQ ha demostrado ser capaz de mitigar el daño oxidativo en varios animales modelo (Smith y Murphy, 2010) incluyendo Alzheimer (McManus *et al.*, 2011) y Parkinson (Ghosh *et al.*, 2010). El tratamiento con trolox y resveratrol consigue una disminución más moderada de los niveles intracelulares de ROS (15-30%) este hecho puede ser debido a que su acción se centra más en evitar las consecuencias del estrés oxidativo frente a la acción de otros antioxidantes que actúan directamente como potentes neutralizadores de ROS. Trolox potencia la eliminación de los radicales peroxilo lipídicos evitando la desestabilización de las membranas y el daño oxidativo a DNA (Marchetti *et al.*, 2015). Además se ha descrito que trolox previene el efecto inhibitorio de los complejos de la CTE provocado por el cúmulo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en jarabe de arce (MSUD) (Ribeiro *et al.*, 2008). La función protectora del resveratrol es atribuible principalmente a sus efectos sobre las enzimas redox (Saeidnia y Abdollahi, 2013).

Superóxido dismutasa (SOD2) y glutatión peroxidasa (GPx1), son dos potentes enzimas antioxidantes que constituyen la primera defensa antioxidante en la mitocondria. La actividad o presencia de enzimas antioxidantes en las células está fuertemente regulada por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales como consecuencia de cambios en el estado redox (Evans *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran una posible alteración en las defensas antioxidantes, con una disminución en los niveles de GPx1 y un aumento de SOD2 en la mayoría de fibroblastos de los pacientes con respecto al control. GPx1 requiere de GSH para catalizar la reducción de peróxidos. En el plasma de pacientes con AP se ha descrito un incremento en la oxidación de tioles y una disminución de GSH, lo cual podría afectar a la actividad de la enzima GPx1 (Salmi *et al.*, 2012). El tratamiento con resveratrol aumenta los niveles de SOD2 y GPx1. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos que demuestran que el resveratrol reduce el estrés oxidativo modulando la expresión de SOD2 y GPx1 (Spanier *et al.*, 2009). Por otro lado, nuestros resultados muestran que el tratamiento con *tiron* disminuye los niveles de SOD2 y GPx1 en la mayoría de los fibroblastos de pacientes. La potente neutralización de O₂ mediada por *tiron* podría explicar la disminución de los niveles de SOD2 en los fibroblastos de pacientes con AP (Weidig *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en fibroblastos en cultivo deberían ser interpretados con cierta precaución, ya que no son el mejor modelo celular para reflejar la situación patológica. Sin embargo, pueden darnos pistas de la fisiopatología de la enfermedad y constituir una primera aproximación al uso de distintas terapias como hemos demostrado en este trabajo.

3 Estudios *in vivo*: caracterización del modelo murino hipomorfo de acidemia propiónica

El estudio de modelos animales de enfermedades humanas es una parte fundamental en la investigación biomédica, y en especial en el área de las enfermedades raras. El análisis del fenotipo de estos modelos resulta esencial para comprender la fisiopatología de la enfermedad, identificar nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos, así como para explorar nuevas aproximaciones terapéuticas. El uso del modelo hipomorfo *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel et al., 2013) nos ha permitido indagar en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad, centrándonos en la búsqueda de alteraciones en la disfunción mitocondrial, la presencia de estrés oxidativo en los principales órganos diana de la enfermedad, y la evaluación de la actividad locomotora y conductual.

El empleo del array de proteínas de fase reversa (RPPma) como una aproximación para identificar biomarcadores ha permitido estudiar la huella bienergética de distintos tipos de cáncer (Aldea et al., 2011). Sin embargo, son escasos los estudios que se han llevado a cabo en el análisis del proteoma metabólico en enfermedades raras (Santacatterina et al., 2015). En este trabajo analizamos algunas proteínas del metabolismo energético mediante RPPma en el modelo hipomorfo murino de AP. Los resultados han mostrado alteraciones evidentes, en los niveles de múltiples subunidades de los complejos OXPHOS, en el factor inhibidor 1 de la H⁺-ATP sintasa (IF1), en proteínas implicadas en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, como la subunidad α de la proteína trifuncional mitocondrial (TFP) y en enzimas antioxidantes (SOD2 y CAT) en los distintos órganos analizados (Fig. 35)

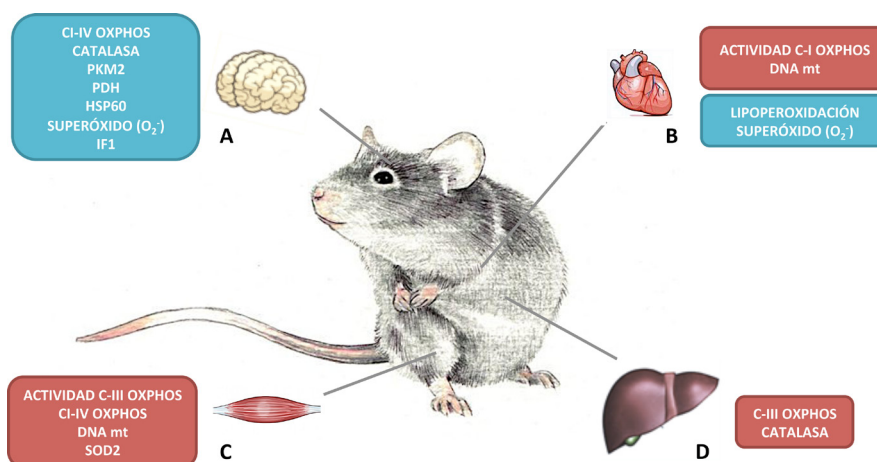


Fig.35 Esquema de las alteraciones encontradas en los distintos órganos de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). **A)** Cerebro; **B)** corazón; **C)** músculo; **D)** hígado. Los recuadros de color rojo indican disminución y los recuadros de color azul indican aumento. PDH (piruvato deshidrogenasa); IF1 (inhibidor de la H⁺ ATP sintetasa); PKM2 (piruvato quinasa); mt (mitocondrial); SOD2 (superóxido dismutasa).

Corazón: necesita un alta demanda energética para satisfacer la incesante actividad eléctrica y la acción contráctil del músculo cardiaco. Se estima que un 90% del ATP celular consumido en el corazón se produce en la fosforilación oxidativa (Harris y Das, 1991). La disminución observada en los niveles de H⁺-ATP sintasa, el principal regulador de la fosforilación oxidativa, puede alterar el flujo

de electrones a través de la CTE, incrementado la producción de ROS como se observa en los cortes histológicos de corazón de ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). El análisis de actividad de los complejos mostró un déficit en el complejo I y un aumento de la actividad CS. Este aumento de CS podría indicar una activación de la biogénesis mitocondrial como efecto compensatorio ante la reducción en el número de copias de DNA mitocondrial observado. El aumento de peroxidación lipídica podría alterar el flujo de electrones de la CTE incrementando la producción de ROS y potenciando el daño oxidativo a otras moléculas (Reed, 2011). Existen evidencias que indican que la disfunción mitocondrial puede afectar negativamente al funcionamiento de la actividad eléctrica cardíaca, alterando la homeostasis intracelular de iones y la excitabilidad de la membrana mediante la reducción de ATP y el incremento de ROS, lo que resulta en una mayor propensión a arritmias cardíacas (Brown y O'Rourke, 2010; Yang *et al.*, 2014). La disminución de los niveles de subunidades de los complejos de la CTE y de la cantidad de DNA mitocondrial, y el aumento de ROS observado en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) parece confirmar la existencia de una disfunción mitocondrial. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio más profundo analizando el potencial de membrana mitocondrial y posibles alteraciones en los canales iónicos y los niveles de ATP.

Músculo esquelético: uno de los principales procesos metabólicos que utiliza el músculo en los casos de una demanda energética rápida es la fosforilación oxidativa. El RPPma mostró una disminución en la subunidad 2 del núcleo del complejo III de la CTE en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Además, esta disminución se correlaciona con el déficit de actividad del complejo. Este déficit podría estar originado por una desestabilización en la formación del complejo, ya que la subunidad 2 del núcleo participa en el ensamblaje del mismo, y/o por el efecto inhibitorio de propionil-CoA en el interior de la mitocondria (Merinero *et al.*, 2011). Alteraciones en el transporte de electrones en el complejo III potencian la formación de ROS mitocondrial. Se ha descrito que el superóxido generado por el complejo III se libera asimétricamente a ambos lados de la membrana interna mitocondrial (Muller *et al.*, 2004; Xu y Arriaga, 2009). El DNA mitocondrial es particularmente susceptible al daño oxidativo por las especies reactivas generadas en la matriz. Un desequilibrio en la cantidad de nucleótidos trifosfato (NTPs) por la falta de interacción de la enzima succinil-CoA ligasa con la quinasa implicada en la síntesis de NTPs podría conducir a una depleción del DNA mitocondrial debido a una baja fidelidad de replicación (Fasullo y Endres, 2015). Defectos en los genes *SUCLA2* y *SUCLG1* causan depleción mitocondrial (Elpeleg *et al.*, 2005; Ostergaard *et al.*, 2007), sin embargo aún no se ha demostrado que la inhibición de la enzima succinil-CoA ligasa por el acumulo de propionil-CoA cause el mismo efecto (Brock y Buckel, 2004). Hipotetizamos que un incremento de ROS junto con la acumulación de propionil-CoA en la matriz podrían estar implicados en la disminución de DNA mitocondrial observada en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Además especulamos que esta disminución de DNA mitocondrial podría contribuir a los bajos niveles de aquellas subunidades de los complejos de la CTE codificadas por el DNA mitocondrial, como es el caso de la subunidad COX II del complejo IV. La disminución de los niveles de SOD2 puede potenciar la acumulación de superóxido en la matriz de las células del músculo esquelético, lo cual podría a su vez alterar la membrana interna mitocondrial y los complejos de la CTE, generando un posible círculo vicioso, donde la alteración de la CTE aumentaría la fuga de electrones, generando más ROS, que a su vez dañarían la CTE (Andreyev *et al.*, 2005).

Hígado: es el principal órgano donde se lleva a cabo el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y por lo tanto donde se genera una gran parte del propionato. Además juega un papel importante en el metabolismo lipídico, que constituye su principal fuente de energía. El análisis del RPPma mostró un perfil bioenergético similar al observado en corazón con una ligera disminución de los complejos de la CTE y una disminución más evidente en la subunidad α de I complejo mutienzimático TFP lo que podría estar favoreciendo la existencia de una acumulación de lípidos. Tinciones en cortes histológicos serían necesarios para confirmar su presencia. Además, se han descrito niveles elevados de triglicéridos en el plasma de ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel *et al.*, 2013) y la presencia de lípidos en las fibras musculares de pacientes con AP (Schwab *et al.*, 2006). Es interesante contemplar la posibilidad de que esta acumulación de lípidos tenga un posible papel protector contra el estrés y la disfunción mitocondrial (Aon *et al.*, 2014). Dado el acúmulo de una mayor cantidad de metabolitos tóxicos en el hígado cabría esperar observar una disfunción mitocondrial y por tanto un daño oxidativo mayor que en otros órganos. Sin embargo, nuestros resultados del análisis de lipoperoxidación no muestran daño oxidativo en el hígado de los ratones hipomorfos. Esto puede ser debido al hecho de que no es un órgano con tanta demanda energética como el músculo cardíaco o el cerebro (Wajner y Goodman, 2011) y otras vías alternativas pueden estar compensando la existencia de un posible déficit energético. Estudios en ratones modelo y pacientes con acidemia metilmalónica han mostrado la formación de megamitocondrias en el hígado. Tales megamitocondrias son específicas de tejido y dependientes de la edad (Chandler *et al.*, 2009), surgen como una combinación de fusión y crecimiento mitocondrial y su formación puede ser inducida por medios farmacológicos, a través de la dieta o por efectos tóxicos (Hoppel *et al.*, 2009). Lo que desencadena estos procesos y la importancia que tienen no está del todo claro. Aunque aún no existen evidencias que muestren la presencia de estos procesos en el hígado de pacientes con AP si se han observado cambios similares en el músculo esquelético (Schwab *et al.*, 2006).

Cerebro: requiere aproximadamente el 20% de la demanda de oxígeno y glucosa diaria (Sokoloff y Kety, 1960), en el periodo neonatal esta demanda energética puede ser incluso mayor. Nuestros resultados han mostrado un aumento evidente de la masa mitocondrial, una disminución en los niveles de H⁺-ATP sintasa y un incremento en la cantidad de IF1, el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa mitocondrial (Gledhill *et al.*, 2007), lo que sugiere una posible alteración en la fosforilación oxidativa. Existe la posibilidad de que el aumento observado en la cantidad de complejos I-IV de la CTE sea una respuesta compensatoria al efecto inhibitorio de IF1. La sobreexpresión de IF1 se ha descrito como una estrategia para inhibir la actividad de la H⁺-ATP sintasa y generar una señal de ROS que estimula la supervivencia, no sólo en células cancerígenas (Formentini *et al.*, 2012) sino también *in vivo* en neuronas de ratones que expresan un mutante de IF1 en cerebro (Formentini *et al.*, 2014). Especulamos que el incremento moderado de ROS observado en los cortes histológicos de cerebro de ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) podría estar implicado en una posible reprogramación metabólica en el cerebro. Esta reprogramación estimularía la vía glucolítica y /o la biosíntesis, como puede sugerir el aumento de los niveles de piruvato kinasa, ofreciendo un mecanismo compensatorio al déficit energético provocado por la intoxicación con propiónico. Se ha descrito que la sobreexpresión de IF1 protege a las células cancerígenas mediando la activación de NF κ -B y promoviendo la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-xL (Formentini *et al.*, 2012). Numerosos hallazgos corroboran la integración molecular y funcional de OXPHOS con la muerte celular (Alavian *et al.*, 2011; Santamaria

et al., 2006). Los estudios de apoptosis en cortes histológicos de cerebro de ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) no muestran un incremento en el número de células apoptóticas, lo cual apoya la posibilidad de que IF1 pueda estar jugando un papel protector en el cerebro de estos ratones. El cerebro tiene un alto contenido en lípidos y un activo metabolismo lipídico, el cual es particularmente requerido para la síntesis y mantenimiento de la mielina. Este ambiente rico en lípidos y en particular algunos tipos celulares, como los oligodendrocitos, son altamente susceptibles al daño oxidativo causado por ROS (Dewar *et al.*, 2003). Aunque se ha descrito un aumento de la carbonilación de proteínas en el cerebro de los ratones que sobreexpresan IF1, como consecuencia del incremento de ROS (Formentini *et al.*, 2014), nuestros resultados no muestran indicios de daño oxidativo a proteínas pero sí un incremento de peroxidación lipídica en el cerebro de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Además, en respuesta al incremento de ROS se observa un aumento en los niveles de algunas enzimas antioxidantes en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T). Dado que el cerebro es un órgano altamente dependiente de la demanda energética y por lo tanto de OXPHOS, cabría esperar poder observar un daño neurológico en el modelo murino de AP, dado que varios estudios muestran que el 75% de los pacientes presentan una discapacidad intelectual (Grunert *et al.*, 2013; Pena y Burton, 2012; Rafique, 2013a, b).

El estudio de la capacidad locomotora y exploratoria en ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) a las 6 semanas de edad mostró una menor actividad, reflejando un comportamiento más estático con respecto a los animales *wildtype*. Este comportamiento entraría dentro del fenotipo esperable, que podría reflejar la sintomatología de hipotonía y letargia que presentan los pacientes, principalmente durante el periodo neonatal. Sin embargo, la repetición del análisis del test de campo abierto a las 12 semanas de edad mostró un comportamiento en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) muy diferente al observado a las 6 semanas. Los ratones manifestaron un incremento significativo en las cuentas estereotípicas, en el tiempo y número de saltos, en la velocidad, así como una disminución en tiempo de descanso, estos parámetros se podrían relacionar con un estado de hiperactividad. Esta aparente tendencia hiperactiva y aumento de comportamientos repetitivos que presentan los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) durante el test podría estar relacionada con el pico máximo de concentración de metilcitrato y C3 que se ha descrito que presentan estos ratones entre las semanas 10-14 de edad (Guenzel *et al.*, 2015). El análisis a las 24 semanas mostró una normalización de la mayoría de los parámetros alterados, lo cual coincide con la disminución progresiva descrita en C3 y metilcitrato a partir de las semanas 16-20 de edad en el ratón *Pcca*^{-/-}(A138T). Esta disminución natural en los niveles de C3 y metilcitrato podría relacionarse con los altibajos de la tasa metabólica basal y la disminución en el consumo de comida a medida que envejecen (Guenzel *et al.*, 2015). El máximo de concentración de C3 y metilcitrato a las 10-14 semanas en estos ratones podría indicar también la presencia de altas concentraciones de ácido propiónico en sangre, el cual podría jugar un papel en la emergencia temporal de signos de hiperactividad y autismo en estos ratones. El ácido propiónico es un ácido que existe tanto en solución acuosa como lipídica y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica de forma activa y pasiva a través de transportadores monocarboxilados específicos (Thomas *et al.*, 2010). Sin embargo aún no existen estudios que correlacionen los niveles de C3 y metilcitrato con la clínica de los pacientes. Aunque es infrecuente, se han descrito alteraciones neurológicas en pacientes con AP que presentan un trastorno autista y trastornos psicóticos (Al-Owain *et al.*, 2013; Dejean de la Batie *et al.*, 2014). Recientemente, varios defectos metabólicos se han asociado con síntomas autistas en una proporción más alta de la que se encuentran en la población normal, estableciéndose

cierta conexión entre la coincidencia de errores congénitos del metabolismo y estos trastornos (Al-Owain et al., 2013; Ghaziuddin y Al-Owain, 2013; Manzi et al., 2008). Se ha propuesto que ciertos tipos de autismo pueden ser formas parciales de defectos congénitos heredados o adquiridos donde el metabolismo del ácido propiónico se encuentra alterado (MacFabe et al., 2007). Otro factor que refuerza la posible asociación entre ambos, es el hecho de que se ha sugerido el uso de ácido propiónico como un compuesto capaz de inducir animales modelo de autismo (Shultz et al., 2008). Las inyecciones intracerebroventriculares de ácido propiónico en ratas adultas producen de forma reversible comportamientos distónicos repetitivos, hiperactividad y otros efectos neuropatológicos similares a los observados en pacientes con autismo (MacFabe et al., 2011).

El estudio de la coordinación motora a las 6 y 12 semanas de edad mostró una mayor dificultad en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) para mantener el equilibrio en las primeras rondas del test de coordinación, sin embargo, el análisis del test de rota-rod en su conjunto muestra un aprendizaje y adaptación similar a los ratones *wildtype*. A las 24 y 32 semanas las diferencias en la latencia a caída son más evidentes, sugiriendo la existencia de un posible déficit en la coordinación motora en los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) con la edad. Esto se relaciona con el fenotipo de algunos pacientes que presentan alteraciones en el tono muscular y el movimiento. La comparación de la latencia a caída en las últimas rondas del test a 6 y 32 semanas muestra que los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) presentan una marcada menor resistencia a fatiga frente a los *wildtype*. Este hecho podría estar relacionado con las alteraciones cardíacas observadas en estos ratones. Aunque hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio detallado de la disfunción cardíaca en este modelo animal, si se ha descrito un incremento de biomarcadores de disfunción cardíaca y un mayor tamaño del corazón de los ratones *Pcca*^{-/-}(A138T) (Guenzel et al., 2013). Nuestros resultados de los estudios de comportamiento son preliminares y es importante tomarlos con cierta cautela, ya que la mayor desventaja de los test de comportamiento es la alta variabilidad e influencia de los numerosos factores externos que están implicados en las medidas de los distintos parámetros analizados. Cada modelo animal tiene su propia progresión de la enfermedad y un fenotipo locomotor y de comportamiento distinto, que varía en función de la severidad y la edad (Tatem et al., 2014). Por lo tanto, es importante determinar clínica y patológicamente la edad de análisis más adecuada para evaluar las medidas de actividad en los estudios de comportamiento. En nuestro caso, es necesario un estudio más profundo y detallado, incrementando principalmente el número de animales por experimento e incorporando tests que nos permitan evaluar no sólo la capacidad locomotora sino también la capacidad de aprendizaje, memoria y la interacción social.

4 Desarrollo de un sistema *in vivo* para probar la eficiencia de la modulación de *splicing* mediante oligonucleótidos antisentido

Estudios en modelos celulares y animales evidencian el éxito de la modulación del *splicing* mediante la terapia antisentido con resultados terapéuticamente favorables para una variedad de genes, incluyendo el gen la distrofina y SMN (*survival of motor neuron*). En este trabajo, ofrecemos por primera vez pruebas *in vivo* de la viabilidad en la modulación de la expresión de enzimas hepáticas mediante el uso de oligonucleótidos antisentido moduladores de *splicing*. En aquellas mutaciones específicas, causantes de enfermedad, que conducen a un defecto de *splicing*, es posible modular su procesamiento para corregir el fallo, tal y como se ha demostrado a través del tratamiento antisentido en fibroblastos de pacientes con distintas enfermedades raras (Perez et al., 2010). Alternativamente, la modulación del *splicing* puede utilizarse para modelar errores innatos del metabolismo al interferir la expresión de la enzima nativa, como hemos demostrado en este trabajo. Dentro de las posibles enfermedades de interés donde se puede aplicar con éxito este sistema, encontramos las EMH causadas por la deficiencia de una enzima hepática, como aminoacidopatías, acidemias orgánicas y trastornos del ciclo de la urea. Se han descrito mutaciones que producen la inserción patológica de pseudoexones en la deficiencia en ornitina transcarbamilasa (OTC) (Engel et al., 2008; Ogino et al., 2007) y en la deficiencia de la 6-piruvil-tetrahidropterina sintasa (PTPS) donde se ha demostrado el éxito de la terapia antisentido para suprimir eficientemente la activación de pseudoexones (Brasil et al., 2011). La frecuencia de mutaciones que activan pseudoexones se estima que afecta entre un 2-7% de los alelos mutantes (Gurvich et al., 2008; Pros et al., 2009), aunque se cree que está subestimada debido a la falta de implementación de técnicas de análisis de la transcripción en los laboratorios de diagnóstico. La falta de un estudio del perfil transcripcional junto con un análisis completo de las secuencias intrónicas, que no son generalmente incluidos en la norma de análisis de secuenciación, permitiría realizar un diagnóstico más completo y eficaz favoreciendo el correcto genotipado de los pacientes. Sin embargo, se espera que la incorporación rutinaria de nuevas técnicas de secuenciación masiva y el RNA seq que permite realizar un análisis del transcriptoma completo, incrementa en un futuro cercano la identificación de mutaciones en secuencias intrónicas profundas que activen pseudoexones causando patología, como muestran ya algunos ejemplos recientes (Braun et al., 2013; Flanagan et al., 2013; Webb et al., 2012). Este abordaje puede ser aplicado también a otros defectos de *splicing* frecuentes, como son las mutaciones que causan la activación de nuevos sitios críticos de *splicing* tanto en secuencias intrónicas como exónicas. En estos casos, los sitios naturales de *splicing* deben permanecer intactos para que el bloqueo del nuevo sitio permita eficazmente forzar los sitios naturales recuperando niveles normales de proteína y actividad.

La composición química de los oligonucleótidos y los sistemas para dirigir su transporte y liberación, influyen claramente en la eficiencia biológica *in vivo* del tratamiento antisentido. Tanto LNAs como PMOs y VMOs han demostrado su capacidad de modular el *splicing* en células y animales (Rincon et al., 2007; Roberts et al., 2006; Taniguchi-Ikeda et al., 2011; Wahlestedt et al., 2000). Las pruebas en el modelo celular llevadas a cabo en este trabajo con el oligonucleótido tipo LNA, mostraron una eficiencia parcial, a pesar de los altos niveles de transfección, lo que indica que son necesarios la optimización de la secuencia y/o el incremento de dosis para mejorar los resultados. Además, LNA-ex11 es un oligonucleótido de 15-mer que presenta hibridación con otras

secuencias genómicas, lo cual puede contribuir a su efecto parcial. En contraste, los PMOs utilizados contienen 24 nucleótidos y se dirigen exclusivamente a la secuencia del gen *PAH*. Consideramos que son necesarios más estudios para sacar conclusiones y comparar la eficiencia de los oligos de LNA y PMO. El uso de PMO y VMO dirigidos contra los sitios conservados de *splicing*, en el modelo celular y de ratón, permitieron conseguir el *exon skipping* completo en el gen *PAH*. Estos resultados permiten establecer los parámetros iniciales para una aplicación clínica futura en la modulación de *splicing* en EMH. En células, PMO provoca un *exon skipping* eficiente del exon 11 a dosis relativamente bajas (2,5 $\mu\text{mol/L}$), siendo necesarias dosis más elevadas para conseguir el mismo efecto para el exon 12. Este hecho puede ser debido a que el exon 12 posee sitios fuertes de *splicing*, mientras que el exon 11 presenta un aceptor débil, haciéndolo más vulnerable (Heintz *et al.*, 2012a). Sin embargo, en los experimentos en ratones no observamos ninguna diferencia en el uso de VMO dirigidos contra el exon 11 o el exon 12, a la dosis y regímenes óptimos (dos inyecciones consecutivas con dosis únicas de 12,5 mg/kg). Diferencias en la absorción del AON durante la transfección celular y el transporte *in vivo*, el fondo genético y el tipo de célula diana, así como la farmacocinética en distintas especies, puede influenciar en la regulación del *splicing*, mostrando diferencias en los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Sahashi *et al.*, 2012).

En el modelo celular se observó una reducción severa de la cantidad de proteína PAH con ambos PMO-ex11 y PMO-ex12 a 20 $\mu\text{mol/L}$ a pesar de que el perfil transcripcional no mostró un *exon skipping* total con PMO-ex12. Estas diferencias pueden ser atribuidas a razones experimentales relacionadas con las técnicas empleadas y los tiempos de análisis después de la transfección (24h para el RNA y 48h para proteína). Además el *skipping* de los exones 11 y 12 produce un transcrito fuera del marco de lectura, que sólo en el caso del *skipping* del exon 11 se predice que sea eliminado por el NMD, ya que el codón de terminación prematuro de la traducción se localiza a más de 50 nucleótidos corriente arriba (*upstream*) de una unión exon-exon (Kervestin y Jacobson, 2012). De hecho, en algunos experimentos se observa una disminución del transcrito tras el tratamiento con VMO-ex11 en comparación con el tratamiento con VMO-ex12.

A pesar del reto que plantea llevar los oligonucleótidos al interior de cada célula del organismo, hemos conseguido un 100% de *exon skipping* en el hígado y el riñón mediante simples inyecciones intravenosas en la cola, lo cual es consistente con otros artículos de la literatura (Osorio *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2011). Los niveles de expresión del gen de interés son importantes para determinar la dosis y el régimen de los oligonucleótidos, como se deduce de la comparación de los resultados obtenidos en hígado y riñón, en este último se necesitan menores cantidades de VMO para producir el *exon skipping*, lo cual se correlaciona con unos niveles más bajos de expresión de PAH en riñón y consecuentemente menos transcritos para bloquear.

Es importante trabajar a las dosis efectivas más bajas posibles para reducir el riesgo de efectos secundarios (Malerba *et al.*, 2009). Dado que la mayoría de los AONs penetran en la célula a través de la formación de endosomas tardíos y lisosomas (Koller *et al.*, 2011), la búsqueda de moléculas capaces de potenciar el efecto farmacológico *in vivo*, sin incrementar la toxicidad, podría aumentar la eficiencia de los AONs a dosis más bajas. Recientemente, el uso de técnicas de cribado de alto rendimiento ha potenciado el descubrimiento de pequeñas moléculas capaces de modular el tráfico intracelular y la liberación de los endosomas, su optimización contribuirá a potenciar el uso *in vivo* de AON (Yang *et al.*, 2015). Uno de los aspectos más notables de nuestro sistema es el uso

de la medida de los niveles de L-Phe en sangre como biomarcador para monitorizar fácilmente la eficiencia de la terapia antisentido *in vivo*. Para conseguir provocar hiperfenilalaninemia en el ratón (L-Phe > 600 $\mu\text{mol/L}$), es necesario suprimir la actividad de la PAH en hígado por debajo de un 5%, con respecto a la actividad de ratones *wildtype*, lo cual concuerda con lo observado en publicaciones previas (Hamman et al., 2005; Viecelli et al., 2014). La necesidad de producir un *exon skipping* total para conseguir altos niveles de L-Phe en sangre en nuestro sistema representa una situación extrema, que requiere una elevada eficiencia, sin embargo, desde el punto de vista terapéutico niveles más bajos de corrección de *splicing* y por tanto de oligonucleótidos pueden ser clínicamente relevantes para enfermedades recesivas.

En distrofia muscular de Duchenne (DMD), se han empleado PMO en el modelo de ratón *mdx*, observándose tras una administración sistémica un excelente resultado y una amplia distribución en el cuerpo del animal, además se han obtenido resultados prometedores en ensayos clínicos (Aartsma-Rus, 2012). En DMD el PMO entra fácilmente en las fibras musculares sin necesidad de ningún vehículo, gracias a la permeabilidad observada en las membranas de las fibras musculares distróficas. Sin embargo, en las deficiencias enzimáticas responsables de EMH, es previsible la necesidad de un vehículo que transporte y libere el oligonucleótido para conseguir una absorción celular eficiente. Se están desarrollando una amplia variedad de partículas dendriméricas y de péptidos para facilitar el transporte y la entrada en la célula (Boisguerin et al., 2015). En nuestra experiencia el tratamiento con VMO a la dosis óptima mediante inyecciones intravenosa a través de la cola mostró una alta toxicidad, de manera aleatoria, disminuyendo la supervivencia de los animales tratados. En la literatura se ha descrito el éxito del uso de VMO sin ningún síntoma de toxicidad, ni respuesta inmune tras una administración sistémica repetida (Wu et al., 2009). Sin embargo, recientemente se ha mostrado un alto índice de mortalidad en el tratamiento con VMO (Ferguson et al., 2014), lo cual concuerda con las observaciones de nuestro trabajo. Los autores sugieren que la posible agregación de los oligonucleótidos puede resultar en un incremento de la carga catiónica de la parte del dendrímero, lo que conlleva a la formación de coágulos de sangre que inducen un repentino paro cardíaco (Ferguson et al., 2014). De hecho, los estudios histológicos llevados a cabo tras la autopsia de los animales tratados con VMO-ex11 muestran coágulos sanguíneos en las cavidades cardíacas, con dilatación en las aurículas y los ventrículos, congestión pulmonar y edema alveolar. Estos hallazgos apoyan la idea de una posible alteración de los sistemas de coagulación tras la administración de VMO, apuntando a un paro cardíaco como la causa de muerte. Estos efectos limitan claramente el potencial de una posible aplicación clínica de los VMO, y favorecen el estudio en el futuro de otras químicas que no han demostrado efectos adversos. Un atractivo candidato es triciclo-DNA (tc-DNA), este AON ha demostrado una alta eficiencia de penetración en hígado, músculo, corazón e incluso en el SNC, consiguiendo por primera vez rescatar la falta de distrofina en todos los tejidos afectados y revirtiendo parcialmente alteraciones en el comportamiento y en el sistema cardio-respiratorio de ratones modelo de DMD (Goyenvalle et al., 2015). El sistema *in vivo* descrito en este trabajo puede ser fácilmente usado en otros estudios para testar distintas químicas y vehículos disponibles que faciliten el transporte y liberación de los oligonucleótidos empleados, permitiendo la búsqueda de aproximaciones clínicas más seguras y eficientes para la modulación de *splicing* mediante AONs. Este trabajo muestra que los AONs son una herramienta muy útil para modular el *splicing* en enzimas hepáticas en un contexto fisiológico con animales vivos. Además, nuestros resultados son una prueba

de concepto del uso de AONs para generar modelos de enfermedades genéticas. Recientemente, se describió una aproximación similar mediante inyecciones intracerebroventriculares para modelar una forma más severa de presentación adulta de atrofia muscular espinal (SMA) (Sahashi et al., 2012; Sahashi et al., 2013).

El mantenimiento del fenotipo de HPA en nuestro modelo requiere de re-inyecciones cada 4 días, este hecho probablemente se debe a la corta vida media del mRNA Pah y la proteína PAH. Para solventar este problema en el futuro se podrían emplear aproximaciones que permitan una expresión sostenida de la producción de AONs *in situ* mediante el empleo de AAV que expresan secuencias antisentido unidas a U7 snRNA como se ha probado en DMD (Benchaouir y Goyenvalle, 2012; Goyenvalle et al., 2012). Las aproximaciones antisentido pueden ser muy útiles también para conseguir modelar una forma severa de enfermedad en sistemas modelo existentes con un fenotipo leve, debido a la existencia de mRNA residual que puede ser bloqueado mediante AONs específicos, o para estudiar *in vivo* distintas isoformas de proteínas modulando el *skipping* de exones alternativos y de miRNAs implicados en la tumorigénesis y metástasis de distintos cánceres humanos (Zhao et al., 2015).

Conclusiones/Conclusions



CONCLUSIONES

1. El análisis estructural y funcional de mutaciones *missense* es una herramienta valiosa para establecer posibles relaciones genotipo-fenotipo en enfermedades genéticas humanas. Nuestros resultados correlacionan un curso leve de la enfermedad con mutaciones localizadas entre las subunidades β en comparación con aquellas mutaciones que se localizan cerca del centro activo.
2. Es necesario analizar el posible efecto en el *splicing* de todas las variaciones exónicas. El análisis mediante minigenes nos ha permitido confirmar un defecto parcial de *splicing* para la mutación c.763 G>A en el gen *PCCB*.
3. El déficit en el metabolismo energético debido a la disfunción mitocondrial junto con el aumento de ROS pueden jugar un papel importante en la fisiopatología de AP, como se deduce de los estudios *in vivo* (en el ratón modelo) e *in vitro* (en fibroblastos de pacientes).
4. En fibroblastos de pacientes se ha establecido una prueba de concepto del potencial uso de antioxidantes como una terapia adyuvante en AP.
5. Alteraciones en la huella bioenergética mitocondrial en el cerebro del modelo de ratón de AP parecen indicar la posible existencia de una reprogramación metabólica para proteger las neuronas del déficit energético y la muerte.
6. Las alteraciones dependientes de la edad en la locomoción, coordinación y resistencia observadas en el modelo de ratón pueden estar correlacionadas con ciertos síntomas observados en los pacientes con AP.
7. Se ha desarrollado un sistema *in vivo* para probar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para modular el *splicing* en una enzima hepática. Esta aproximación puede ser usada también como un método simple para generar ratones modelo de enfermedades genéticas hepáticas.

CONCLUSIONS

1. Functional and structural analysis of missense mutations is a valuable tool to establish potential genotype-phenotype correlations in human genetic diseases. With our results we can correlate a milder course of PA with mutations located at the β - β interface compared to mutations near the active site.
2. It is necessary to analyze all exonic variations for a possible effect on splicing. Minigenes analysis has allowed us to confirm that PCCB mutation c.763 G>A is a partial splicing defect.
3. Impairment of energy metabolism due to mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress may play a role in the pathophysiology of PA, as deduced from *in vivo* (mouse model) and *in vitro* (patient-derived fibroblasts) studies.
4. Using PA patient-derived fibroblasts we have established the proof of concept of the potential use of antioxidants as an adjuvant therapy for PA.
5. Alterations in mitochondrial bioenergetics signature in the brain of the PA mouse model may represent a metabolic reprogramming to protect neurons from energy deficit and death.
6. The age-dependent alterations in locomotion, coordination and endurance observed in the mouse model of PA may be correlated to certain symptoms observed in PA patients.
7. We have developed a sensitive *in vivo* assay to test the ability of antisense oligonucleotides to modulate splicing in a liver enzyme, which can be used to explore the *in vivo* applicability of antisense therapy. The approach may also be used as a simple method to generate murine models of liver genetic diseases.



Bibliografía



- A**artsma-Rus, A., 2012. Overview on DMD exon skipping. *Methods in molecular biology* 867, 97-116.
- Aartsma-Rus, A., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., Janson, A.A., den Dunnen, J.T., van Ommen, G.J., van Deutekom, J.C., 2004. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene therapy* 11, 1391-1398.
- Al-Owain, M., Kaya, N., Al-Shamrani, H., Al-Bakheet, A., Qari, A., Al-Muaigl, S., Ghaziuddin, M., 2013. Autism spectrum disorder in a child with propionic acidemia. *JIMD reports* 7, 63-66.
- Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., Chen, Y., Messerli, S.M., Mariggio, M.A., Rahner, C., McNay, E., Shore, G.C., Smith, P.J., Hardwick, J.M., Jonas, E.A., 2011. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nature cell biology* 13, 1224-1233.
- Aldea, M., Clofent, J., Nunez de Arenas, C., Chamorro, M., Velasco, M., Berrendero, J.R., Navarro, C., Cuezva, J.M., 2011. Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer. *Cancer letters* 311, 210-218.
- Andersen, O.A., Flatmark, T., Hough, E., 2001. High resolution crystal structures of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase in its catalytically active Fe(II) form and binary complex with tetrahydrobiopterin. *Journal of molecular biology* 314, 279-291.
- Andersen, O.A., Flatmark, T., Hough, E., 2002. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *Journal of molecular biology* 320, 1095-1108.
- Ando, T., Rasmussen, K., Wright, J.M., Nyhan, W.L., 1972. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. *The Journal of biological chemistry* 247, 2200-2204.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. Biokhimiia* 70, 200-214.
- Aon, M.A., Bhatt, N., Cortassa, S.C., 2014. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in physiology* 5, 282.
- Arora, S., Ojha, S.K., Vohora, D., 2009. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in Swiss albino mice. *Global journal of pharmacology* 3, 81-84.
- Arthur, J.R., 2000. The glutathione peroxidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 1825-1835.
- Arzumanov, A., Stetsenko, D.A., Malakhov, A.D., Reichelt, S., Sorensen, M.D., Babu, B.R., Wengel, J., Gait, M.J., 2003. A structure-activity study of the inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans-activation by mixmer 2'-O-methyl oligoribonucleotides containing locked nucleic acid (LNA), alpha-L-LNA, or 2'-thio-LNA residues. *Oligonucleotides* 13, 435-453.
- Asokan, A., Schaffer, D.V., Samulski, R.J., 2012. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 699-708.

- B**ai, J., Cederbaum, A.I., 2001. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biological signals and receptors* 10, 189-199.
- Bain, M.D., Jones, M., Borriello, S.P., Reed, P.J., Tracey, B.M., Chalmers, R.A., Stacey, T.E., 1988. Contribution of gut bacterial metabolism to human metabolic disease. *Lancet* 1, 1078-1079.
- Baralle, D., Baralle, M., 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics* 42, 737-748.
- Baruteau, J., Hargreaves, I., Krywawych, S., Chalasani, A., Land, J.M., Davison, J.E., Kwok, M.K., Christov, G., Karimova, A., Ashworth, M., Anderson, G., Prunty, H., Rahman, S., Grunewald, S., 2014. Successful reversal of propionic acidaemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism. *Mitochondrion* 17, 150-156.
- Baumgartner, D., Scholl-Burgi, S., Sass, J.O., Sperl, W., Schweigmann, U., Stein, J.I., Karall, D., 2007. Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia. *The Journal of pediatrics* 150, 192-197.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.P., Casteilla, L., Letellier, T., Rossignol, R., 2006. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American journal of physiology. Cell physiology* 291, 1172-1182.
- Benchaouir, R., Goyenvallé, A., 2012. Splicing modulation mediated by small nuclear RNAs as therapeutic approaches for muscular dystrophies. *Current gene therapy* 12, 179-191.
- Bhan, A.K., Brody, C., 2001. Propionic acidemia: a rare cause of cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 7, 218-219.
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M., 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265, 812-813.
- Blanchard, C.Z., Lee, Y.M., Frantom, P.A., Waldrop, G.L., 1999. Mutations at four active site residues of biotin carboxylase abolish substrate-induced synergism by biotin. *Biochemistry* 38, 3393-3400.
- Blau, N., Hennermann, J.B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U., 2011. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular genetics and metabolism* 104 Suppl, S2-9.
- Blau, N., Longo, N., 2015. Alternative therapies to address the unmet medical needs of patients with phenylketonuria. *Expert opinion on pharmacotherapy* 16, 791-800.
- Blau, N., Shen, N., Carducci, C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert review of molecular diagnostics* 14, 655-671.
- Blau, N., van Spronsen, F.J., Levy, H.L., 2010. Phenylketonuria. *Lancet* 376, 1417-1427.
- Boisguerin, P., Deshayes, S., Gait, M.J., O'Donovan, L., Godfrey, C., Betts, C.A., Wood, M.J., Lebleu, B., 2015. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Advanced drug delivery reviews*. doi:10.1016/j.addr.2015.02.008

- Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebidzinska, M., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., Wojtala, A., Wieckowski, M.R., Kroemer, G., Galluzzi, L., Pinton, P., 2013. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell cycle* 12, 674-683.
- Boveris, A., Navarro, A., 2008. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB life* 60, 308-314.
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology* 45, 466-472.
- Brasil, S., Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Leal, F., Merinero, B., Banerjee, R., Desviat, L.R., Ugarte, M., Perez, B., 2015. Methylmalonic aciduria cblB type: characterization of two novel mutations and mitochondrial dysfunction studies. *Clinical genetics* 87, 576-581.
- Brasil, S., Viecelli, H.M., Meili, D., Rassi, A., Desviat, L.R., Perez, B., Ugarte, M., Thony, B., 2011. Pseudoexon exclusion by antisense therapy in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Human mutation* 32, 1019-1027.
- Braun, T.A., Mullins, R.F., Wagner, A.H., Andorf, J.L., Johnston, R.M., Bakall, B.B., Deluca, A.P., Fishman, G.A., Lam, B.L., Weleber, R.G., Cideciyan, A.V., Jacobson, S.G., Sheffield, V.C., Tucker, B.A., Stone, E.M., 2013. Non-exomic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Human molecular genetics* 22, 5136-5145.
- Brock, M., Buckel, W., 2004. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 3227-3241.
- Brown, D.A., O'Rourke, B., 2010. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovascular research* 88, 241-249.
- Brunengraber, H., Roe, C.R., 2006. Anaplerotic molecules: current and future. *Journal of inherited metabolic disease* 29, 327-331.
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., Kufe, D., 2003. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 278, 39609-39614.
- Cathelineau, L., Petit, F.P., Coude, F.X., Kamoun, P.P., 1979. Effect of propionate and pyruvate on citrulline synthesis and ATP content in rat liver mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 90, 327-332.
- Chandler, R.J., Chandrasekaran, S., Carrillo-Carrasco, N., Senac, J.S., Hofherr, S.E., Barry, M.A., Venditti, C.P., 2011. Adeno-associated virus serotype 8 gene transfer rescues a neonatal lethal murine model of propionic acidemia. *Human gene therapy* 22, 477-481.
- Chandler, R.J., Zervas, P.M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., Venditti, C.P., 2009. Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 1252-1261.
- Cheema-Dhadli, S., Leznoff, C.C., Halperin, M.L., 1975. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatric research* 9, 905-908.
- Childs, B., Nyhan, W.L., Borden, M., Bard, L., Cooke, R.E., 1961. Idiopathic hyperglycinemia and hyperglycinuria: a new disorder of amino acid metabolism. I. *Pediatrics* 27, 522-538.
- Chou, C.Y., Yu, L.P., Tong, L., 2009. Crystal structure of biotin carboxylase in complex with substrates and implications for its catalytic mechanism. *The Journal of biological chemistry* 284, 11690-11697.

- Clancy, J.P., Bebok, Z., Ruiz, F., King, C., Jones, J., Walker, L., Greer, H., Hong, J., Wing, L., Macaluso, M., Lyrene, R., Sorscher, E.J., Bedwell, D.M., 2001. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163, 1683-1692.
- Clavero, S., Martinez, M.A., Perez, B., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2002. Functional characterization of PCCA mutations causing propionic acidemia. *Biochimica et biophysica acta* 1588, 119-125.
- Cline, A., Gao, N., Flanagan-Steet, H., Sharma, V., Rosa, S., Sonon, R., Azadi, P., Sadler, K.C., Freeze, H.H., Lehrman, M.A., Steet, R., 2012. A zebrafish model of PMM2-CDG reveals altered neurogenesis and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency. *Molecular biology of the cell* 23, 4175-4187.
- Cooper, T.A., 2005. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* 37, 331-340.
- Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N., Meyer-Fernandes, J.R., 2012. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *International journal of molecular sciences* 13, 10697-10721.
- Coude, F.X., Sweetman, L., Nyhan, W.L., 1979. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *The Journal of clinical investigation* 64, 1544-1551.
- Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429, 403-417.
- Cuenda, A., Rousseau, S., 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1358-1375.
- de Baulny, H.O., Abadie, V., Feillet, F., de Parscau, L., 2007. Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *The Journal of nutrition* 137, 1561S-1563S.
- de Baulny, H.O., Benoist, J.F., Rigal, O., Touati, G., Rabier, D., Saudubray, J.M., 2005. Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *Journal of inherited metabolic disease* 28, 415-423.
- De Conti, L., Baralle, M., Buratti, E., 2013. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 4, 49-60.
- de Groot, M.J., Sijens, P.E., Reijngoud, D.J., Paans, A.M., van Spronsen, F.J., 2015. Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35, 200-205.
- de Keyzer, Y., Valayannopoulos, V., Benoist, J.F., Batteux, F., Lacaille, F., Hubert, L., Chretien, D., Chadeaux-Vekemans, B., Niaudet, P., Touati, G., Munnich, A., de Lonlay, P., 2009. Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. *Pediatric research* 66, 91-95.
- Dejean de la Batie, C., Barbier, V., Valayannopoulos, V., Touati, G., Maltret, A., Brassier, A., Arnoux, J.B., Grevent, D., Chadeaux, B., Ottolenghi, C., Canoui, P., de Lonlay, P., 2014. Acute psychosis in propionic acidemia: 2 case reports. *Journal of child neurology* 29, 274-279.

- Desviat, L.R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Clavero, S., Ugarte, M., 2004. Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles. *Molecular genetics and metabolism* 83, 28-37.
- Desviat, L.R., Perez, B., Ugarte, M., 2012. Minigenes to confirm exon skipping mutations. *Methods in molecular biology* 867, 37-47.
- Dewar, D., Underhill, S.M., Goldberg, M.P., 2003. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 263-274.
- Dietz, H.C., 2010. New therapeutic approaches to mendelian disorders. *The New England journal of medicine* 363, 852-863.
- Ding, Z., Harding, C.O., Rebuffat, A., Elzaouk, L., Wolff, J.A., Thony, B., 2008. Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 673-681.
- Dionisi-Vici, C., Deodato, F., Roschinger, W., Rhead, W., Wilcken, B., 2006. 'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease* 29, 383-389.
- Divina, P., Kvitkovicova, A., Buratti, E., Vorechovsky, I., 2009. Ab initio prediction of mutation-induced cryptic splice-site activation and exon skipping. *European journal of human genetics : EJHG* 17, 759-765.
- Dominski, Z., Kole, R., 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8673-8677.
- E**aton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M., 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *The Biochemical journal* 320, 345-357.
- Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., Saada, A., 2005. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American journal of human genetics* 76, 1081-1086.
- Engel, K., Nuoffer, J.M., Muhlhausen, C., Klaus, V., Largiader, C.R., Tsiakas, K., Santer, R., Wermuth, B., Haberle, J., 2008. Analysis of mRNA transcripts improves the success rate of molecular genetic testing in OTC deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 94, 292-297.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 23, 599-622.
- F**asullo, M., Endres, L., 2015. Nucleotide Salvage Deficiencies, DNA Damage and Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences* 16, 9431-9449.
- Ferguson, D.P., Dangott, L.J., Lightfoot, J.T., 2014. Lessons learned from vivo-morpholinos: How to avoid vivo-morpholino toxicity. *BioTechniques* 56, 251-256.

- Filosto, M., Tonin, P., Vattermi, G., Spagnolo, M., Rizzuto, N., Tomelleri, G., 2002. Antioxidant agents have a different expression pattern in muscle fibers of patients with mitochondrial diseases. *Acta neuropathologica communications* 103, 215-220.
- Flanagan, S.E., Xie, W., Caswell, R., Damhuis, A., Vianey-Saban, C., Akcay, T., Darendeliler, F., Bas, F., Guven, A., Siklar, Z., Ocal, G., Berberoglu, M., Murphy, N., O'Sullivan, M., Green, A., Clayton, P.E., Banerjee, I., Clayton, P.T., Hussain, K., Weedon, M.N., Ellard, S., 2013. Next-generation sequencing reveals deep intronic cryptic ABCC8 and HADH splicing founder mutations causing hyperinsulinism by pseudoexon activation. *American journal of human genetics* 92, 131-136.
- Flatmark, T., Stevens, R.C., 1999. Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chemical reviews* 99, 2137-2160.
- Fluiter, K., Frieden, M., Vreijling, J., Rosenbohm, C., De Wissel, M.B., Christensen, S.M., Koch, T., Orum, H., Baas, F., 2005. On the in vitro and in vivo properties of four locked nucleic acid nucleotides incorporated into an anti-H-Ras antisense oligonucleotide. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 6, 1104-1109.
- Fölling, A., 1934. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 227, 169-181.
- Formentini, L., Pereira, M.P., Sanchez-Cenizo, L., Santacatterina, F., Lucas, J.J., Navarro, C., Martinez-Serrano, A., Cuezva, J.M., 2014. In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *The EMBO journal* 33, 762-778.
- Formentini, L., Sanchez-Arago, M., Sanchez-Cenizo, L., Cuezva, J.M., 2012. The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Molecular cell* 45, 731-742.
- French, J.P., Hamilton, K.L., Quindry, J.C., Lee, Y., Upchurch, P.A., Powers, S.K., 2008. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 2862-2871.
- Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., Stevens, R.C., 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *The Journal of biological chemistry* 273, 16962-16967.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G., 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation research* 111, 1198-1207.
- Gamez, A., Wang, L., Straub, M., Patch, M.G., Stevens, R.C., 2004. Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 124-129.
- Geiser, T., 1990. Large-scale economic synthesis of antisense phosphorothioate analogues of DNA for preclinical investigations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 616, 173-183.
- Ghaziuddin, M., Al-Owain, M., 2013. Autism spectrum disorders and inborn errors of metabolism: an update. *Pediatric neurology* 49, 232-236.

- Ghosh, A., Chandran, K., Kalivendi, S.V., Joseph, J., Antholine, W.E., Hillard, C.J., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A., Kalyanaraman, B., 2010. Neuroprotection by a mitochondria-targeted drug in a Parkinson's disease model. *Free radical biology & medicine* 49, 1674-1684.
- Gibala, M.J., Young, M.E., Taegtmeyer, H., 2000. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta physiologica Scandinavica* 168, 657-665.
- Giovannini, M., Verduci, E., Salvatici, E., Paci, S., Riva, E., 2012. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutrition & metabolism* 9:7. doi: 10.1186/1743-7075-9-7.
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2007. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15671-15676.
- Glover, D.J., Lipps, H.J., Jans, D.A., 2005. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature reviews. Genetics* 6, 299-310.
- Gompertz, D., Storrs, C.N., Bau, D.C., Peters, T.J., Hughes, E.A., 1970. Localisation of enzymic defect in propionicacidaemia. *Lancet* 1, 1140-1143.
- Goyenvalle, A., Babbs, A., Wright, J., Wilkins, V., Powell, D., Garcia, L., Davies, K.E., 2012. Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Human molecular genetics* 21, 2559-2571.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Voit, T., Amthor, H., Buhr, C., Schurch, S., Wood, M.J., Davies, K.E., Vaillend, C., Leumann, C., Garcia, L., 2015. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature medicine* 21, 270-275.
- Gregersen, N., 1981. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-Co-A. *Biochemia medica* 26, 20-27.
- Gross, A., Pilcher, K., Blachly-Dyson, E., Basso, E., Jockel, J., Bassik, M.C., Korsmeyer, S.J., Forte, M., 2000. Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L). *Molecular and cellular biology* 20, 3125-3136.
- Grunert, S.C., Mullerleile, S., de Silva, L., Barth, M., Walter, M., Walter, K., Meissner, T., Lindner, M., Ensenaer, R., Santer, R., Bodamer, O.A., Baumgartner, M.R., Brunner-Krainz, M., Karall, D., Haase, C., Knerr, I., Marquardt, T., Hennermann, J.B., Steinfeld, R., Beblo, S., Koch, H.G., Konstantopoulou, V., Scholl-Burgi, S., van Teeffelen-Heithoff, A., Suormala, T., Sperl, W., Kraus, J.P., Superti-Furga, A., Schwab, K.O., Sass, J.O., 2012. Propionic acidemia: neonatal versus selective metabolic screening. *Journal of inherited metabolic disease* 35, 41-49.

- Grunert, S.C., Mullerleile, S., De Silva, L., Barth, M., Walter, M., Walter, K., Meissner, T., Lindner, M., Ensenauer, R., Santer, R., Bodamer, O.A., Baumgartner, M.R., Brunner-Krainz, M., Karall, D., Haase, C., Knerr, I., Marquardt, T., Hennermann, J.B., Steinfeld, R., Beblo, S., Koch, H.G., Konstantopoulou, V., Scholl-Burgi, S., van Teeffelen-Heithoff, A., Suormala, T., Sperl, W., Kraus, J.P., Superti-Furga, A., Schwab, K.O., Sass, J.O., 2013. Propionic acidemia: clinical course and outcome in 55 pediatric and adolescent patients. *Orphanet journal of rare diseases* 8, 6. doi: 10.1186/1750-1172-8-6.
- Guenzel, A.J., Collard, R., Kraus, J.P., Matern, D., Barry, M.A., 2015. Long-term sex-biased correction of circulating propionic acidemia disease markers by adeno-associated virus vectors. *Human gene therapy* 26, 153-160.
- Guenzel, A.J., Hofherr, S.E., Hillestad, M., Barry, M., Weaver, E., Venezia, S., Kraus, J.P., Matern, D., Barry, M.A., 2013. Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 1316-1323.
- Guldborg, P., Henriksen, K.F., Sipila, I., Guttler, F., de la Chapelle, A., 1995. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *Journal of medical genetics* 32, 976-978.
- Gurvich, O.L., Tuohy, T.M., Howard, M.T., Finkel, R.S., Medne, L., Anderson, C.B., Weiss, R.B., Wilton, S.D., Flanigan, K.M., 2008. DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Annals of neurology* 63, 81-89.
- Guthrie, R., Susi, A., 1963. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 32, 338-343.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O.I., 1995. The characterization of antioxidants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 33, 601-617.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 219, 1-14.
- Hamman, K., Clark, H., Montini, E., Al-Dhalimy, M., Grompe, M., Finegold, M., Harding, C.O., 2005. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12, 337-344.
- Harding, C.O., Gillingham, M.B., Hamman, K., Clark, H., Goebel-Daghighi, E., Bird, A., Koeberl, D.D., 2006. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene therapy* 13, 457-462.
- Harris, D.A., Das, A.M., 1991. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *The Biochemical journal* 280, 561-573.
- Harris, E.D., 1992. Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase. *The Journal of nutrition* 122, 636-640.
- Havens, M.A., Duelli, D.M., Hastings, M.L., 2013. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 4, 247-266.
- Hayasaka, K., Narisawa, K., Satoh, T., Tateda, H., Metoki, K., Tada, K., Hiraga, K., Aoki, T., Kawakami, T., Akamatsu, H., Matsuo, N., 1982. Glycine cleavage system in ketotic hyperglycinemia: a reduction of H-protein activity. *Pediatric research* 16, 5-7.

- Heintz, C., Cotton, R.G., Blau, N., 2013. Tetrahydrobiopterin, its mode of action on phenylalanine hydroxylase, and importance of genotypes for pharmacological therapy of phenylketonuria. *Human mutation* 34, 927-936.
- Heintz, C., Dobrowolski, S.F., Andersen, H.S., Demirkol, M., Blau, N., Andresen, B.S., 2012a. Splicing of phenylalanine hydroxylase (PAH) exon 11 is vulnerable: molecular pathology of mutations in PAH exon 11. *Molecular genetics and metabolism* 106, 403-411.
- Heintz, C., Troxler, H., Martinez, A., Thony, B., Blau, N., 2012b. Quantification of phenylalanine hydroxylase activity by isotope-dilution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecular genetics and metabolism* 105, 559-565.
- Hekimi, S., Lapointe, J., Wen, Y., 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology* 21, 569-576.
- Holley, A.K., Dhar, S.K., Xu, Y., St Clair, D.K., 2012. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino acids* 42, 139-158.
- Holmstrom, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 411-421.
- Holthoff, J.H., Woodling, K.A., Doerge, D.R., Burns, S.T., Hinson, J.A., Mayeux, P.R., 2010. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochemical pharmacology* 80, 1260-1265.
- Holtzman, N.A., Kronmal, R.A., van Doorninck, W., Azen, C., Koch, R., 1986. Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *The New England journal of medicine* 314, 593-598.
- Hommel, F.A., Kuipers, J.R., Elema, J.D., Jansen, J.F., Jonxis, J.H., 1968. Propionicacidemia, a new inborn error of metabolism. *Pediatric research* 2, 519-524.
- Hoppel, C.L., Tandler, B., Fujioka, H., Riva, A., 2009. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1949-1956.
- Howard, M., Frizzell, R.A., Bedwell, D.M., 1996. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nature medicine* 2, 467-469.
- Hsia, Y.E., Scully, K.J., Rosenberg, L.E., 1969. Defective propionate carboxylation in ketotic hyperglycinaemia. *Lancet* 1, 757-758.
- Hsia, Y.E., Scully, K.J., Rosenberg, L.E., 1971. Inherited propionyl-Coa carboxylase deficiency in "ketotic hyperglycinemia". *The Journal of clinical investigation* 50, 127-130.
- Huang, C.S., Sadre-Bazzaz, K., Shen, Y., Deng, B., Zhou, Z.H., Tong, L., 2010. Crystal structure of the alpha(6)beta(6) holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature* 466, 1001-1005.
- Jafari, P., Braissant, O., Zavadakova, P., Henry, H., Bonafe, L., Ballhausen, D., 2013. Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures. *Orphanet journal of rare diseases* 8:4. doi: 10.1186/1750-1172-8-4.

- James, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P., 2004. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Archives of biochemistry and biophysics* 423, 47-56.
- Jervis, G.A., 1947. Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. *The Journal of biological chemistry* 169, 651-656.
- Jervis, G.A., 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 82, 514-515.
- K**aminsky, V.O., Zhivotovsky, B., 2014. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 21, 86-102.
- Kang, T.S., Wang, L., Sarkissian, C.N., Gamez, A., Scriver, C.R., Stevens, R.C., 2010. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism* 99, 4-9.
- Kaufman, S., Berlow, S., Summer, G.K., Milstien, S., Schulman, J.D., Orloff, S., Spielberg, S., Pueschel, S., 1978. Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. A variant form of phenylketonuria. *The New England journal of medicine* 299, 673-679.
- Kaufman, S., Holtzman, N.A., Milstien, S., Butler, L.J., Krumholz, A., 1975. Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *The New England journal of medicine* 293, 785-790.
- Keeling, K.M., Wang, D., Conard, S.E., Bedwell, D.M., 2012. Suppression of premature termination codons as a therapeutic approach. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 47, 444-463.
- Kervestin, S., Jacobson, A., 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 700-712.
- Kitada, M., Koya, D., 2013. Renal protective effects of resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 568093. doi: 10.1155/2013/568093.
- Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N., Koya, D., 2011. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes* 60, 634-643.
- Knappskog, P.M., Flatmark, T., Aarden, J.M., Haavik, J., Martinez, A., 1996. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS* 242, 813-821.
- Kole, R., Krainer, A.R., Altman, S., 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature reviews. Drug discovery* 11, 125-140.
- Kolker, S., Burgard, P., Sauer, S.W., Okun, J.G., 2013. Current concepts in organic acidurias: understanding intra- and extracerebral disease manifestation. *Journal of inherited metabolic disease* 36, 635-644.
- Koller, E., Vincent, T.M., Chappell, A., De, S., Manoharan, M., Bennett, C.F., 2011. Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes. *Nucleic acids research* 39, 4795-4807.

- Kolvraa, S., 1979. Inhibition of the glycine cleavage system by branched-chain amino acid metabolites. *Pediatric research* 13, 889-893.
- Kondratyuk, T.P., Park, E.J., Marler, L.E., Ahn, S., Yuan, Y., Choi, Y., Yu, R., van Breemen, R.B., Sun, B., Hoshino, J., Cushman, M., Jermihov, K.C., Mesecar, A.D., Grubbs, C.J., Pezzuto, J.M., 2011. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Molecular nutrition & food research* 55, 1249-1265.
- Kraus, J.P., Spector, E., Venezia, S., Estes, P., Chiang, P.W., Creadon-Swindell, G., Mullerleile, S., de Silva, L., Barth, M., Walter, M., Walter, K., Meissner, T., Lindner, M., Ensenauer, R., Santer, R., Bodamer, O.A., Baumgartner, M.R., Brunner-Krainz, M., Karall, D., Haase, C., Knerr, I., Marquardt, T., Hennermann, J.B., Steinfeld, R., Beblo, S., Koch, H.G., Konstantopoulou, V., Scholl-Burgi, S., van Teeffelen-Heithoff, A., Suormala, T., Ugarte, M., Sperl, W., Superti-Furga, A., Schwab, K.O., Grunert, S.C., Sass, J.O., 2012. Mutation analysis in 54 propionic acidemia patients. *Journal of inherited metabolic disease* 35, 51-63.
- Krishna, C.M., Liebmann, J.E., Kaufman, D., DeGraff, W., Hahn, S.M., McMurry, T., Mitchell, J.B., Russo, A., 1992. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. *Archives of biochemistry and biophysics* 294, 98-106.
- Kumar, R., Singh, S.K., Koshkin, A.A., Rajwanshi, V.K., Meldgaard, M., Wengel, J., 1998. The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8, 2219-2222.
- Kunishige, M., Mitsui, T., Akaike, M., Kawajiri, M., Shono, M., Kawai, H., Matsumoto, T., 2003. Overexpressions of myoglobin and antioxidant enzymes in ragged-red fibers of skeletal muscle from patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Muscle & nerve* 28, 484-492.
- Kure, S., Hou, D.C., Ohura, T., Iwamoto, H., Suzuki, S., Sugiyama, N., Sakamoto, O., Fujii, K., Matsubara, Y., Narisawa, K., 1999. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Journal of pediatrics* 135, 375-378.
- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European journal of biochemistry / FEBS* 270, 1628-1644.
- Laemmle, A., Balmer, C., Doell, C., Sass, J.O., Haberle, J., Baumgartner, M.R., 2014. Propionic acidemia in a previously healthy adolescent with acute onset of dilated cardiomyopathy. *European journal of pediatrics* 173, 971-974.
- Lehnert, W., Sperl, W., Suormala, T., Baumgartner, E.R., 1994. Propionic acidemia: clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *European journal of pediatrics* 153, S68-80.
- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and biophysical research communications* 309, 1017-1026.
- Levert, K.L., Lloyd, R.B., Waldrop, G.L., 2000. Do cysteine 230 and lysine 238 of biotin carboxylase play a role in the activation of biotin? *Biochemistry* 39, 4122-4128.
- Lewandowska, M.A., 2013. The missing puzzle piece: splicing mutations. *International journal of clinical and experimental pathology* 6, 2675-2682.

- Li, Y.F., Morcos, P.A., 2008. Design and synthesis of dendritic molecular transporter that achieves efficient in vivo delivery of morpholino antisense oligo. *Bioconjugate chemistry* 19, 1464-1470.
- Li, Y.G., Zhu, W., Tao, J.P., Xin, P., Liu, M.Y., Li, J.B., Wei, M., 2013. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 438, 270-276.
- Lichter-Konecki, U., Hipke, C.M., Konecki, D.S., 1999. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Molecular genetics and metabolism* 67, 308-316.
- Liesa, M., Shirihi, O.S., 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell metabolism* 17, 491-506.
- Lim, K.H., Ferraris, L., Filloux, M.E., Raphael, B.J., Fairbrother, W.G., 2011. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11093-11098.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R.A., Santos, C.X., Yamada, A.T., Augusto, O., 2001. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free radical biology & medicine* 30, 1234-1242.
- Linde, L., Kerem, B., 2008. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends in genetics : TIG* 24, 552-563.
- Longo, N., Siriwardena, K., Feigenbaum, A., Dimmock, D., Burton, B.K., Stockler, S., Waisbren, S., Lang, W., Jurecki, E., Zhang, C., Prasad, S., 2014. Long-term developmental progression in infants and young children taking sapropterin for phenylketonuria: a two-year analysis of safety and efficacy. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 17(5):365-73. doi: 10.1038/gim.2014.109.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- Lucke, T., Perez-Cerda, C., Baumgartner, M., Fowler, B., Sander, S., Sasse, M., Scholl, S., Ugarte, M., Das, A.M., 2004. Propionic acidemia: unusual course with late onset and fatal outcome. *Metabolism: clinical and experimental* 53, 809-810.
- Lynen, F., 1961. Biosynthesis of saturated fatty acids. *Federation proceedings* 20, 941-951.
- M**acDonald, A., Gokmen-Ozel, H., Daly, A., 2009. Changing dietary practices in phenylketonuria. *Turk J Pediatr* 51, 409-415.
- MacFabe, D.F., Cain, D.P., Rodriguez-Capote, K., Franklin, A.E., Hoffman, J.E., Boon, F., Taylor, A.R., Kavaliers, M., Ossenkopp, K.P., 2007. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behavioural brain research* 176, 149-169.

- MacFabe, D.F., Cain, N.E., Boon, F., Ossenkopp, K.P., Cain, D.P., 2011. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural brain research* 217, 47-54.
- Magyar, K., Halmosi, R., Palfi, A., Feher, G., Czopf, L., Fulop, A., Battyany, I., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, E., 2012. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clinical hemorheology and microcirculation* 50, 179-187.
- Malerba, A., Thorogood, F.C., Dickson, G., Graham, I.R., 2009. Dosing regimen has a significant impact on the efficiency of morpholino oligomer-induced exon skipping in mdx mice. *Human gene therapy* 20, 955-965.
- Malik, A.N., Czajka, A., 2013. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion* 13, 481-492.
- Manzi, B., Loizzo, A.L., Giana, G., Curatolo, P., 2008. Autism and metabolic diseases. *Journal of child neurology* 23, 307-314.
- Maquat, L.E., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 89-99.
- Marchetti, D.P., Donida, B., da Rosa, H.T., Manini, P.R., Moura, D.J., Saffi, J., Deon, M., Mescka, C.P., Coelho, D.M., Jardim, L.B., Vargas, C.R., 2015. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 43, 8-15.
- Mardach, R., Verity, M.A., Cederbaum, S.D., 2005. Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy. *Molecular genetics and metabolism* 85, 286-290.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling* 11, 2685-2700.
- Martin, M.A., Blazquez, A., Gutierrez-Solana, L.G., Fernandez-Moreira, D., Briones, P., Andreu, A.L., Garesse, R., Campos, Y., Arenas, J., 2005. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUF51 gene. *Archives of neurology* 62, 659-661.
- Martinez, A., Knappskog, P.M., Olafsdottir, S., Doskeland, A.P., Eiken, H.G., Svebak, R.M., Bozzini, M., Apold, J., Flatmark, T., 1995. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *The Biochemical journal* 306, 589-597.
- Martinez, B., del Hoyo, P., Martin, M.A., Arenas, J., Perez-Castillo, A., Santos, A., 2001. Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *Journal of neurochemistry* 78, 1054-1063.

- Matalon, R., Michals-Matalon, K., Bhatia, G., Burlina, A.B., Burlina, A.P., Braga, C., Fiori, L., Giovannini, M., Grechanina, E., Novikov, P., Grady, J., Tyring, S.K., Guttler, F., 2007. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PMatsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., Reed, J.C., 1998. The Mitochondrial FOF1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Molecular cell* 1, 327-336.
- McArdle, F., Pattwell, D.M., Vasilaki, A., McArdle, A., Jackson, M.J., 2005. Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells. *Free radical biology & medicine* 39, 651-657.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244, 6049-6055.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., Franklin, R.A., 2006. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling* 8, 1775-1789.
- McDonald, J.D., Bode, V.C., Dove, W.F., Shedlovsky, A., 1990. The use of N-ethyl-N-nitrosourea to produce mouse models for human phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *Progress in clinical and biological research* 340C, 407-413.
- McManus, M.J., Murphy, M.P., Franklin, J.L., 2011. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 15703-15715.
- Mellon, A.F., Deshpande, S.A., Mathers, J.C., Bartlett, K., 2000. Effect of oral antibiotics on intestinal production of propionic acid. *Archives of disease in childhood* 82, 169-172.
- Merinero, B., Perez-Cerda, C., Desviat, L., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., 2011. Mitochondrial organic acidurias. Part I: biochemical and molecular basis. *Mitochondrial pathophysiology. Research Signpost, Kerala (India)*, 145-171.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D., 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free radical biology & medicine* 8, 95-108.
- Miranda, F.F., Teigen, K., Thorolfsson, M., Svebak, R.M., Knappskog, P.M., Flatmark, T., Martinez, A., 2002. Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *The Journal of biological chemistry* 277, 40937-40943.
- Miyazaki, T., Ohura, T., Kobayashi, M., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Hata, I., Aoki, Y., Yang, X., Minjares, C., Haruta, I., Uto, H., Ito, Y., Muller, U., 2001. Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene. *The Journal of biological chemistry* 276, 35995-35999.
- Mochalkin, I., Miller, J.R., Evdokimov, A., Lightle, S., Yan, C., Stover, C.K., Waldrop, G.L., 2008. Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase. *Protein science : a publication of the Protein Society* 17, 1706-1718.
- Mokni, M., Elkahoui, S., Limam, F., Amri, M., Aouani, E., 2007. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochemical research* 32, 981-987.

- Morcos, P.A., 2001. Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells. *Genesis* 30, 94-102.
- Morcos, P.A., Li, Y., Jiang, S., 2008. Vivo-Morpholinos: a non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *BioTechniques* 45, 613-614.
- Mota, S.I., Costa, R.O., Ferreira, I.L., Santana, I., Caldeira, G.L., Padovano, C., Fonseca, A.C., Baldeiras, I., Cunha, C., Letra, L., Oliveira, C.R., Pereira, C.M., Rego, A.C., 2015. Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1852, 1428-1441.
- Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H., 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry* 279, 49064-49073.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335-350.
- Murphy, M.P., 2001. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. *Expert opinion on biological therapy* 1, 753-764.
- Murphy, M.P., 2008. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1777, 1028-1031.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417, 1-13.
- N**ohl, H., Gille, L., Staniek, K., 2004. The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Acta biochimica Polonica* 51, 223-229.
- North, K.N., Korson, M.S., Gopal, Y.R., Rohr, F.J., Brazelton, T.B., Waisbren, S.E., Warman, M.L., 1995. Neonatal-onset propionic acidemia: neurologic and developmental profiles, and implications for management. *The Journal of pediatrics* 126, 916-922.
- Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.
- O**gino, W., Takeshima, Y., Nishiyama, A., Okizuka, Y., Yagi, M., Tsuneishi, S., Saiki, K., Kugo, M., Matsuo, M., 2007. Mutation analysis of the ornithine transcarbamylase (OTC) gene in five Japanese OTC deficiency patients revealed two known and three novel mutations including a deep intronic mutation. *The Kobe journal of medical sciences* 53, 229-240.
- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadinanos, J., Lopez-Mejia, I.C., Quiros, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzman, G., Varela, I., Depetris, D., de Carlos, F., Cobo, J., Andres, V., De Sandre-Giovannoli, A., Freije, J.M., Levy, N., Lopez-Otin, C., 2011. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science translational medicine* 3, 106ra107.
- Ostergaard, E., Hansen, F.J., Sorensen, N., Duno, M., Vissing, J., Larsen, P.L., Faeroe, O., Thorgrimsson, S., Wibrand, F., Christensen, E., 2007. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain* 130, 853-861.
- Otera, H., Mihara, K., 2012. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *International journal of cell biology* 2012, 821676. doi: 10.1155/2012/821676.
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., Mandal, S., Banerjee, U., 2008. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nature genetics* 40, 356-361.

- Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C.-T., Smith, R.J., Stephens, K., Carrillo-Carrasco, N., Venditti, C., 2012. Propionic Acidemia.
- Pampols, T., 2010. Inherited metabolic rare disease. *Advances in experimental medicine and biology* 686, 397-431.
- Parra, M.K., Gee, S., Mohandas, N., Conboy, J.G., 2011. Efficient in vivo manipulation of alternative pre-mRNA splicing events using antisense morpholinos in mice. *The Journal of biological chemistry* 286, 6033-6039.
- Pena, L., Burton, B.K., 2012. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *American journal of medical genetics. Part A* 158A, 1641-1646.
- Perez, B., Rodriguez-Pascau, L., Vilageliu, L., Grinberg, D., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2010. Present and future of antisense therapy for splicing modulation in inherited metabolic disease. *Journal of inherited metabolic disease* 33, 397-403.
- Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2012. Readthrough strategies for therapeutic suppression of nonsense mutations in inherited metabolic disease. *Molecular syndromology* 3, 230-236.
- Perez-Cerda, C., Clavero, S., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L.R., Ugarte, M., 2003. Functional analysis of PCCB mutations causing propionic acidemia based on expression studies in deficient human skin fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1638, 43-49.
- Perez-Cerda, C., Merinero, B., Rodriguez-Pombo, P., Perez, B., Desviat, L.R., Muro, S., Richard, E., Garcia, M.J., Gangoiti, J., Ruiz Sala, P., Sanz, P., Briones, P., Ribes, A., Martinez-Pardo, M., Campistol, J., Perez, M., Lama, R., Murga, M.L., Lema-Garrett, T., Verdu, A., Ugarte, M., 2000. Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidemia patients. *European journal of human genetics : EJHG* 8, 187-194.
- Pettenuzzo, L.F., Schuck, P.F., Fontella, F., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Netto, C.A., Wajner, M., 2002. Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 73, 623-629.
- Pey, A.L., Stricher, F., Serrano, L., Martinez, A., 2007. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *American journal of human genetics* 81, 1006-1024.
- Pey, A.L., Ying, M., Cremades, N., Velazquez-Campoy, A., Scherer, T., Thony, B., Sancho, J., Martinez, A., 2008. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *The Journal of clinical investigation* 118, 2858-2867.
- Pietz, J., Kreis, R., Rupp, A., Mayatepek, E., Rating, D., Boesch, C., Bremer, H.J., 1999. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *The Journal of clinical investigation* 103, 1169-1178.
- Pozzoli, U., Sironi, M., 2005. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1579-1604.

- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., Hubbard, B.P., Varela, A.T., Davis, J.G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A.P., Coppari, R., Palmeira, C.M., de Cabo, R., Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism* 15, 675-690.
- Pros, E., Fernandez-Rodriguez, J., Canet, B., Benito, L., Sanchez, A., Benavides, A., Ramos, F.J., Lopez-Ariztegui, M.A., Capella, G., Blanco, I., Serra, E., Lazaro, C., 2009. Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Human mutation* 30, 454-462.
- Puglisi-Allegra, S., Cabib, S., Pascucci, T., Ventura, R., Cali, F., Romano, V., 2000. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* 11, 1361-1364.
- R**afique, M., 2013a. Clinical spectrum of propionic acidaemia. *Journal of nutrition and metabolism* 2013, 975964. doi: 10.1155/2013/975964.
- Rafique, M., 2013b. Propionic acidaemia: demographic characteristics and complications. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 26, 497-501.
- Ramalho, A.S., Clarke, L.A., Sousa, M., Felicio, V., Barreto, C., Lopes, C., Amaral, M.D., 2015. Comparative ex vivo, in vitro and in silico analyses of a CFTR splicing mutation: Importance of functional studies to establish disease liability of mutations. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. S1569-1993(15)00039-9. doi: 10.1016/j.jcf.2015.02.002.
- Ray, G., Husain, S.A., 2002. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian journal of experimental biology* 40, 1213-1232.
- Reed, T.T., 2011. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free radical biology & medicine* 51, 1302-1319.
- Rela, M., Muiesan, P., Andreani, P., Gibbs, P., Mieli-Vergani, G., Mowat, A.P., Heaton, N.D., 1997. Auxiliary liver transplantation for metabolic diseases. *Transplant Proc* 29, 444-445.
- Ribas, G.S., Sitta, A., Wajner, M., Vargas, C.R., 2011. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cellular and molecular neurobiology* 31, 653-662.
- Ribeiro, C.A., Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., Grando, V., Schmidt, A.L., Ferreira, G.C., Perry, M.L., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2008. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochemical research* 33, 114-124.
- Richard, E., Alvarez-Barrientos, A., Perez, B., Desviat, L.R., Ugarte, M., 2007. Methylmalonic acidaemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *The Journal of pathology* 213, 453-461.
- Richard, E., Desviat, L.R., Ugarte, M., Perez, B., 2013. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *Journal of cellular biochemistry* 114, 183-191.

- Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Desviat, L.R., Gort, L., Briones, P., Leal, F., Perez-Cerda, C., Ribes, A., Ugarte, M., Perez, B., Group, M.W., 2009. Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cb1C) with homocystinuria (MMACHC). *Human mutation* 30, 1558-1566.
- Rigo, F., Seth, P.P., Bennett, C.F., 2014. Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Advances in experimental medicine and biology* 825, 303-352.
- Rincon, A., Aguado, C., Desviat, L.R., Sanchez-Alcudia, R., Ugarte, M., Perez, B., 2007. Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced messenger RNA. *American journal of human genetics* 81, 1262-1270.
- Robb, E.L., Page, M.M., Wiens, B.E., Stuart, J.A., 2008a. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and biophysical research communications* 367, 406-412.
- Robb, E.L., Winkelmoen, L., Visanji, N., Brotchie, J., Stuart, J.A., 2008b. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 254-259.
- Roberts, J., Palma, E., Sazani, P., Orum, H., Cho, M., Kole, R., 2006. Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 471-475.
- Romano, S., Valayannopoulos, V., Touati, G., Jais, J.P., Rabier, D., de Keyser, Y., Bonnet, D., de Lonlay, P., 2010. Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation. *The Journal of pediatrics* 156, 128-134.
- Rossi, L., Pierige, F., Carducci, C., Gabucci, C., Pascucci, T., Canonico, B., Bell, S.M., Fitzpatrick, P.A., Leuzzi, V., Magnani, M., 2014. Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pah(enu2) mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 194, 37-44.
- Rosignol, R., Karbowski, M., 2009. Editorial of the directed issue on mitochondrial dynamics in biology and medicine. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1748-1749.
- Sadi, G., Bozan, D., Yildiz, H.B., 2014. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Molecular and cellular biochemistry* 393, 111-122.
- Saeidnia, S., Abdollahi, M., 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and applied pharmacology* 273, 442-455.
- Sahashi, K., Hua, Y., Ling, K.K., Hung, G., Rigo, F., Horev, G., Katsuno, M., Sobue, G., Ko, C.P., Bennett, C.F., Krainer, A.R., 2012. TSUNAMI: an antisense method to phenocopy splicing-associated diseases in animals. *Genes & development* 26, 1874-1884.
- Sahashi, K., Ling, K.K., Hua, Y., Wilkinson, J.E., Nomakuchi, T., Rigo, F., Hung, G., Xu, D., Jiang, Y.P., Lin, R.Z., Ko, C.P., Bennett, C.F., Krainer, A.R., 2013. Pathological impact of SMN2 mis-splicing in adult SMA mice. *EMBO molecular medicine* 5, 1586-1601.

- Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Gait, M.J., 2012. Overview of alternative oligonucleotide chemistries for exon skipping. *Methods in molecular biology* 867, 365-378.
- Salmi, H., Leonard, J.V., Lapatto, R., 2012. Patients with organic acidurias have an altered thiol status. *Acta paediatrica* 101, e505-508.
- Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2011. Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia. *Molecular genetics and metabolism* 102, 134-138.
- Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2012. Feasibility of nonsense mutation readthrough as a novel therapeutical approach in propionic acidemia. *Human mutation* 33, 973-980.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467
- Santacatterina, F., Chamorro, M., de Arenas, C.N., Navarro, C., Martin, M.A., Cuezva, J.M., Sanchez-Arago, M., 2015. Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases. *Journal of translational medicine* 13(1):65. doi: 10.1186/s12967-015-0424-1.
- Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I., Cuezva, J.M., 2006. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27, 925-935.
- Santos-Sierra, S., Kirchmair, J., Perna, A.M., Reiss, D., Kemter, K., Roschinger, W., Glossmann, H., Gersting, S.W., Muntau, A.C., Wolber, G., Lagler, F.B., 2012. Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Human molecular genetics* 21, 1877-1887.
- Sarkissian, C.N., Boulais, D.M., McDonald, J.D., Scriver, C.R., 2000. A heteroallelic mutant mouse model: A new orthologue for human hyperphenylalaninemia. *Molecular genetics and metabolism* 69, 188-194.
- Sarkissian, C.N., Gamez, A., Wang, L., Charbonneau, M., Fitzpatrick, P., Lemontt, J.F., Zhao, B., Vellard, M., Bell, S.M., Henschell, C., Lambert, A., Tsuruda, L., Stevens, R.C., Scriver, C.R., 2008. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20894-20899.
- Sarkissian, C.N., Ying, M., Scherer, T., Thony, B., Martinez, A., 2012. The mechanism of BH4 -responsive hyperphenylalaninemia--as it occurs in the ENU1/2 genetic mouse model. *Human mutation* 33, 1464-1473.
- Sassi, N., Mattarei, A., Azzolini, M., Szabo, I., Paradisi, C., Zoratti, M., Biasutto, L., 2014. Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 1781-1789.
- Satrústegui, J., Pardo, B., Del Arco, A., 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological reviews* 87, 29-67.

- Saudubray, J.M., Touati, G., Delonlay, P., Jouvét, P., Schlenzig, J., Narcy, C., Laurent, J., Rabier, D., Kamoun, P., Jan, D., Revillon, Y., 1999. Liver transplantation in propionic acidaemia. *European journal of pediatrics* 158 Suppl 2, S65-69.
- Sauer, S.W., Okun, J.G., Hoffmann, G.F., Koelker, S., Morath, M.A., 2008. Impact of short- and medium-chain organic acids, acylcarnitines, and acyl-CoAs on mitochondrial energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1777, 1276-1282.
- Sazani, P., Gemignani, F., Kang, S.H., Maier, M.A., Manoharan, M., Persmark, M., Bortner, D., Kole, R., 2002. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nature biotechnology* 20, 1228-1233.
- Schlenzig, J.S., Poggi-Travert, F., Laurent, J., Rabier, D., Jan, D., Wendel, U., Sewell, A.C., Revillon, Y., Kamoun, P., Saudubray, J.M., 1995. Liver transplantation in two cases of propionic acidaemia. *Journal of inherited metabolic disease* 18, 448-461.
- Scholl-Burgi, S., Sass, J.O., Heinz-Erian, P., Amann, E., Haberlandt, E., Albrecht, U., Ertl, C., Sigl, S.B., Lagler, F., Rostasy, K., Karall, D., 2010. Changes in plasma amino acid concentrations with increasing age in patients with propionic acidemia. *Amino acids* 38, 1473-1481.
- Schreiber, J., Chapman, K.A., Summar, M.L., Ah Mew, N., Sutton, V.R., MacLeod, E., Stagni, K., Ueda, K., Franks, J., Island, E., Matern, D., Pena, L., Smith, B., Urv, T., Venditti, C., Chakarapani, A., Gropman, A.L., 2012. Neurologic considerations in propionic acidemia. *Molecular genetics and metabolism* 105, 10-15.
- Schwab, M.A., Sauer, S.W., Okun, J.G., Nijtmans, L.G., Rodenburg, R.J., van den Heuvel, L.P., Droese, S., Brandt, U., Hoffmann, G.F., Ter Laak, H., Kolker, S., Smeitink, J.A., 2006. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *The Biochemical journal* 398, 107-112.
- Scriver, C.R., Hurtubise, M., Konecki, D., Phommarinh, M., Prevost, L., Erlandsen, H., Stevens, R., Waters, P.J., Ryan, S., McDonald, D., Sarkissian, C., 2003. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Human mutation* 21, 333-344.
- Scriver, C.R., 2007. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human mutation* 28, 831-845.
- Scriver, C.R., Kaufman S., 2001. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Diseases*. Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle D., Sly W.S., McGraw-Hill.:1667-1724.
- Shedlovsky, A., McDonald, J.D., Symula, D., Dove, W.F., 1993. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics* 134, 1205-1210.
- Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N.S., Epstein, P.N., 2006. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 55, 798-805.
- Shiman, R., Gray, D.W., Hill, M.A., 1994. Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. I. Kinetic properties of the enzyme's iron and enzyme reduction site. *The Journal of biological chemistry* 269, 24637-24646.

- Shultz, S.R., MacFabe, D.F., Ossenkopp, K.P., Scratch, S., Whelan, J., Taylor, R., Cain, D.P., 2008. Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology* 54, 901-911.
- Sies, H., Mehlhorn, R., 1986. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Archives of biochemistry and biophysics* 251, 393-396.
- Singh, R.K., Cooper, T.A., 2012. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in molecular medicine* 18, 472-482.
- Smeitink, J., Sengers, R., Trijbels, F., van den Heuvel, L., 2001. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33, 259-266.
- Smith, C.B., Kang, J., 2000. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11014-11019.
- Smith, I., Beasley, M.G., Ades, A.E., 1991. Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria. *Archives of disease in childhood* 66, 311-316.
- Smith, R.A., Murphy, M.P., 2010. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201, 96-103.
- Sokoloff, L., Kety, S.S., 1960. Regulation of cerebral circulation. *Physiological reviews*. Supplement 4, 38-44.
- Son, Y., Cheong, Y.K., Kim, N.H., Chung, H.T., Kang, D.G., Pae, H.O., 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of signal transduction* 2011, 792639. doi: 10.1155/2011/792639
- Spanier, G., Xu, H., Xia, N., Tobias, S., Deng, S., Wojnowski, L., Forstermann, U., Li, H., 2009. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 60 Suppl 4, 111-116.
- Sperl, W., Murr, C., Skladal, D., Sass, J.O., Suormala, T., Baumgartner, R., Wendel, U., 2000. Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidemia. *European journal of pediatrics* 159, 54-58.
- Spitali, P., Aartsma-Rus, A., 2012. Splice modulating therapies for human disease. *Cell* 148, 1085-1088.
- Stewart, P.M., Walser, M., 1980. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid-loaded rats. Proposed mechanism for the hyperammonemia of propionic and methylmalonic acidemia. *The Journal of clinical investigation* 66, 484-492.
- Suen, D.F., Norris, K.L., Youle, R.J., 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development* 22, 1577-1590.
- Summerton, J., 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et biophysica acta* 1489, 141-158.

- Suormala, T., Wick, H., Bonjour, J.P., Baumgartner, E.R., 1985. Rapid differential diagnosis of carboxylase deficiencies and evaluation for biotin-responsiveness in a single blood sample. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 145, 151-162.
- Supinski, G., Nethery, D., Stofan, D., DiMarco, A., 1999. Extracellular calcium modulates generation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm. *Journal of applied physiology* 87, 2177-2185.
- Sutton, V.R., Chapman, K.A., Gropman, A.L., MacLeod, E., Stagni, K., Summar, M.L., Ueda, K., Ah Mew, N., Franks, J., Island, E., Matern, D., Pena, L., Smith, B., Urv, T., Venditti, C., Chakarapani, A., 2012. Chronic management and health supervision of individuals with propionic acidemia. *Molecular genetics and metabolism* 105, 26-33.
- Swayze, E.E., Siwkowski, A.M., Wancewicz, E.V., Migawa, M.T., Wyrzykiewicz, T.K., Hung, G., Monia, B.P., Bennett, C.F., 2007. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic acids research* 35, 687-700.
- Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., Yu, C.C., Mori, K., Oda, T., Kuga, A., Kurahashi, H., Akman, H.O., DiMauro, S., Kaji, R., Yokota, T., Takeda, S., Toda, T., 2011. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478, 127-131.
- Tatem, K.S., Quinn, J.L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., Nagaraju, K., 2014. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *Journal of Visualized Experiments*, e51785-e51785.
- Thomas, R.H., Foley, K.A., Mephram, J.R., Tichenoff, L.J., Possmayer, F., MacFabe, D.F., 2010. Altered brain phospholipid and acylcarnitine profiles in propionic acid infused rodents: further development of a potential model of autism spectrum disorders. *Journal of neurochemistry* 113, 515-529.
- Thompson, G.N., Chalmers, R.A., 1990. Increased urinary metabolite excretion during fasting in disorders of propionate metabolism. *Pediatric research* 27, 413-416.
- Thompson, G.N., Walter, J.H., Bresson, J.L., Bonnefont, J.P., Saudubray, J.M., Leonard, J.V., Halliday, D., 1990a. In vivo propionate oxidation as a prognostic indicator in disorders of propionate metabolism. *European journal of pediatrics* 149, 408-411.
- Thompson, G.N., Walter, J.H., Bresson, J.L., Ford, G.C., Lyonnet, S.L., Chalmers, R.A., Saudubray, J.M., Leonard, J.V., Halliday, D., 1990b. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism: clinical and experimental* 39, 1133-1137.
- Thony, B., Auerbach, G., Blau, N., 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *The Biochemical journal* 347 Pt 1, 1-16.
- Thorolfsson, M., Teigen, K., Martinez, A., 2003. Activation of phenylalanine hydroxylase: effect of substitutions at Arg68 and Cys237. *Biochemistry* 42, 3419-3428.
- Thusberg, J., Olatubosun, A., Vihinen, M., 2011. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Human mutation* 32, 358-368.

- Touati, G., Valayannopoulos, V., Mention, K., de Lonlay, P., Jouvét, P., Depondt, E., Assoun, M., Souberbielle, J.C., Rabier, D., Ogier de Baulny, H., Saudubray, J.M., 2006. Methylmalonic and propionic acidurias: management without or with a few supplements of specific amino acid mixture. *Journal of inherited metabolic disease* 29, 288-298.
- Tourian, A., 1971. Activation of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine. *Biochimica et biophysica acta* 242, 345-354.
- Trushina, E., McMurray, C.T., 2007. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 145, 1233-1248.
- Turgeon, C.T., Magera, M.J., Cuthbert, C.D., Loken, P.R., Gavrillov, D.K., Tortorelli, S., Raymond, K.M., Oglesbee, D., Rinaldo, P., Matern, D., 2010. Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry* 56, 1686-1695.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552, 335-344.
- U**garte, M., Lopez-Lahoya, J., Garcia, M.L., Benavides, J., Valdivieso, F., 1980. Possible explanation for hyperglycinaemia in propionic acidaemia and methylmalonic acidaemia: propionate and methylmalonate inhibit liver and brain mitochondrial glycine transport. *Journal of inherited metabolic disease* 2, 93-99.
- Underhaug, J., Aubi, O., Martinez, A., 2012. Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Current topics in medicinal chemistry* 12, 2534-2545.
- V**an Calcar, S.C., Ney, D.M., 2012. Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino Acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112, 1201-1210.
- Viecelli, H.M., Harbottle, R.P., Wong, S.P., Schlegel, A., Chuah, M.K., VandenDriessche, T., Harding, C.O., Thony, B., 2014. Treatment of phenylketonuria using minicircle-based naked-DNA gene transfer to murine liver. *Hepatology* 60, 1035-1043.
- W**ahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouv, J., Oerum, H., Jacobsen, M.H., Wengel, J., 2000. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5633-5638.
- Wajner, M., Goodman, S.I., 2011. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43, 31-38.
- Wang, G.S., Cooper, T.A., 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics* 8, 749-761.
- Wang, X., Quinn, P.J., 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in lipid research* 38, 309-336.

- Warren, M.S., Hughes, S.G., Singleton, W., Yamashita, M., Genovese, M.C., 2015. Results of a proof of concept, double-blind, randomized trial of a second generation antisense oligonucleotide targeting high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 17(1):80. doi: 10.1186/s13075-015-0578-5.
- Webb, T.R., Parfitt, D.A., Gardner, J.C., Martinez, A., Bevilacqua, D., Davidson, A.E., Zito, I., Thiselton, D.L., Ressa, J.H., Apergi, M., Schwarz, N., Kanuga, N., Michaelides, M., Cheetham, M.E., Gorin, M.B., Hardcastle, A.J., 2012. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Human molecular genetics* 21, 3647-3654.
- Weidig, P., McMaster, D., Bayraktutan, U., 2004. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes, obesity & metabolism* 6, 432-441.
- Weidinger, A., Kozlov, A.V., 2015. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5, 472-484.
- Weidman, S.W., Drysdale, G.R., 1979. The biosynthesis of methylcitrate. *The Biochemical journal* 177, 169-174.
- Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., Kerem, B., Kerem, E., 2003. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *The New England journal of medicine* 349, 1433-1441.
- Winterbourn, C.C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology letters* 82-83, 969-974.
- Wu, B., Li, Y., Morcos, P.A., Doran, T.J., Lu, P., Lu, Q.L., 2009. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 864-871.
- Wu, Y.T., Wu, S.B., Lee, W.Y., Wei, Y.H., 2010. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201, 147-156.
- Xu, X., Arriaga, E.A., 2009. Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine. *Free radical biology & medicine* 46, 905-913.
- Yang, B., Ming, X., Cao, C., Laing, B., Yuan, A., Porter, M., Hull-Ryde, E., Maddry, J., Suto, M., Janzen, W., 2015. High-throughput screening identifies small molecules that enhance the pharmacological effects of oligonucleotides. *Nucleic acids research* 43, 1987-1996.
- Yang, K.C., Bonini, M.G., Dudley, S.C., Jr., 2014. Mitochondria and arrhythmias. *Free radical biology & medicine* 71, 351-361.
- Yano, S., Li, L., Le, T.P., Moseley, K., Guedalia, A., Lee, J., Gonzalez, I., Boles, R.G., 2003. Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome. *Journal of inherited metabolic disease* 26, 481-488.

Yorifuji, T., Muroi, J., Uematsu, A., Nakahata, T., Egawa, H., Tanaka, K., 2000. Living-related liver transplantation for neonatal-onset propionic acidemia. *The Journal of pediatrics* 137, 572-574.

171

Youle, R.J., Karbowski, M., 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 657-663.

Zanetta, C., Nizzardo, M., Simone, C., Monguzzi, E., Bresolin, N., Comi, G.P., Corti, S., 2014. Molecular therapeutic strategies for spinal muscular atrophies: current and future clinical trials. *Clinical therapeutics* 36, 128-140.

Zhao, Y., Zhao, L., Ischenko, I., Bao, Q., Schwarz, B., Niess, H., Wang, Y., Renner, A., Mysliwicz, J., Jauch, K.W., Nelson, P.J., Ellwart, J.W., Bruns, C.J., Camaj, P., 2015. Antisense inhibition of microRNA-21 and microRNA-221 in tumor-initiating stem-like cells modulates tumorigenesis, metastasis, and chemotherapy resistance in pancreatic cancer. *Targeted oncology*. doi 10.1007/s11523-015-0360-2

Zhou, Y.Y., Li, Y., Jiang, W.Q., Zhou, L.F., 2015. MAPK/JNK signaling: A potential autophagy regulation pathway. *Bioscience reports*. 54(10):4761-7. doi: 10.1021/acs.inorgchem.5b00189.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* 94, 909-950.

Zschocke, J., Mallory, J.P., Eiken, H.G., Nevin, N.C., 1997. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum Genet* 100, 189-194.



Material Suplementario



Tabla S1. Genes implicados en hiperfenilalaninemias (HPA) y acidemia propiónica (AP).

Gen	Proteína	OMIM	Localización	Exones	Aminoácidos	Enzima
<i>PCCA</i>	PCC- α	#232000	Chr 13q32	24	728	EC 6.4.1.3
<i>PCCB</i>	PCC- β	#232050	Chr 3q13.3-q22	15	539	EC 6.4.1.3
<i>PAH</i>	PAH	#261600	Chr 12q23.2	13	452	EC 1.14.16.
<i>GCH1</i>	GTPCH	#233910	Chr 14q22.2	6	250	E.C. 3.5.4.16
<i>PTS</i>	PTPS	#261640	Chr 11q23.1	6	145	EC 4.6.1.1
<i>SPR</i>	SR	#612716	Chr 2p13.2	3	261	EC 1.1.1.153
<i>QDPR</i>	DHPR	#261630	Chr 4q15.32	6	244	EC 1.5.1.34
<i>PCBD1</i>	PCD	#264070	Chr 10q22	4	104	EC 4.2.1.9

Tabla S2. Presentación clínica y sintomatología en pacientes con acidemia propiónica (AP).

Presentación	Fenotipo	Sintomatología
Neonatal	Severo	Problemas de alimentación, vómitos, somnolencia, letargia, coma, hipotonía, retraso cognitivo, cardiomiopatía, disfunción auditiva, retraso en el desarrollo, mioclonías y convulsiones.
Tardía	Suave	Asociada a infecciones, problemas gastrointestinales

Tabla S3. Deficiencias en complejos OXPHOS asociado a cardiomiopatías en pacientes acidemia propiónica (AP).

Edad	Complejos de la cadena respiratoria deficientes	Tejido	Referencias
8 años	Complejo I	Músculo y corazón	(Mardach <i>et al.</i> , 2005)
6 años	Complejos III y IV	Músculo, corazón e hígado	(de Keyzer <i>et al.</i> , 2009)
8 años	Complejo IV	Músculo e hígado	(de Keyzer <i>et al.</i> , 2009)
11 años	Complejos II,III,IV	Músculo	(Fragaki <i>et al.</i> , 2011)
	Complejos I, I+III, II+III	Hígado	
15 años	Complejo IV	Corazón	(Fragaki <i>et al.</i> , 2011)

Tabla S4. Síntomas neurológicos más frecuentes en pacientes con acidemia propiónica (AP).

Síntomas	Pacientes analizados	% Total	Referencias
Discapacidad intelectual	127	74	(Grunert <i>et al.</i> , 2013; Pena y Burton, 2012; Rafique, 2013a, b)
Letargia	145	63	(Lehnert <i>et al.</i> , 1994; Rafique, 2013a, b; Wolf <i>et al.</i> , 1981)
Hipotonía	190	57	(Grunert <i>et al.</i> , 2013; Lehnert <i>et al.</i> , 1994; Rafique, 2013a, b; Wolf <i>et al.</i> , 1981)
Convulsiones	220	42	(Haberlandt <i>et al.</i> , 2009; Lehnert <i>et al.</i> , 1994; Pena y Burton, 2012; Rafique, 2013a, b; Wolf <i>et al.</i> , 1981)

Tabla S5. Sintomatología clínica de pacientes con fenilcetonuria (PKU).

Presentación clínica	Fenotipo	Manifestaciones clínicas y sintomatología
Neonatal	Grave	Cabeza poco desarrollada en proporción al resto del cuerpo, retraso cognitivo, comportamiento hiperactivo, sacudidas espasmódicas de brazos y piernas, convulsiones, erupciones en la piel, hipopigmentación (piel y cabello), pérdida de la coordinación, psicosis, autolesiones.

Tabla S6. Principales características de los modelos animales de hiperfenilalaninemias (HPAs)

Nombre	Mutación	Phe en sangre	Actividad PAH	Fenotipo
<i>Pah</i> ^{enu1}	c.364 T>C; p.V106A	Normal	5-24%	Normal
<i>Pah</i> ^{enu2}	c. 835 T>C; p.F263S	1500-2500 $\mu\text{mol/L}$	-	PKU
<i>Pah</i> ^{enu3}	c. 1126+2T>G	1500-2500 $\mu\text{mol/L}$	-	PKU
<i>Pah</i> ^{enu1/2}	p.V106A / p.F263S	150-200 $\mu\text{mol/L}$	2,5-5%	HPA

Tabla S7. Principales especies reactivas de oxígeno (ROS).

ROS	Radicales	No radicales
	O_2^- (Superóxido)	H_2O_2 (peróxido de hidrógeno)
OH (hidroxilo)	HOCl (ácido hipocloroso)	
ROO^\cdot (peroxilo)	HOBr (ácido hipobromoso)	
RO^\cdot (alcoxilo)	O_3 (ozono)	
HO_2^\cdot (hidroperóxido)	$^1\text{O}_2$ (oxígeno singlete)	

Publicaciones



Parte de este trabajo ha sido recogido en las siguientes publicaciones:

Gallego-Villar, L., Viecelli, H.M., Perez, B., Harding, C.O., Ugarte, M., Thony, B., Desviat, L.R., 2014b. A sensitive assay system to test antisense oligonucleotides for splice suppression therapy in the mouse liver. *Mol Ther Nucleic Acids* 3, e193.

179

Gallego-Villar, L., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L.R., Richard, E., 2014a. Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 452, 457-461.

Gallego-Villar, L., Perez-Cerda, C., Perez, B., Abia, D., Ugarte, M., Richard, E., Desviat, L.R., 2013. Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia. *Journal of inherited metabolic disease* 36, 731-740.

Lianou, D., **Gallego, L.**, Michelakakis, H., Perez-Cerda, C., Perez, B., Ginis, S., Jakobs, C., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2010. Functional analysis of a novel mutation in the PCCA gene identified in a late-infantile onset propionic acidemia patient. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411, 1388-1389.

Perez, B., Nevado, J., Lapunzina, P., **Gallego, L.**, Perez-Cerda, C., Merinero, B., Ugarte, M., Desviat, L.R., 2012. Segmental uniparental disomy leading to homozygosity for a pathogenic mutation in three recessive metabolic diseases. *Molecular genetics and metabolism* 105, 270-271.