

Universidad Autónoma de Madrid



Programa de doctorado en Biociencias Moleculares

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS  
GENES IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN OXPHOS Y SU  
POSIBLE ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS**

**Sara Palacios Zambrano**

Madrid, 2018

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



## **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN OXPHOS Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN A PATOLOGÍAS HUMANAS**

Memoria presentada por la Licenciada en Bioquímica

**Sara Palacios Zambrano**

para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

**Dr. Miguel Ángel Fernández Moreno**

Profesor titular de Universidad

**Dr. Rafael Garesse Alarcón**

Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM

Facultad de Medicina  
Departamento de Bioquímica



**D. Miguel Ángel Fernández Moreno**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid y **D. Rafael Garesse Alarcón**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, como Directores de Tesis,

CERTIFICAN:

Que Doña Sara Palacios Zambrano con DNI 53665302T, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado:

**“Identificación y caracterización de nuevos genes implicados en la función OXPHOS y su posible asociación a patologías humanas”**

Una vez supervisado el trabajo, avalamos los resultados obtenidos y consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 12 de Marzo de 2018

Miguel Ángel Fernández Moreno

Rafael Garesse Alarcón

Director de tesis

Director de tesis

**Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda de Formación de Profesorado Universitario (FPU) (Ref. FPU12/03672) por parte del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España a Sara Palacios Zambrano.**

*A mis padres*  
*A mi hermana*

## *Agradecimientos*

---

A lo largo de esta tesis doctoral han pasado por mi vida multitud de personas que, de una u otra manera, me han ayudado a llegar donde ahora mismo estoy. Han sido años intensos, de muchas vivencias, buenas y no tan buenas, que me han hecho madurar tanto personal como profesionalmente. Me gustaría daros las gracias a todos porque cada uno de vosotros me habéis hecho crecer en todos los sentidos.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis el Dr. Rafael Garesse Alarcón y el Dr. Miguel Ángel Fernández Moreno. Rafa, gracias por darme la oportunidad de formar parte del B19 cuando hace ya 5 años estaba buscando desde Copenhague dónde realizar el proyecto fin de máster. Nos reunimos en tu despacho e inmediatamente me dijiste que sería bienvenida en vuestro laboratorio. Gracias por tu apoyo en los inicios, que no fueron fáciles, y por tu apoyo y valiosas ideas a lo largo de esta tesis. Gracias también por preocuparte y sugerirme desde tu experiencia qué era lo mejor para mí.

Y por supuesto gracias a ti, Miguel. Por todo. Por enseñarme a tener siempre presente lo que “hay dentro del tubo”, me refiero a ese dibujo que me has hecho tantas veces en las infinitas reuniones que hemos tenido. Gracias por haber compartido conmigo tantos conocimientos y a enseñarme tanto como me has enseñado. ¡A profesor no te gana nadie! Si algún día me dedico a la docencia sin lugar a dudas te tomaré como referencia. Pero sobre todo gracias por todo lo que me has cuidado. Siempre, con simplemente mirarme, sabías si necesitaba esa palmadita en la espalda que tanto agradecía. Gracias por animarme a seguir adelante fuese lo que fuese, gracias por tus correcciones, tus consejos y tu infinita paciencia. A parte de ser un gran investigador, como persona vales millones.

Gracias también a la Dra. Esther Gallardo, que aunque no sea del grupo de iPSC siempre me ha cuidado como si fuese parte de él (aun no siendo tan “mona” como el resto jeje). Gracias por tus consejos, tu sinceridad y comprensión. Por haberme sacado a tomar algo en aquel congreso en Granada, ¡cómo nos pusimos en “El Diamante”!, ¿eh?. Nunca olvidaré tus frases que tanto te caracterizan... (tú ya sabes a las que me refiero). Y tampoco olvidaré tus risas y tu buen humor que hacían los días y las comidas más amenas. Espero que algún día nos crucemos y te pueda decir que he logrado llegar alto, aunque la invitación a la ceremonia del Nobel no haya sido posible jaja.

Y por supuesto quiero agradecer a toda la gente que formó y forma parte del B19. Todos y cada uno de vosotros habéis hecho este camino más fácil y enriquecedor. En primer lugar, quiero acordarme de la gente que ya se fue. Gracias a la Dra. Belén Bornstein, por tu simpatía y la buena energía que transmites. A Milena, que aunque hace mucho que te fuiste dejaste huella con tus “perdón, perdón” y tu ternura. A Rosana, ¡lo que hubiese dado porque hubieses estado hasta el final de esta tesis!. Siempre valoré muchísimo lo organizada y meticulosa que eres (tus cuadernos valen oro). A Cristina y Rubén por haberme dado la oportunidad de desarrollar mis aptitudes

## Agradecimientos

---

docentes. Y por supuesto a Ramiro y Alberto, personas fundamentales para mí en los primeros años de tesis. Ramiro, gracias por haber sido tan buen compañero y amigo, por esas palabras de ánimo y todos los detalles que tuviste hacia mí, hacías que los días fuesen más fáciles y entretenidos. Alberto, te lo diré una y mil veces, gracias por tu humildad, por enseñarme tantas cosas sin esperar nada a cambio, por ser el compañero de trabajo que todo el mundo querría tener. Gracias a ambos por ese fin de semana de festival y esas “cervecitas” al finalizar el día, que oye después de tantas horas trabajando nos las merecíamos. Gracias también a ti Teresa, por todos tus consejos y todos los buenos ratos que hemos pasado. Eres valiente e inteligente, llegarás lejos, lo sé. Gracias también a Cristina. Cristina, ojalá hubieses aparecido antes en mi vida y hubiésemos podido compartir muchos más momentos en la poyata. Eres increíble como persona y compañera. Ojalá el mundo estuviese lleno de gente como tú. Gracias y más gracias.

Y sin duda, gracias a todos los que aún seguís en el laboratorio u os habéis ido hace muy poco. Fran, agradecerte tu disposición en cualquier momento para compartir conocimientos, sobre todo en esta última etapa de tesis. Cris, la mejor *Lab manager* que se pueda tener, valoro mucho lo que haces y cómo lo haces. Gracias por todos los buenos consejos que siempre me has dado. Gracias Lauri, por haber sido mis manos en la última etapa de esta tesis, por haberme comprendido tan bien, por todos tus mensajes optimistas que me llenaban de energía y haberte adaptado estupendamente a mi “caos”, tú me entiendes. Sophie, gracias por tu dulzura, por todo tu interés y apoyo. Siendo tan fuerte como eres llegarás donde te propongas, te deseo toda la suerte del mundo en esta nueva etapa. Luis, que aunque nuestro tiempo juntos haya sido corto, no me cabe ninguna duda de que vales mucho. Suerte con todo. Gracias, por supuesto, a las chicas iPS, Mari Carmen, Marta, Natalie, Vicky, Bea, cada una de vosotras me habéis sacado tantas sonrisas que no tengo palabras para agradeceróslo. Toda la alegría que desbordáis solo os podrá traer cosas maravillosas, y así lo espero.

Gracias también a todos los que habéis pasado por el B20. Gracias a la Dra. Margarita Cervera y al Dr. Juan Arredondo, por vuestra cercanía y vuestros consejos en los seminarios. Gracias Lidia y Bego, por vuestra simpatía y ser tan buenas profesionales. Gracias también a Leti, que me ha entendido tan bien y que aunque coincidimos poco dentro del laboratorio, he tenido el lujo de conocerte después. Gracias Pedro, eres único, no puedo alegrarme más de que te hayas cruzado por mi camino, no sabes cuánto te he echado de menos en estos dos últimos años, te he tenido siempre muy presente. Y gracias a las nuevas generaciones, Sonia, Sara y Chema. Los tres habéis sido un pilar fundamental en estos últimos años, sin vosotros todo hubiese sido mucho más difícil, estoy segura. Me alegra pensar que me llevo a tres grandes amigos.

Y no podría olvidarme del resto de compañeros y amigos que formáis parte del Departamento de Bioquímica y con los que tan buenos ratos he pasado. Gracias Antoñete, porque aparte de que fuiste un gran compañero de carrera, también lo seguiste siendo en los inicios de esta



tesis. Gracias por tus consejos, tu energía, tu positividad y disposición siempre. Gracias Raúl, por absolutamente todo, porque a tu lado uno no deja de aprender nunca. ¡Ya sabes que me encantaría trabajar contigo algún día!. Gracias Néstor, por la tranquilidad que transmites. Gracias Marcos, por todos esos ratitos de descanso en el aparcamiento entre un experimento y otro. Gracias Belén, por haber confiado en mí valía desde que me conociste, por ser la voz de la experiencia, por tu amistad y ese temperamento que a veces me ha costado entender pero que al final se ha hecho querer. Gracias Lourdes, siempre admiraré tu fortaleza. Esa alegría que desprendes, tu buen humor, hace que sea muy fácil quererte. Y gracias Irene, por todos los buenos ratos fuera del laboratorio, y por ser un ejemplo a seguir en todos los sentidos.

También quiero agradecer al resto de personas del Departamento a Ángela, las Martas, Silvia, Omar, César... Porque con cada uno de vosotros he pasado muy buenos momentos dentro y fuera de aquí y por haberme apoyado durante la escritura de esta tesis. Así como a todos los profesionales de los distintos servicios de la UAM y del Instituto de Investigaciones Biomédicas que me han facilitado en numerosas ocasiones el trabajo diario. Muy especialmente gracias a las chicas del Servicio de Protección Radiológica, M<sup>a</sup> Teresa, Raquel y Patricia, que tanto me han ayudado a que la radiactividad estuviese bajo control.

Quiero agradecer también al Dr. Leo G.J. Nijtmans el haberme acogido tres meses en su laboratorio a pesar de las circunstancias. *Leo, thank you very much for sharing with me your wisdom, for your kindness and for let me live that wonderful experience in your laboratory. Thank you Mariël, for being the best technician support one could have. Thanks for your ideas and suggestions.* Y como no, gracias y mil gracias Laura, porque contigo encontré a la mejor compañera e hiciste de mi estancia algo maravilloso. *It was a huge pleasure.*

También quiero dedicar unas pequeñas palabras a mis nuevas compañeras de esta etapa que ahora comienzo. Gracias a la Dra. Gema Moreno por haberme dado esta oportunidad y preocuparse por todo. Y gracias también al resto del equipo, en especial a Cris, Mar y Eva que tanto me están enseñando y con las que espero pasar un largo tiempo.

Y dejando a un lado el terreno científico quiero dar las gracias a también a Raquel y Berta, por todos esos viajes que nos hemos pegado y por los que seguro están por venir. Bertis, gracias por estar siempre ahí, gracias por tu amistad. Y a mis amigas de siempre, Ana, Paloma e Itziar. Gracias, gracias, gracias, porque sin vosotras todo esto no hubiese sido posible. Porque me habéis escuchado y apoyado siempre en cualquier circunstancia.

Y aunque los deje para el final, sin lugar a dudas esta tesis es vuestra, familia. De mi yaya y mi tío Ángel, que tanto me valoran y me quieren. Y, por su puesto, de mis padres. Papá, mamá, gracias por vuestro amor infinito, por todo vuestro apoyo, por entender el sacrificio que muchas veces ha conllevado esta tesis. Por ser los que mejor me habéis entendido, por nunca haberme

## Agradecimientos

---

juzgado por absolutamente nada, por haberme dejado tomar mis propias decisiones siempre, aunque siga siendo incapaz de no consultar con vosotros cada paso que doy... Será porque no confío tanto en nadie como en vosotros. Y gracias sobre todo por haberme inculcado tan buenos valores. No tengo palabras para demostrar todo lo que os quiero. Elena, hermanita, sabes que eres un ejemplo para mí, siempre has sabido darme los mejores consejos que podría tener. Gracias por cuidarme tanto siempre desde que nací. Te quiero.

Y gracias Matías, mi compañero de viaje, esta tesis también es tuya de principio a fin. Porque tu apoyo ha sido fundamental para poder llegar hasta este momento. Gracias por entender mis horarios horribles y recibirme en casa con tanto amor y cenas tan ricas. Gracias por tu compañía, por hacerme tan feliz cada día e iluminar mi vida. Gracias por quererme tanto, y sobre todo, por quererme tan bien.

En definitiva, gracias a todos por formar o haber formado parte de este camino. Os quiero.

## *Resumen / Summary*

---

La mitocondria es un orgánulo clave en la ejecución de numerosas funciones celulares, destacando entre ellas la síntesis de energía química en forma de ATP por el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Alteraciones funcionales de este sistema provocan las denominadas patologías mitocondriales OXPHOS. La mitocondria posee su propio genoma (ADNmt), que en mamíferos codifica tan solo 13 proteínas de las aproximadamente 1500 que conforman el proteoma mitocondrial, el resto están codificadas en el ADNn. En la actualidad, existe un número importante tanto de proteínas mitocondriales no caracterizadas como de patologías mitocondriales en las que se desconoce el gen afectado. Ello dificulta enormemente el diagnóstico genético de pacientes y la comprensión del mecanismo molecular de muchas patologías mitocondriales.

Estudios previos en nuestro laboratorio revelaron que genes esenciales para la función OXPHOS y altamente conservados (*mt-Tfb1*, *GatC*, *Poly-β* y *Coa3*) están codificados sobre ARNm bicistrónicos en *Drosophila*, sugiriendo lo que podía ser una tendencia en la organización de genes mitocondriales de este organismo. Por tanto, su rastreo podría utilizarse como herramienta para identificar genes mitocondriales evolutivamente conservados no descritos.

El trabajo de esta Tesis Doctoral refuerza la observación anterior identificando un nuevo gen implicado en la función OXPHOS no descrito previamente y describe una enfermedad humana provocada por una mutación en el ortólogo de un gen codificado en un bicistrón en *Drosophila*. Así, hemos caracterizado la primera mutación patogénica en la subunidad GatC de la enzima heterotrimérica glutamil-ARNt<sup>Gln</sup>-mt amidotransferasa (GatCAB) en un paciente con cardiomiopatía y acidosis láctica. GatCAB participa en la síntesis del Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt como respuesta a la ausencia de una glutaminil-ARNt-mt sintetasa (QARS2). Los fibroblastos derivados del paciente mostraron que una reducción en los niveles de GATC provoca una caída del resto de proteínas que conforman la enzima, GATA y GATB. Además, confirmamos que la disminución de estas subunidades provoca un grave defecto en la traducción de las proteínas codificadas en el ADNmt, corroborando la funcionalidad de la vía de transamidación en la mitocondria humana.

Por otro lado, el rastreo de genes candidatos a participar en la función OXPHOS mediante el análisis de los ARNm bicistrónicos de *Drosophila* nos ha permitido identificar y caracterizar parcialmente la proteína C6orf203, una proteína localizada en la matriz mitocondrial de 19 kDa. Su caracterización funcional mediante el uso del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 nos ha permitido concluir que participa en el proceso de traducción mitocondrial, formando parte de complejos macromoleculares de más de 1000 kDa.

En conclusión, en este trabajo hemos avanzado tanto en la caracterización de un gen asociado por primera vez a patología mitocondrial humana como en la identificación y caracterización de una nueva proteína mitocondrial implicada en la función OXPHOS.

Mitochondria are essential organelles for numerous cellular processes, highlighting their role in the production of energy supply in the form of ATP in a process known as oxidative phosphorylation (OXPHOS). The OXPHOS system deficiencies lead to mitochondrial diseases. Mitochondria possess their own genome (mtDNA) which in mammals encodes only 13 proteins, the remaining ~1500 proteins that comprise the mammalian proteome are encoded by nDNA. At present, there are both a significant number of uncharacterized mitochondrial proteins and mitochondrial diseases in which the affected gene is unknown, making it difficult to diagnose patients and to comprehend these disease mechanisms.

Our previous studies revealed that highly conserved essential genes for the OXPHOS function (*mt-Tfb1*, *GatC*, *Poly-β* and *Coa3*) are encoded by bicistronic mRNAs in *Drosophila*, suggesting a tendency for mitochondrial genes to be organized in these particular mRNAs in this organism. Thereby, it could be employed as a tool for identifying evolutionary conserved non-described genes.

This thesis reinforces the previous observation, identifying a new and previously undescribed gene involved in OXPHOS function, as well as describes a novel mutation in a human orthologue of a gene encoded by a bicistronic mRNA in *Drosophila*. Thus, we characterized the first pathogenic mutation in the GatC subunit of the heterotrimeric enzyme glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase (GatCAB) in a patient presented with severe cardiomyopathy and lactic acidosis. GatCAB participates in the synthesis of Gln-tRNA<sup>Gln</sup> in response to the absence of a mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase (QARS2). Patient-derived fibroblasts showed that a reduction in the steady-state levels of GATC leads to a decrease in the rest of the subunits that constitute the enzyme, GATA and GATB. We also demonstrate that a reduction of these subunits causes a severe mitochondrial protein translation system defect, corroborating the functional role of the transamidation route in human mitochondria.

On the other hand, the analysis of candidate genes to participate in the OXPHOS function encoded in bicistronic mRNAs in *Drosophila*, allowed us to identify and partially characterized C6orf203, a 19 kDa protein localized in the mitochondrial matrix. Its functional characterization using the genomic editing CRISPR/Cas9 system allowed us to conclude that C6orf203 participates in the mitochondrial translation system and forms high-molecular-weight complexes above 1000 kDa.

In conclusion, during this study we have made progress both in the characterization of a gene linked, for the first time, to human mitochondrial pathology and in the identification and characterization of a novel protein involved in the mitochondrial OXPHOS function.

## *Índice*

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	27
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	33
1. La mitocondria.....	35
1.1. Estructura, morfología y dinámica mitocondrial.....	35
1.2. Funciones de la mitocondria.....	36
1.2.1. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....	36
2. Estructura y metabolismo del genoma mitocondrial.....	38
2.1. Estructura del ADN mitocondrial.....	38
2.2. Expresión del genoma mitocondrial.....	40
2.2.1. Replicación del ADNmt.....	40
2.2.2. Transcripción del ADNmt.....	41
2.2.3. Traducción del ADNmt.....	43
3. Patología mitocondrial OXPHOS.....	46
3.1. Mutaciones en el ADN mitocondrial.....	47
3.2. Mutaciones en el ADN nuclear.....	47
3.2.1. Patología mitocondrial derivada de defectos en la maquinaria de traducción.....	48
4. Identificación de genes no descritos implicados en la función OXPHOS.....	49
4.1. Utilización del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.....	51
4.2. Utilización de <i>Drosophila melanogaster</i> como herramienta para la identificación de nuevos genes mitocondriales.....	53
<b>OBJETIVOS</b> .....	55
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	59
1. Materiales.....	61
1.1. Reactivos, soluciones y tampones.....	61
1.2. Radioisótopos.....	61
1.3. Líneas celulares.....	61
1.4. Cepas Bacterianas.....	61
1.5. Vectores.....	62
1.6. Oligonucleótidos.....	62
1.6.1. Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico mutacional del gen <i>GATC</i> .....	63
1.6.2. Oligonucleótidos utilizados para analizar los niveles de los ARNm de <i>QRSL1</i> , <i>GATB</i> y <i>GATC</i> mediante qRT-PCR.....	63

1.6.3. Oligonucleótidos utilizados en la cuantificación del ADNmt mediante PCR cuantitativa.....	63
1.6.4. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en pIRESpuro2.....	64
1.6.5. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en pEGFP-N1 .....	64
1.6.6. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en MCS-BioID2-HA.....	64
1.6.7. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y analizar la región editada de <i>C6orf203</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	64
1.6.8. Oligonucleótidos utilizados para analizar los pseudogenes de <i>C6orf203</i> localizados en el cromosoma 6 (Cr6) y cromosoma 21 (Cr21) .....	64
1.6.9. Oligonucleótidos utilizados para la generación de los ARN guía.....	65
1.6.10. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de C6orf203 en pacientes con patología mitocondrial.....	65
1.6.11. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las diferentes construcciones .....	65
1.7. Anticuerpos .....	66
1.7.1. Anticuerpos primarios contra proteínas humanas .....	66
1.7.2. Anticuerpos secundarios.....	66
2. Métodos .....	67
2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	67
2.2. Clonajes.....	67
2.2.1. Síntesis de ADNc a partir de ARNm (Retrotranscripción).....	67
2.2.2. Amplificación de los fragmentos, digestión y ligación .....	67
2.2.3. Transformación bacteriana y purificación de ADN plasmídico .....	68
2.2.4. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias .....	68
2.3. Purificación de ácidos nucleicos .....	68
2.3.1. Purificación de ADN genómico a partir de cultivo celular .....	68
2.3.2. Purificación de ARN celular.....	68
2.4. Detección de ácidos nucleicos.....	69
2.4.1. <i>Northern blot</i> .....	69
2.4.1.1. <i>Cuantificación de los ARNm-mt</i> .....	69
2.4.1.2. <i>Análisis de la aminoacilación del ARN<sup>f<sup>Sm</sup></sup>-mt</i> .....	69
2.4.2. RT-qPCR.....	70
2.5. Cultivos celulares y transfección de HEK293T.....	70
2.6. Curvas de crecimiento .....	71
2.7. Medida de consumo de oxígeno .....	71
2.7.1. Electrodo tipo Clark.....	71



2.7.2. Respirimetría de alta resolución .....	72
2.8. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial .....	72
2.9. Cuantificación de los niveles de ADNmt.....	73
2.10. Medida de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria.....	73
2.11. Medida de la actividad citrato sintasa.....	75
2.12. Inmunofluorescencia.....	75
2.13. Análisis de proteínas.....	76
2.13.1. Purificación de mitocondrias .....	76
2.13.2. Preparación de extractos totales o mitocondriales .....	76
2.13.3. Tratamiento alcalino con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	76
2.13.4. Localización submitocondrial de proteínas mediante el tratamiento con proteinasa K..	77
2.13.5. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana ( <i>Western blot</i> ).....	77
2.14. Electroforesis nativa azul ( <i>Blue native electrophoresis, BN-PAGE</i> ).....	78
2.14.1. Geles bidimensionales .....	79
2.15. Análisis del ensamblaje de los ribosomas mitocondriales con gradiente de sacarosa.....	79
2.16. Biosíntesis de las proteínas mitocondriales <i>de novo</i> .....	79
2.17. Inmunoprecipitación de C6orf203-Flag.....	80
2.18. Identificación de biotina dependiente de la proximidad ( <i>proximity-dependent biotin identification</i> (BioID)) .....	80
2.19. <i>Complexome profiling</i> .....	81
2.20. Búsqueda <i>in silico</i> de genes candidatos para la realización del estudio.....	81
2.21. Edición genómica de <i>C6orf203</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9 .....	81
2.21.1. Diseño de los ARN guía.....	82
2.21.2. Anillamiento de los oligonucleótidos para la generación de los ARN guía .....	82
2.21.3. Clonaje de los ARN guía en el vector pX335-U6-Chimeric_BB-CBh hSpCas9n(D10A).....	82
2.21.4. Cotransfección de PX335::ARNg1 y PX335::ARNg2.....	83
2.21.5. Aislamiento de clones .....	83
2.21.6. Caracterización de la edición genómica .....	83
<b>RESULTADOS</b> .....	85
1. Estudio molecular de una mutación en el gen <i>GATC</i> en fibroblastos de un paciente portador .....	87
1.1. Antecedentes .....	87
1.2. Cuadro clínico del paciente portador de la mutación en <i>GATC</i> .....	87

1.3.	Análisis por secuenciación directa del gen <i>GATC</i> en los fibroblastos del paciente de estudio.....	88
1.4.	Medida del consumo de oxígeno.....	89
1.5.	Medida del potencial de membrana interna mitocondrial.....	90
1.6.	Medida de la producción de ATP, especies reactivas del oxígeno (ROS), lactato y actividad de los complejos de la cadena respiratoria.....	91
1.7.	Análisis de los niveles de la proteína GATC.....	91
1.8.	Análisis de los niveles estacionarios de las proteínas GATA y GATB.....	92
1.9.	Análisis de los niveles de los ARNm de <i>QRSL1</i> , <i>GATB</i> y <i>GATC</i> .....	93
1.10.	Análisis de la síntesis de las proteínas mitocondriales <i>de novo</i> .....	94
1.11.	Cuantificación de los niveles estacionarios de las proteínas OXPHOS.....	95
1.12.	Análisis de la estabilidad de las proteínas mitocondriales.....	96
1.13.	Medida del número de copias del ADNmt.....	100
1.14.	Análisis de la aminoacilación del ARNt <sup>Gln</sup> -mt.....	101
2.	Identificación de nuevos genes implicados en la función OXPHOS.....	102
2.1.	Estudio <i>in silico</i> de genes candidatos implicados en la función mitocondrial.....	102
2.2.	CG4884 de <i>Drosophila</i> es una proteína potencialmente mitocondrial.....	103
2.3.	CG4884 se encuentra conservada evolutivamente y presenta un ortólogo humano: C6orf203.....	104
2.4.	Caracterización funcional de C6orf203 en la línea celular humana HEK293T.....	107
2.4.1.	C6orf203 es una proteína localizada en la matriz mitocondrial.....	107
2.4.2.	Generación de la línea HEK293T knockout para <i>C6orf203</i> .....	110
2.4.3.	Caracterización funcional de los clones <i>C6orf203</i> KO.....	114
2.4.4.	Búsqueda de proteínas que interactúan con C6orf203.....	125
2.4.5.	Búsqueda de mutaciones en el gen <i>C6orf203</i> en pacientes con déficit combinado del sistema OXPHOS.....	130
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	131
1.	Estudio molecular en fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC.....	134
2.	Identificación de C6orf203, una proteína implicada en la función OXPHOS.....	141
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	149
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	153

## *Abreviaturas*

---

<b>1D-BN-PAGE</b>	Primera dimensión de la electroforesis nativa azul en geles de poliacrilamida ( <i>Blue Native gel electrophoresis</i> )
<b>2D-BN/SDS-PAGE</b>	Segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes de la electroforesis nativa azul
<b>Aa</b>	Aminoácido
<b>aa-ARNt</b>	ARNt aminoacilado
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADNg</b>	ADN genómico
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>ADNn</b>	ADN nuclear
<b>ARNcr</b>	ARN CRISPR
<b>ARNg</b>	ARN guía
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>ARNt</b>	ARN de transferencia
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNsi</b>	ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento
<b>ARNtracr</b>	Transactivador de ARNcr
<b>ARS</b>	Aminoacil-ARNt sintetasa
<b>ARS2</b>	Aminoacil-ARNt sintetasa mitocondrial
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BioID</b>	Identificación de biotina dependiente de la proximidad ( <i>proximity-dependent biotin identification</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>Cas9</b>	Proteína 9 asociada a CRISPR ( <i>CRISPR associated protein 9</i> )
<b>Cas9n</b>	Proteína 9 asociada a CRISPR <i>nickasa</i>
<b>Cf</b>	Cloranfenicol
<b>CI</b>	Complejo I o NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidorreductasa
<b>CII</b>	Complejo II o succinato:ubiquinona oxidorreductasa
<b>CIII</b>	Complejo III o ubiquinol:citocromo <i>c</i> oxidorreductasa

## Abreviaturas

---

<b>CIV</b>	Complejo IV o citocromo <i>c</i> oxidasa
<b>CV</b>	Complejo V o ATP sintasa
<b>CoQ</b>	Coenzima Q10 o ubiquinona
<b>COX</b>	Citocromo c oxidasa
<b>CR</b>	Cadena respiratoria
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas ( <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> )
<b>CS</b>	Citrato sintasa
<b>DCPIP</b>	Diclorofenol Indofenol
<b>DHODH</b>	Dihidroorotato dehidrogenasa
<b>DMEM</b>	Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
<b>DNTB</b>	Ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
<b>DSB</b>	Corte de doble cadena ( <i>Double Strand Break</i> )
<b>EARS2</b>	Glutamil-ARNt sintetasa mitocondrial
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EF</b>	Factor de elongación de la traducción
<b>EGFP</b>	Proteína fluorescente verde mejorada ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
<b>FAD+</b>	Flavín adenín dinucleótido, oxidado
<b>FADH2</b>	Flavín adenín dinucleótido, reducido
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FCCP</b>	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
<b>GatCAB</b>	Glutamil-ARNt <sup>Gln</sup> amidotransferasa
<b>Gln o Q</b>	Glutamina
<b>Glu o E</b>	Ácido glutámico
<b>HEK293T</b>	Células embrionarias de riñón humano que contienen el antígeno T grande del virus SV40
<b>HDR</b>	Reparación por recombinación homóloga ( <i>Homology Directed Repair</i> )
<b>HSP</b>	Promotor de la cadena pesada del ADNmt ( <i>Heavy Strand Promoter</i> )

<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>IRES</b>	Secuencia interna de iniciación del ribosoma ( <i>internal ribosome entry site</i> )
<b>IF</b>	Factor de iniciación de la traducción
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>LC-MS</b>	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ( <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> )
<b>LSP</b>	Promotor de la cadena ligera del ADNmt ( <i>Light Strand Promoter</i> )
<b>LSU</b>	Subunidad mayor del ribosoma mitocondrial
<b>MEM</b>	Membrana externa mitocondrial
<b>NHDF</b>	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
<b>MIM</b>	Membrana interna mitocondrial
<b>MIMP o <math>\Delta\Psi</math></b>	Potencial de membrana interna mitocondrial
<b>MRPLs</b>	Proteínas de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial
<b>MRPSs</b>	Proteínas de la subunidad menor del ribosoma mitocondrial
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
<b>NHEJ</b>	Mecanismo de unión de extremos no homólogos ( <i>non-homologous end joining</i> )
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura ( <i>open reading frame</i> )
<b>O<sub>H</sub></b>	Origen de replicación de la cadena pesada del ADNmt
<b>O<sub>L</sub></b>	Origen de replicación de la cadena ligera del ADNmt
<b>OXPHOS</b>	Fosforilación oxidativa
<b>P</b>	Sedimento o pellet
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PAM</b>	Motivo adyacente al protoespaciador ( <i>protospacer adjacent motif</i> )
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino

## Abreviaturas

---

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i> )
<b>QARS</b>	Glutaminil-ARNt sintetasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SSU</b>	Subunidad menor del ribosoma mitocondrial
<b>TBS</b>	Tampón tris salino ( <i>tris buffer saline</i> )
<b>TBS-T</b>	Tampón TBS suplementado con Tween 20
<b>TIM</b>	Translocasa de membrana interna mitocondrial ( <i>Translocase of the Inner Membrane</i> )
<b>TMRE</b>	Tetrametilrodamina etil ester perclorato
<b>TOM</b>	Translocasa de membrana mitocondrial externa ( <i>Translocase of the Outer Membrane</i> )
<b>UTR</b>	Región ni traducida ( <i>Untranslated region</i> )
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WT</b>	Fenotipo o genotipo silvestre ( <i>wild-type</i> )

# *Introducción*

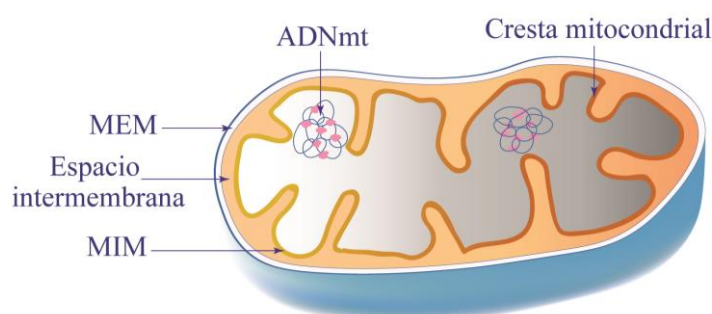
---



## 1. La mitocondria

### 1.1. Estructura, morfología y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares que poseen su propio genoma (ADNmt) y están presentes en prácticamente la totalidad de las células eucariotas. Estos orgánulos están rodeados por una doble membrana: la membrana externa mitocondrial (MEM) y la membrana interna mitocondrial (MIM), las cuales delimitan dos compartimentos claramente diferenciados: la matriz mitocondrial, situada en el interior de la MIM y el espacio intermembrana, localizado entre ambas membranas (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura mitocondrial.** MEM: membrana externa mitocondrial. MIM: membrana interna mitocondrial. OXPHOS: fosforilación oxidativa.

La MEM, que separa el orgánulo del citoplasma, es una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática que permite el paso de pequeñas moléculas e iones, mayoritariamente a través de los canales iónicos VDAC<sup>1</sup>. Esta membrana también cuenta con los sistemas de translocasas TOM, que participan en la regulación del tránsito de las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol, y TOB/SAM que facilita la inserción de las proteínas con estructura de barril beta en la MEM<sup>2,3</sup>. La MIM, por su parte, tiene una restricción mayor al paso de moléculas debido a su mayor contenido en proteínas y fosfolípidos como la cardiolipina. Por ello, se necesita la presencia de transportadores específicos, como el complejo TIM22/TIM23, que permite el transporte de las proteínas a la matriz<sup>4</sup>, así como proteínas implicadas en su correcto plegamiento y localización en la MIM como son MIA40 y OXA1<sup>3,5</sup>. Además, la MIM se encuentra plegada sobre sí misma formando unas invaginaciones hacia el interior de la matriz conocidas como crestas mitocondriales. Estas crestas incrementan muy significativamente la superficie de la MIM, generando así un aumento en su capacidad funcional, puesto que el sistema de respiración celular del que se hablará más adelante se encuentra en la MIM<sup>6</sup>. La proteína OPA1 y el complejo proteico MICOS (*mitochondrial contact site*) son cruciales en la dinámica de estas crestas<sup>7,8</sup>, cuyo número y forma depende del tipo celular al que pertenecen y de la demanda energética del tejido<sup>6</sup>.

Las mitocondrias se encuentran en constante cambio y su morfología, distribución y actividad se regulan mediante continuos eventos de fusión y fisión de las membranas mitocondriales. Los

primeros están mediados por proteínas como las mitofusinas MFN1 y MFN2 y la proteína OPA1, y los segundos están mediados por proteínas como DRP1. Gracias a esta dinámica activa las mitocondrias pueden presentarse como estructuras ovoides independientes o alargadas formando una red. La morfología mitocondrial, fragmentada o tubular, está relacionada con su capacidad metabólica, la producción de ROS y su capacidad para inducir apoptosis<sup>9</sup>, siendo la primera funcionalmente menos activa. A su vez, evidencias recientes determinan que la distribución mitocondrial dentro de las células, particularmente la distancia que tienen al núcleo, puede alterar la respuesta transcripcional de su genoma<sup>10</sup>.

Además, las mitocondrias se encuentran en contacto directo con el citoesqueleto<sup>11,12</sup> y otros orgánulos celulares, siendo muy importante el contacto de esta organela con el retículo endoplásmico para numerosos procesos celulares, como la homeostasis del calcio y la apoptosis<sup>13,14</sup>. También se ha demostrado que establece vías de comunicación con el núcleo (respuesta retrógrada) para adaptar la respuesta celular a diferentes situaciones celulares, como son la proliferación, la diferenciación y la respuesta a estrés<sup>15,16</sup>.

### 1.2. Funciones de la mitocondria

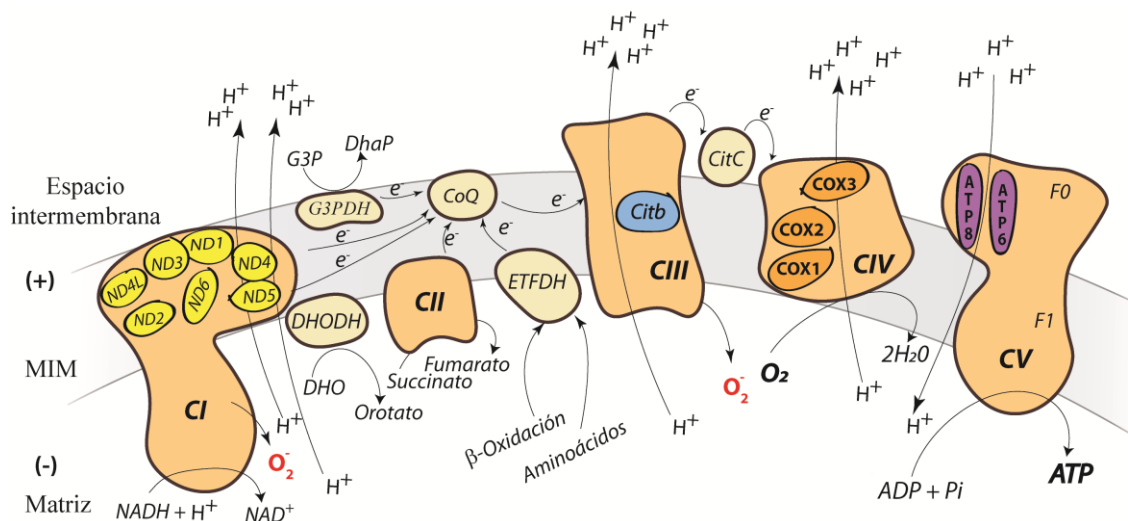
La mitocondria es un orgánulo fundamental en el metabolismo celular ya que en su interior tienen lugar numerosos procesos metabólicos esenciales, o parte de ellos, como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la síntesis del grupo hemo, fosfolípidos, pirimidinas y proteínas hierro-azufre (Fe/S)<sup>17</sup>. A su vez, este orgánulo participa en procesos tan importantes como son la muerte celular programada o apoptosis<sup>18</sup>, la homeostasis del calcio<sup>19</sup> y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*)<sup>20</sup>. Sin embargo, la generación de energía química en forma de ATP mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS, *Oxidative Phosphorylation*) ha sido la función mitocondrial que ha destacado a lo largo de los años desde su descubrimiento en los años 20 por Keilin y Warburg<sup>21</sup>, ya que esta energía se requiere para la inmensa mayoría de los procesos fisiológicos de la célula.

#### 1.2.1. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

La mayor parte del ATP celular es producido en la mitocondria por el sistema OXPHOS, el cual se localiza en la MIM. Este sistema está constituido por el complejo ATP sintasa (complejo V, CV) junto con la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria (CR), la cual está compuesta por cuatro complejos enzimáticos multiheteroméricos: la NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I, CI), la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II, CII), la ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (complejo III, CIII) y la citocromo c oxidasa (complejo IV,

CIV). Además participan dos transportadores de electrones adicionales, la ubiquinona (coenzima Q, CoQ) y el citocromo c (Citc), ambos localizados también en la MIM.

Tras el catabolismo de los ácidos grasos y carbohidratos, su energía se almacena en los cofactores reducidos  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$ , los cuales ceden sus electrones al CI y al CII de la CR respectivamente. A continuación, estos electrones se transfieren a la CoQ que, una vez reducida a ubiquinol ( $\text{CoQH}_2$ ), los transfiere al complejo III y éste al citocromo c. Finalmente, se produce la reducción del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) gracias a la oxidación del citocromo c a través del complejo IV<sup>22, 23</sup>. La CoQ es reducida también tanto por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, implicada en el metabolismo de lípidos<sup>24</sup>, como por la proteína ETFD (electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase), que transfiere electrones procedentes de la  $\beta$ -oxidación y del catabolismo de aminoácidos<sup>25</sup>. La CoQ además recibe electrones de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), proteína esencial en la síntesis de pirimidinas *de novo*<sup>24</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Esquema del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).** En naranja los complejos clásicos del sistema OXPHOS (CI-CIV, junto con la ATP sintasa o CV). En su interior se destacan las subunidades codificadas por el ADNmt con el mismo código de colores que la Figura 3. Los cofactores reducidos  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$ , provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones ( $e^-$ ) a los complejos I y II respectivamente. Los electrones fluyen por la cadena de transporte electrónico hasta finalmente llegar al  $\text{O}_2$  y formar  $\text{H}_2\text{O}$ . El gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) generado es utilizado por el complejo V, ATP sintasa, para la síntesis de ATP. **DHODH**: Dihidroorotato deshidrogenasa. **DHO**: dihidroorotato. **ETFDH**: *electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase*. **CoQ**: Ubiquinona. **CitC**: citocromo C. **G3PDH**: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. **G3P**: glicerol-3-fosfato. **DhaP**: dihidroxiacetona fosfato.

El flujo de electrones a través de la CR está acoplado a un bombeo de protones ( $\text{H}^+$ ) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV. Dicho bombeo genera un gradiente electroquímico a ambos lados de la MIM<sup>26</sup> (MIMP o  $\Psi_m$ , potencial de membrana interna mitocondrial). La energía acumulada en este gradiente es utilizada finalmente por la ATP sintasa para generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) acoplado al paso de los protones hacia la matriz mitocondrial. Esta reacción es reversible y, en situaciones de

despolarización mitocondrial, la ATP sintasa puede mantener el gradiente de  $H^+$  a expensas de la hidrólisis de ATP<sup>27</sup>. El ATP sintetizado por el sistema OXPHOS se intercambia por ADP citosólico a través del transportador de nucleótidos de adenina (ANT, *adenine nucleotide translocator*) localizado también en la MIM.

El sistema OXPHOS lleva asociado la formación de ROS, que se producen por un desvío prematuro de electrones al oxígeno desde los complejos I y III<sup>28,29</sup>. Este grupo de moléculas derivadas del oxígeno (anión superóxido,  $O_2^-$ , y su derivado peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ ) pueden oxidar otras moléculas, siendo tóxicas para la célula en elevadas concentraciones. Generalmente, una disfunción en la CR está asociada con un aumento en los ROS mitocondriales, aunque en condiciones fisiológicas son importantes moléculas señalizadoras implicadas en una gran variedad de respuestas celulares<sup>30</sup>.

Cada vez son más las evidencias que sugieren que los complejos de la cadena respiratoria se organizan siguiendo el denominado “modelo de plasticidad”. De acuerdo a este modelo, los complejos se encuentran en equilibrio dinámico, pasando de estructuras individuales a asociarse en forma de supercomplejos o respirasomas<sup>31,32</sup>, habiéndose demostrado que estas estructuras tienen un papel fisiológico *in vivo*<sup>33</sup>. La formación de los supercomplejos presentarían la ventaja de transmitir los electrones más eficazmente, limitando así la producción de ROS<sup>34</sup>. Asimismo, se ha propuesto que podría conferir estabilidad al complejo I<sup>35</sup> además de mediar en la adaptación metabólica celular<sup>33</sup>.

Se han descrito diferentes combinaciones de supercomplejos en mamíferos, I+III<sub>2</sub>, I+IV, III<sub>2</sub>-IV<sub>1,2</sub>, I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1,4</sub><sup>36-41</sup>, y, aunque la asociación del complejo II a otros complejos de la CR también se ha propuesto<sup>32,42</sup>, existe mayoritariamente de forma libre<sup>31,35</sup>. Por su parte, el complejo V no se ha encontrado formando parte de los supercomplejos pero forma homodímeros que facilitan el plegamiento de la MIM y la formación de las crestas mitocondriales<sup>43,44</sup>.

El sistema OXPHOS, además, es único, en el sentido de que es uno de los pocos procesos en células eucariotas que requiere de componentes codificados en dos genomas diferentes: el ADN mitocondrial y el ADN nuclear.

## 2. Estructura y metabolismo del genoma mitocondrial

### 2.1. Estructura del ADN mitocondrial

De acuerdo a la teoría endosimbionte, las mitocondrias se originaron a partir de  $\alpha$ -proteobacterias que fueron incorporadas a una célula eucariota ancestral y que han ido evolucionando como endosimbiontes a lo largo de miles de millones de años<sup>45</sup>. Las mitocondrias mantienen ciertas características de su ancestro bacteriano, como es el hecho de poseer su propio

material genético o ADN mitocondrial (ADNm<sub>t</sub>), descrito por primera vez en células de embrión de pollo en los años 60<sup>46</sup>.

El ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> varía considerablemente entre los diferentes organismos, tanto en su tamaño (de las 6 kilobases que presenta el parásito humano *Plasmodium falciparum* hasta las cerca de 400 kilobases en la planta *Arabidopsis thaliana*), como en su forma (lineal o circular), como en su contenido génico<sup>47</sup>. En este apartado se describirá la organización del ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> humano.

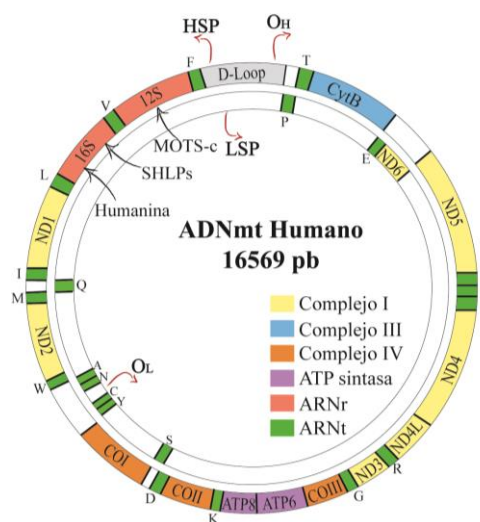
El genoma mitocondrial humano es una pequeña molécula de ADN circular bicatenario de 16569 pares de bases<sup>48,49</sup>. Las dos hebras de ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> difieren en la composición de sus bases, siendo una de ellas más rica en guaninas, lo que genera diferente movilidad en gradientes desnaturizantes de cloruro de cesio<sup>50</sup>, por lo que reciben el nombre de cadena pesada (H, *heavy*) y cadena ligera (L, *light*).

El ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> humano contiene únicamente 37 genes, encontrándose la mayor parte de ellos, 28, en la cadena pesada. Estos genes codifican 13 subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS, de un total de aproximadamente 90.

Ninguna de ellas pertenece al complejo II, siete pertenecen al complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), una al complejo III (Citocromo b), tres al complejo IV (COX1, COX2 y COX3) y dos al complejo V (ATP6 y ATP8). El resto de las proteínas que constituyen el sistema OXPHOS son traducidas en los ribosomas citosólicos e importadas a la mitocondria donde se ensamblan para formar los distintos complejos<sup>51</sup>.

El ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> también codifica dos ARN ribosómicos (12S y 16S ARN<sub>r</sub>-mt) y veintidós ARN de transferencia (ARN<sub>t</sub>-mt) necesarios para el correcto funcionamiento del sistema de traducción mitocondrial<sup>52</sup>. Más allá de estos genes clásicos, en los últimos años se han descrito pequeñas pautas abiertas de lectura (ORFs, *open reading frames*) en el ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> que codifican polipéptidos con funciones señalizadoras, como son: la humanina<sup>53</sup>, MOTS-c (*mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA -c*)<sup>54</sup> y SHLPs (*small humanin-like peptide*)<sup>55</sup> (Figura 3).

La estructura del ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> es extraordinariamente compacta, de tal manera que los genes no poseen intrones ni regiones 5' o 3' no traducidas (UTRs, *untranslated regions*). Además, no hay apenas espacios intergénicos, produciéndose incluso un solapamiento entre los genes ND4L/ND4 y



**Figura 3. Representación esquemática del ADN<sub>m<sub>t</sub></sub> humano.** Las circunferencias externa e interna representan la cadena pesada y ligera respectivamente. Los 37 genes codificantes están representados con diferentes colores según indica la leyenda. D-Loop en gris. Se indica el origen de replicación y la dirección de síntesis de la cadena pesada (O<sub>H</sub>) y de la cadena ligera (O<sub>L</sub>), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción (HSP y LSP).

ATP8/ATP6. La mayor región no codificante de este genoma, de alrededor de 1Kb, se denomina región de control o *D-Loop*, donde se sitúan los promotores de la transcripción de cada hebra del ADNmt: el promotor de la cadena ligera (LSP) y el promotor de la cadena pesada (HSP). También en esta región se localiza el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ) y secuencias reguladoras que intervienen en la replicación. Otra región no codificante de este genoma es el origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) de apenas 30 nucleótidos<sup>52</sup> (Figura 3).

Las moléculas de ADNmt se organizan formando unas estructuras denominadas nucleoides, que en la actualidad se estima que contienen entre 1 y 2 copias de ADNmt<sup>56</sup>. Los nucleoides también poseen una serie de proteínas, algunas encargadas de su mantenimiento y empaquetamiento, como es el caso de TFAM, que es la proteína mayoritaria en los mismos y se encuentra recubriendo las moléculas de ADNmt en un ratio de 1 subunidad por cada 16-17 pares de bases<sup>57</sup>. Se piensa que los nucleoides se encuentran unidos a la membrana mitocondrial interna, lo que facilitaría su organización, distribución y segregación<sup>58, 59</sup>.

La genética mitocondrial presenta una serie de características que la distinguen de la genética nuclear. El genoma mitocondrial es poliploide, variando el número de copias de cientos a miles por célula, pudiéndose dar dos situaciones: aquella en la que todas las moléculas son idénticas (homoplasmia) o aquella en la que coexisten dos o más genotipos diferentes (heteroplasmia)<sup>60</sup>. Otra característica del genoma mitocondrial es que las moléculas de ADNmt se replican de manera independiente al ciclo celular. Además, se reparten al azar en las células hijas durante la mitosis, fenómeno conocido como segregación mitótica. Por último, cabe destacar que esta molécula se hereda exclusivamente por vía materna, ya que las mitocondrias procedentes del espermatozoide que penetran en el oocito son eliminadas mediante ubiquitinación y posterior proteólisis<sup>61</sup>, aunque se ha descrito un caso esporádico de herencia paterna parcial en el que se detectaron moléculas de ADNmt del espermatozoide en el tejido muscular de un individuo<sup>62</sup>.

### 2.2. Expresión del genoma mitocondrial

La expresión del ADNmt requiere de una serie de procesos vinculados entre sí, que abarcan la reparación del ADNmt, su replicación, transcripción y maduración de los ARNmt para que, aquellos codificantes de proteínas, finalmente sean traducidos en los ribosomas mitocondriales y sus productos se ensamblen para formar los complejos del sistema OXPHOS.

#### 2.2.1. Replicación del ADNmt

El ADNmt es sintetizado por la ADN polimerasa  $\gamma$  ( $POL\gamma$ ) que en mamíferos es un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica ( $POL\gamma A$ ) de 140 kDa codificada por el gen *POLG* y dos subunidades accesorias de 55 kDa ( $POL\gamma B$ ) codificadas por el gen *POLG2*, que

aumentan tanto la capacidad catalítica como la procesividad de POL $\gamma$ A<sup>52, 63</sup>. La subunidad catalítica presenta actividad 5'→3' ADN polimerasa y actividad correctora 3'→5' exonucleasa. Además, presenta una actividad 5'-deoxirribosa fosfato liasa, que contribuye a la reparación del ADN por escisión de bases<sup>64</sup>. Es importante destacar que cada vez son más las evidencias que sugieren la existencia de más ADN polimerasas mitocondriales que podrían estar implicadas tanto en el mecanismo de replicación como en los de reparación, aunque todavía se desconoce la función exacta de cada una de ellas<sup>65</sup>. Tal es el caso de PrimPol, que tiene actividad ADN polimerasa/primasa *in vitro* y se localiza tanto en núcleo como en mitocondria y, aunque *in vivo* no es esencial para el mantenimiento del ADNmt ya que ratones que carecen del gen *PrimPol* son viables, podría estar desempeñando una función más especializada, como la de facilitar la progresión de la horquilla de replicación del ADNmt en lesiones o en situaciones de bloqueo de la misma<sup>66, 67</sup>.

En la maquinaria basal de replicación mitocondrial también se encuentran la 5'→3' ADNmt helicasa (TWINKLE) y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSBmt)<sup>68</sup>. La primera es la encargada de la ruptura de enlaces de hidrógeno de las dos cadenas de ADNmt, permitiendo la acción de POL $\gamma$ ; mientras que la segunda estabiliza y protege las hebras sencillas de ADN, estimula la actividad de la helicasa mitocondrial TWINKLE<sup>69</sup> y aumenta la procesividad de POL $\gamma$ <sup>70</sup>.

### 2.2.2. Transcripción del ADNmt

La maquinaria basal de transcripción mitocondrial está compuesta por una única ARN polimerasa monomérica (POLRMT). Para que ésta inicie la transcripción desde los promotores HSP o LSP, requiere de la presencia del factor de transcripción B2 (TFB2M) y del factor de transcripción A (TFAM), que como ya se ha comentado anteriormente es una de las proteínas mitocondriales más abundantes y esencial en la estructura de los nucleoides<sup>52</sup>. El factor de elongación de la transcripción (TEFM), parece actuar como una subunidad accesoria de POLRMT que aumenta su procesividad<sup>71</sup>.

La transcripción del ADNmt desde los promotores HSP y LSP genera dos transcritos policistrónicos que representan casi la totalidad del genoma mitocondrial y que son procesados por cortes endonucleotídicos precisos en los ARNt-mt. De acuerdo a este modelo denominado “modelo de puntuación por ARNt”, éstos estarían actuando como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento. La ARNasaP mitocondrial formada por tres subunidades (MRPP1-3) y ELAC2, se han descrito como las encargadas de actuar sobre el extremo 5' y 3' de cada ARNt-mt respectivamente<sup>72</sup>. En las regiones donde no existe ARNt entre las ORFs, debe haber un mecanismo de procesamiento independiente de ARNt que, aunque se desconoce, evidencias

recientes implican a FASTK, FASTKD5 y GRSF1 como factores que intervienen en este proceso<sup>73-75</sup>.

### 2.2.2.1. *Procesamiento y modificación de los ARN mitocondriales: importancia de los gránulos de ARN*

De un modo similar a lo que se observa en el citoplasma, los factores encargados de los procesos de maduración de los ARNmt en mamíferos se concentran junto con los transcritos recién sintetizados en unas estructuras dinámicas nucleoproteicas no rodeadas por membranas y localizadas muy cerca de los nucleoides: los gránulos de ARN mitocondriales<sup>73, 76</sup>. El interés por conocer el proteoma de los gránulos de ARN ha dado lugar a la identificación de proteínas implicadas en el metabolismo postranscripcional de los ARNmt. Entre ellas destaca GRSF1, proteína que interacciona con el complejo ARNasaP-mt y cuya ausencia produce un defecto en el procesamiento de los ARNmt y en la traducción mitocondrial<sup>73, 76</sup>. También se han identificado proteínas como FASTK, FASTKD2 y FASTKD5<sup>74, 75</sup>.

Asimismo, en los gránulos de ARN mitocondriales se llevan a cabo las últimas modificaciones postranscripcionales de los nucleótidos de los ARNr-mt y ARNt-mt. Se ha observado que el ARNr 12S es metilado gracias a la acción de proteínas como TFB1M<sup>77</sup> y NSUN4<sup>78</sup> y que las 2'-O-ribosa metiltransferasas MRM1, MRM2 y MRM3 metilan el ARNr 16S<sup>79, 80</sup>. Recientemente también se ha caracterizado RPUSD4, responsable de la pseudouridilación del ARNr 16S<sup>81</sup> y localizada en los gránulos de ARN mitocondriales.

En estas regiones de la matriz mitocondrial es donde tiene lugar también la poliadenilación de los ARNm-mt que, salvo ND6 que no sufre esta modificación, es importante para la estabilidad de los mismos<sup>82</sup>.

Igualmente, en estas regiones se han observado muchos factores necesarios para la biogénesis de los ribosomas mitocondriales, de los que se hablará en el próximo apartado. Se ha descrito que los primeros pasos en el ensamblaje de los mitorribosomas tienen lugar cotranscripcionalmente, de tal manera que la incorporación y ensamblaje de las proteínas del ribosoma mitocondrial (MRPs, *mitochondrial ribosomal proteins*) ocurre simultáneamente a las modificaciones postranscripcionales de los ARNr-mt<sup>83, 84</sup>.

Los gránulos de ARN, por tanto, tendrían un papel fundamental en la organización y regulación de la expresión génica mitocondrial ya que estarían proporcionando un control espacio-temporal del procesamiento de los ARN, su maduración, el ensamblaje de los ribosomas y el inicio de la traducción.



### 2.2.3. Traducción del ADNmt

Uno de los mayores inconvenientes a la hora de analizar el mecanismo de la síntesis de proteínas mitocondriales es la ausencia de sistemas de traducción mitocondrial *in vitro* del mismo modo que se ha podido realizar con los sistemas bacterianos<sup>85</sup> y citosólicos<sup>86</sup>. Por este motivo, son aún poco conocidos algunos de los factores o mecanismos que participan en la traducción mitocondrial<sup>87</sup>.

A pesar de que este sistema conserva cierta similitud con el procariota debido a su origen común, el sistema mitocondrial de síntesis de proteínas posee características que difieren tanto del sistema bacteriano como del presente en el citoplasma de células eucariotas. En primer lugar, el genoma mitocondrial posee un código genético propio, distinto al universal. Además, los ARNm-mt no poseen regiones 5' UTR que sirvan de sitio de reconocimiento y entrada de la maquinaria de traducción<sup>88</sup>, ni tampoco poseen la estructura "CAP" 7-metilguanosina en el extremo 5'<sup>89</sup>, esencial para la traducción citoplasmática.

El principal componente de la maquinaria de traducción mitocondrial son los mitorribosomas que, junto con los componentes de la CR, son los únicos elementos celulares constituidos por subunidades codificadas tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. Los mitorribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 55S y están constituidos por una subunidad mayor (LSU) (39S) y una subunidad menor (SSU) (28S). Estas subunidades contienen el ARNr 16S y ARNr 12S respectivamente, y no poseen el ARNr 5S presente en la subunidad mayor de los ribosomas procariotas y citosólicos. El resto de las aproximadamente 80 proteínas que componen los ribosomas mitocondriales (MRPs) están codificadas en genes nucleares, así como el resto de proteínas accesorias necesarias para su biogénesis. Estudios recientes han confirmado que el ARNt<sup>Val</sup>-mt, codificado entre los ARNr-mt (Figura 3), se encuentra formando parte de la estructura de la subunidad mayor de los mitorribosomas humanos<sup>90</sup> en una posición similar a la que ocupa el ARNr 5S en los ribosomas citoplasmáticos y, aunque la función exacta que desempeña en los mismos aún no se ha determinado, se piensa que podría participar en dotar de la plasticidad estructural necesaria en el ribosoma durante la traducción<sup>90</sup>.

La maquinaria de traducción mitocondrial está constituida también por los ARNt codificados en el ADNmt, así como por factores de traducción y aminoacil-ARNt sintetetas que, por el contrario, están todos ellos codificados en el ADNn.

Los mitorribosomas ensamblados traducen los ARNm-mt, sintetizando así las 13 proteínas mitocondriales que se ensamblan para formar los complejos que constituyen el sistema OXPHOS gracias a la participación de los factores de ensamblaje correspondientes. Estas proteínas, altamente hidrofóbicas, se van insertando en la MIM a medida que se van traduciendo para reducir la probabilidad de que pierdan la estructura adecuada y se agreguen en la matriz mitocondrial. Para

facilitar el proceso, los mitorribosomas interactúan de manera directa con la MIM, lo cual se ha corroborado mediante criomicroscopía electrónica en levaduras<sup>91</sup>. Existen evidencias que sugieren que la proteína que media esta unión entre los ribosomas mitocondriales y la MIM es MRPL45, aunque OXA1L y MPV17L2 también podrían participar en ello<sup>92</sup>.

De manera similar a lo que ocurre en bacterias y en el citoplasma de las células eucariotas, la traducción mitocondrial en mamíferos es un proceso de múltiples etapas en las que intervienen: dos factores de iniciación de la traducción, IF2-mt y IF3-mt; tres factores de elongación, EFTu-mt, EFTs-mt y EFG1; un factor de terminación RF1a-mt y dos factores de reciclaje del ribosoma, RRF1-mt y EFG2<sup>93</sup>.

En la actualidad sigue habiendo un gran debate en cuanto a la terminación de este proceso, ya que también se han descrito otros tres factores de terminación homólogos a RF1a-mt: RF1, ICT1 y C12orf65. Se ha demostrado que RF1a-mt es el responsable de terminar la traducción en 11 ARNm-mt que tienen como codones de parada UAA y UAG, pero existe controversia en cómo finaliza la traducción de COX1 y ND6. Tradicionalmente, se ha considerado que estos dos ARNm-mt poseen como codones de parada los “codones no estándar” AGA y AGG<sup>48</sup>, y se ha propuesto en determinados estudios que los citados factores de terminación homólogos a RF1a-mt podrían ejercer su función en este caso<sup>94</sup>. Sin embargo, en el año 2010 Temperley y colaboradores demostraron que, al contrario de lo que se creía, en COX1 y ND6 se produce un cambio en la pauta de lectura del ribosoma (*-1 frameshift*), de tal manera que el codón de parada de ambos pasaría a ser UGA y, por tanto, la finalización de la traducción de todos los transcritos mitocondriales estaría mediada por RF1a-mt<sup>95</sup>. Este mecanismo es solo plausible en humanos ya que en la mayoría de vertebrados el cambio en la pauta de lectura por parte del mitorribosoma no genera un codón de parada<sup>93</sup> lo que indica que deben existir otros factores de terminación aún sin identificar. Tras conocer la estructura del ribosoma mitocondrial gracias a la criomicroscopía electrónica de alta resolución<sup>96,97</sup> se ha podido confirmar que ICT1 se encuentra formando parte de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial y diferentes estudios sugieren que podría estar ejerciendo una actividad ARNt-peptidil hidrolasa en ribosomas parados que no pueden continuar la síntesis por estar sobre ARNm-mt truncados antes del codón de parada<sup>98,99</sup>.

### 2.2.3.1. Aminoacilación de los ARNt

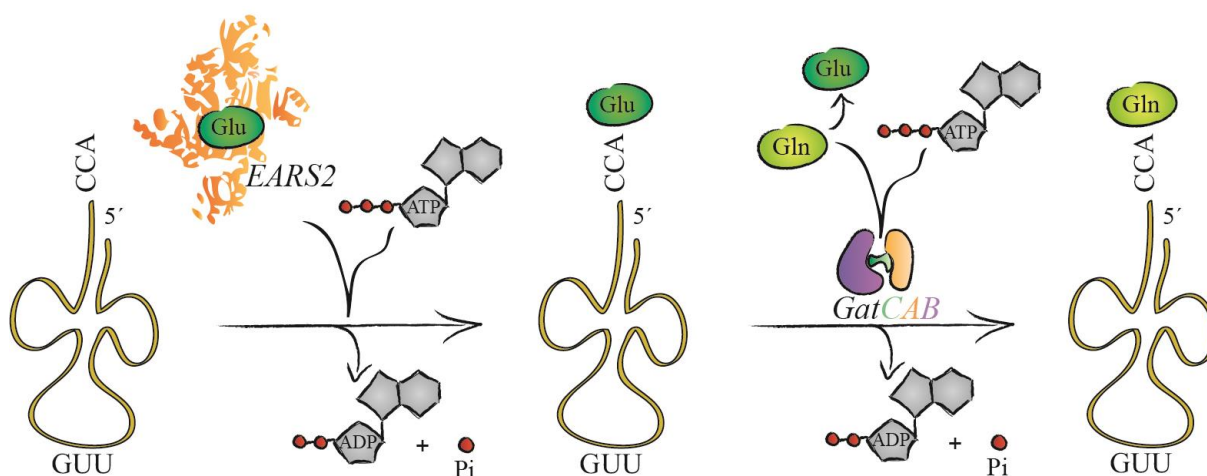
Durante el proceso de síntesis de proteínas, la unión de cada aminoácido a su ARNt correspondiente constituye un paso crítico en la fidelidad de la decodificación del mensaje genético. Este paso es catalizado por las aminoacil-ARNt sintetetas (ARS) mediante una reacción directa y dependiente de ATP. Cada ARS reconoce de manera específica todos los ARNt isoaceptores y los carga con el mismo aminoácido, formando un ARNt aminoacilado (aminoacil-ARNt o aa-ARNt)

que será el que participe en la traducción accediendo a los ribosomas<sup>100</sup>. Las ARS mitocondriales se denominan ARS2 (VARA2, RARS2, etc.).

En el citosol eucariota existe una ARS específica para cada uno de los veinte aminoácidos, sin embargo, tal y como ocurre en la mayoría de las bacterias<sup>101</sup> y en todas las arqueas conocidas<sup>102</sup>, los genomas eucariotas secuenciados hasta la fecha carecen del gen que codifica la glutaminil-ARNt sintetasa mitocondrial (*QARS2*)<sup>103</sup>. Este hecho apoya la observación de que extractos mitocondriales de hígado de ratón no tienen actividad *QARS2*<sup>104</sup>. Las ARS mitocondriales son codificadas por genes nucleares específicos<sup>105</sup>, salvo la lisil-ARNt sintetasa (KARS) y la glicil-ARNt sintetasa (GARS) que están codificadas cada una en un solo gen que da lugar a una isoforma citosólica y otra mitocondrial, bien por *splicing* alternativo (KARS)<sup>106</sup> o bien por un inicio de la traducción alternativo (GARS)<sup>107</sup>.

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que en mitocondrias de mamíferos, del mismo modo que ocurre en bacterias y arqueas, la falta de *QARS2* es compensada por un mecanismo alternativo. Así, la glutamil-ARNt sintetasa mitocondrial (*EARS2*) reconoce tanto el ARNt<sup>Glu</sup>-mt como el ARNt<sup>Gln</sup>-mt, aminoacilando ambos y generando Glu-ARNt<sup>Glu</sup>-mt y Glu-ARNt<sup>Gln</sup>-mt. Seguidamente, un complejo multiproteico denominado glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa (GAT), convierte el Glu-ARNt<sup>Gln</sup> en Gln-ARNt<sup>Gln</sup> utilizando el grupo amida procedente de la glutamina libre mediante una reacción de transamidación dependiente de ATP (Figura 4). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que esta vía es esencial para la biosíntesis de proteínas mitocondriales *in vivo* en mamíferos<sup>108</sup>.

La GAT que ejerce su función en mitocondrias humanas, al igual que en la mayoría de bacterias, es la enzima heterotrimérica GatCAB, constituida por tres proteínas: GATA, GATB y GATC, codificadas por los genes *QRSL1*, *GATB* y *GATC* respectivamente.



**Figura 4. Vía de transamidación mediada por GatCAB.** La falta de *QARS2* es compensada en dos pasos. Primero *EARS2* carga con ácido glutámico (Glu) el ARNt<sup>Gln</sup>. A continuación, Glu es amidado por la enzima glutamil-ARNt amidotransferasa (GatCAB), en presencia de ATP y un grupo amida procedente de la glutamina libre.

GatCAB cataliza tres reacciones secuenciales. 1) En primer lugar, el grupo carboxilo del ácido glutámico cargado en el Glu-ARNt<sup>Gln</sup>-mt se fosforila en una reacción dependiente de ATP, formando un intermediario activado. Esta reacción es llevada a cabo por GATB, que pertenece a una familia de proteínas con actividad quinasa ARNt-dependiente. 2) En segundo lugar, la subunidad glutaminasa de esta enzima, GATA, libera amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) procedente de la glutamina libre. 3) Finalmente, GatCAB amida el intermediario activado utilizando el amonio liberado por la subunidad glutaminasa para formar el Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt correctamente aminoacilado<sup>109</sup>. GATC, es una proteína pequeña de aproximadamente 100 aminoácidos que estaría interaccionando con el dímero GatAB proporcionando la estructura correcta del enzima<sup>110</sup>.

### 3. Patología mitocondrial OXPHOS

El término enfermedad mitocondrial OXPHOS se utiliza para denominar a un grupo de enfermedades genéticas que se caracterizan por presentar una disfunción del sistema OXPHOS. Esta disfunción puede asociarse a mutaciones en las proteínas implicadas en su formación, mantenimiento o funcionamiento del mismo, que dificulten la generación de la energía necesaria para satisfacer las necesidades de los diferentes tejidos.

Debido al amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es de extrañar que una disfunción en estos orgánulos pueda causar enfermedades multisistémicas, de naturaleza muy heterogénea y con cuadros clínicos muy variados. Sin embargo, son los tejidos y órganos de mayor demanda energética, como músculo esquelético, cerebro y corazón, los principalmente afectados. La heterogeneidad de estas enfermedades se ve reflejada tanto a nivel genético como a nivel clínico, pudiendo distintas mutaciones dar lugar a una misma enfermedad o pudiendo una misma mutación originar distintas enfermedades e, incluso, síndromes solapantes. Todas estas características dan lugar a un amplio espectro de presentaciones clínicas, entre las que se incluyen: miopatías, cardiomiopatías, demencia, ataxia, fallo hepático, disfunción renal, ceguera o sordera. Además, estas enfermedades pueden aparecer tanto en la infancia como en la edad adulta. Todo ello hace que sea complicado establecer su epidemiología aunque en la actualidad se estima que globalmente afectan aproximadamente a 1 de cada 5000 nacimientos, convirtiéndose en los errores congénitos del metabolismo más numerosos<sup>111</sup>. Sin embargo, a título individual las patologías mitocondriales son enfermedades raras.

Por otro lado, aunque las enfermedades mitocondriales tienen una entidad propia, también se ha establecido una asociación entre disfunción mitocondrial y condiciones patológicas comunes tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, cáncer, diabetes y obesidad<sup>112-114</sup>. Asimismo, se ha observado la gran relevancia de las interacciones de la mitocondria con el retículo

endoplásmico en el desarrollo de ciertas enfermedades, como la esclerosis lateral amiotrófica o algunas de las enfermedades anteriormente citadas<sup>13, 115</sup>.

Como ya se ha comentado previamente, el sistema OXPHOS tiene un origen bigenómico. Es por ello que estas enfermedades puedan estar causadas por mutaciones tanto en el ADNmt como en el ADNn. Se estima que alrededor del 80% de las enfermedades mitocondriales desarrolladas en la edad adulta son producidas por mutaciones en el ADNmt, mientras que solo lo son en el 20-25% de las enfermedades mitocondriales desarrolladas en la infancia<sup>111</sup>.

### 3.1. Mutaciones en el ADN mitocondrial

Hasta la fecha, se han descrito más de 300 mutaciones patogénicas diferentes en los 37 genes codificados en el ADNmt (MITOMAP<sup>116</sup>), pudiéndose clasificar en cuatro tipos:

- ✓ Mutaciones puntuales en genes codificantes de subunidades estructurales del sistema OXPHOS.
- ✓ Mutaciones puntuales en genes implicados en la síntesis de proteínas (ARNt y ARNr).
- ✓ Reordenamientos del ADNmt, incluyendo deleciones e inserciones del mismo.
- ✓ Depleciones o disminución del número de copias del ADNmt.

Las mutaciones puntuales suelen ser hereditarias mientras que los reordenamientos suelen producirse durante el desarrollo<sup>117, 118</sup>.

Debido a su alto número de copias, las mutaciones en el ADNmt pueden ser homoplásmicas, cuando están presentes en todas las copias del genoma mitocondrial o, lo que sucede más frecuentemente, heteroplásmicas, cuando coexisten moléculas mutadas y no mutadas. En este caso, es importante el concepto de efecto umbral, que se define como el porcentaje mínimo de moléculas portadoras de mutación necesario para que dicha mutación conduzca a una situación de enfermedad<sup>119</sup>. También es importante destacar que el ADNmt tiene una frecuencia de mutación de 10 a 17 veces mayor que la del ADNn<sup>120</sup> y que se replica de manera continua e independiente al ciclo celular, lo que da lugar a una acumulación de mutaciones somáticas a lo largo del tiempo. Por esta razón, se detectan de manera bastante frecuente mutaciones en el ADNmt en tumores y en individuos de edades avanzadas<sup>121, 122</sup>.

### 3.2. Mutaciones en el ADN nuclear

Aunque cada vez es mayor el número de mutaciones descritas en el ADNn asociadas a patología mitocondrial OXPHOS, la gran mayoría de las aproximadamente 1500 proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial no han sido asociadas a enfermedades humanas. De hecho, hasta la fecha, solo se han descrito mutaciones patogénicas en aproximadamente 300 genes, incluyendo los 37 del genoma mitocondrial<sup>118</sup>. Recientemente se han incluido MRM2<sup>123</sup>, C1QBP<sup>124</sup>, COX5A<sup>125</sup>, FDXR<sup>126</sup>, PET117<sup>127</sup> y COA3<sup>128</sup>.

A diferencia de las mutaciones localizadas en el ADNmt, las mutaciones en genes nucleares presentan diferentes patrones de herencia mendeliana: autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al sexo. A grandes rasgos estas mutaciones pueden afectar a<sup>129</sup>:

- ✓ **Subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS.** Se han descrito mutaciones en las subunidades de los cinco complejos. Por ejemplo, NDUFA9(CI)<sup>130</sup>, SDHA (CII)<sup>131</sup>, UQCRB (CIII)<sup>132</sup>, COX6B1 (CIV)<sup>133</sup> y ATP5A1(CV)<sup>134</sup>.
- ✓ **Factores de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS.** Se han descrito también mutaciones en factores de ensamblaje requeridos para la correcta inserción de las subunidades dentro de cada complejo. Algunos ejemplos son NDUFAF1 (CI)<sup>135</sup>, SDHAF1 (CII)<sup>136</sup>, BCS1L (CIII)<sup>137</sup>, SURF1 (CIV)<sup>138</sup> y TMEM70 (CV)<sup>139</sup>.
- ✓ **Factores de mantenimiento y estabilidad del ADNmt.** Hasta la fecha se han descrito mutaciones patogénicas en 20 genes nucleares que intervienen en estos procesos; un ejemplo es el gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial, *POLG*, donde se encuentran las mutaciones más comunes relacionadas con este tipo de enfermedades (alrededor de 300)<sup>140, 141</sup>.
- ✓ **Factores que intervienen en la traducción mitocondrial.** Ver apartado 3.2.1.
- ✓ **Dinámica mitocondrial.** Se han descrito mutaciones en genes como OPA1, MFN2 y DRP1<sup>142</sup> pudiendo alterar los procesos de fusión, fisión, movilidad o recambio mitocondrial, los cuales son claves para una correcta función OXPHOS.
- ✓ **Otros: transportadores de membrana<sup>143</sup>, metabolismo de fosfolípidos<sup>144</sup>, biosíntesis CoQ<sup>145</sup>, etc.**

### 3.2.1. Patología mitocondrial derivada de defectos en la maquinaria de traducción

Aunque nuestro conocimiento sobre el mecanismo de traducción mitocondrial es aún incompleto, las nuevas tecnologías de secuenciación han demostrado que mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas necesarias para la síntesis fidedigna de las proteínas mitocondriales son la mayor causa de enfermedad mitocondrial<sup>146, 147</sup>. Estos fallos en la traducción mitocondrial pueden estar causados por:

- ✓ Mutaciones en proteínas ribosomales. Hasta la fecha, solo se han descrito mutaciones en cuatro MRPSs (7, 16, 22 y 23) y en tres MRPLs (3, 12 y 44) de las 80 proteínas que conforman el mitorribosoma<sup>93, 148</sup>.
- ✓ Mutaciones en genes que codifican proteínas que intervienen en el propio proceso de traducción, como son los factores de elongación EFTu-mt<sup>149</sup> o EFG1<sup>150</sup>.
- ✓ Mutaciones en proteínas que modifican los ARNt como es el caso de PUS1, proteína encargada de convertir la uridina a pseudouridina en diferentes posiciones de los ARNt -mt<sup>151</sup>.

- ✓ Mutaciones en proteínas que intervienen en el procesamiento y/o estabilidad los ARNm-mt, como es el caso de ELAC2<sup>152</sup>.
- ✓ Mutaciones en las aminoacil-ARNt sintetasas mitocondriales (revisado en<sup>105</sup>). Las enfermedades asociadas a mutaciones en genes que codifican las aminoacil-ARNt sintetasas mitocondriales están emergiendo como una causa especialmente importante de este tipo de patologías. Desde la identificación en 2007 de la primera mutación patogénica en la aspartil-ARNt sintetasa (DARS2) en un paciente que cursaba con leucodistrofia<sup>153</sup> se han descrito mutaciones en las 19 ARS2 y, todas ellas, con la excepción de YARS2 y GARS, afectan al sistema nervioso central principalmente, aunque en general causan fenotipos muy variables. De hecho se considera que son el grupo de enfermedades mitocondriales OXPHOS que presentan mayor variabilidad fenotípica junto con las mutaciones en los ARNt-mt<sup>154</sup>. Además, recientemente se ha caracterizado una mutación patogénica en el gen *QRSL1* que codifica la subunidad A de la glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa (GATA) necesaria para la correcta formación del Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt<sup>148</sup> como se ha comentado en el apartado anterior.

En la actualidad, el mayor desafío en este área es la falta de tratamientos efectivos que, hasta la fecha, son básicamente sintomáticos<sup>111</sup>. Para poder aplicar diferentes tratamientos o aproximaciones terapéuticas es necesario entender los mecanismos moleculares que conducen a las diferentes enfermedades, lo cual, por ejemplo, en el caso de las aminoacil-ARNt sintetasas aún no están claros.

#### 4. Identificación de genes no descritos implicados en la función OXPHOS

Identificar todas las proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial y entender cómo se integran en las diferentes vías necesarias para una correcta función es fundamental para entender los mecanismos subyacentes a las diferentes funciones biológicas y sus alteraciones. Hace diez años Pagliarini y colaboradores establecieron una base de datos constituida por lo que se estimaba el 85% del proteoma mitocondrial humano y de ratón. Esta base de datos recibe el nombre de MitoCarta e incluía 1098 proteínas<sup>155</sup>. Recientemente ésta ha sido actualizada y ha dado lugar a MitoCarta 2.0 en la que se incluyen 1158 proteínas<sup>156</sup>. A pesar de todos los avances que se han realizado durante la última década catalogando el proteoma mitocondrial, la caracterización de todas estas proteínas aún no es completa. De hecho, gracias a un estudio reciente se ha estimado que alrededor del 20% aún no están caracterizadas funcionalmente<sup>157</sup>. En este estudio, además, se propone una lista actualizada de este proteoma, MitoCarta +, que incluye 1166 proteínas humanas con una localización mitocondrial validada.

Esta limitación en el conocimiento de los genes implicados en la función OXPHOS ha dificultado nuestro entendimiento de la biología mitocondrial básica y, sobre todo, hace que sea más complicado entender la naturaleza y la causa de muchas enfermedades mitocondriales. Así, en muchos pacientes con enfermedades mitocondriales diagnosticadas bioquímicamente se desconoce el gen responsable. De hecho, actualmente se estima que alrededor del 50% de los pacientes con enfermedades mitocondriales no tienen un diagnóstico molecular<sup>146</sup>. Además, otras enfermedades se originan por mutaciones en proteínas mitocondriales que no tienen una función conocida, haciendo difícil inquirir en el mecanismo molecular de estas enfermedades.

En la actualidad, se utilizan múltiples estrategias para avanzar en la identificación y caracterización de estas proteínas, pudiéndose agrupar en tres grandes aproximaciones: el estudio de pacientes, el rastreo sobre sistemas celulares y el desarrollo de algoritmos informáticos. Indudablemente, estas estrategias no solo no son excluyentes sino que se complementan. La búsqueda de genes responsables de una enfermedad a partir del estudio de pacientes es una de las primeras aproximaciones. En este área se incluyen los análisis de los árboles genealógicos y de muestras de familiares portadores afectados y no afectados, los ensayos de homocigosidad, el rastreo de las regiones de segregación, etc., siendo todas ellas herramientas poderosas para acotar primero la región cromosómica y, finalmente, el gen responsable<sup>158</sup>. La incorporación de nuevas tecnologías como el análisis de microarrays, la secuenciación de exomas y el *Complexome Profiling* han abierto también nuevas expectativas para la identificación de genes no descritos<sup>159, 160</sup> a partir de muestras de pacientes. Por otro lado, los sistemas celulares permiten aproximaciones *in vivo* asequibles que pueden, además, trasladarse posteriormente a modelos animales. Así, se han realizado aproximaciones de rastreo masivo de genes candidatos utilizando librerías de interferencia de ARN, seleccionando aquellos genes cuyo *knockdown* induce pérdida de la función OXPHOS<sup>161</sup> y, más recientemente, utilizando librerías de CRISPR/Cas9<sup>162</sup>. Finalmente, los estudios *in silico* utilizan distintas aproximaciones. Generalmente, se basan en las comparaciones de genes/proteínas de un organismo frente a los de otros organismos, o frente a dominios con funciones asignadas o con cierta probabilidad de asignarse. En este sentido, hay dos herramientas informáticas que ilustran especialmente las posibilidades de los sistemas *in silico*: la aproximación MAESTRO que integra 8 criterios de exigencia para proteínas nucleares de destino mitocondrial (método en el que está basado MitoCarta<sup>163</sup>) y Ortho-Profile, que utiliza un algoritmo de rastreo de ortólogos y que ha permitido encontrar 181 genes humanos no descritos ortólogos a otros de levadura que codifican proteínas mitocondriales<sup>164</sup>.

La identificación de nuevos genes servirá para aumentar el conocimiento global en la biología mitocondrial básica, permitirá el diagnóstico de los pacientes y ayudará a comprender la



patogénesis de muchas enfermedades mitocondriales, lo que es importante tanto para la prevención de su transmisión como para la aplicación de un posible tratamiento.

#### 4.1. Utilización del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9

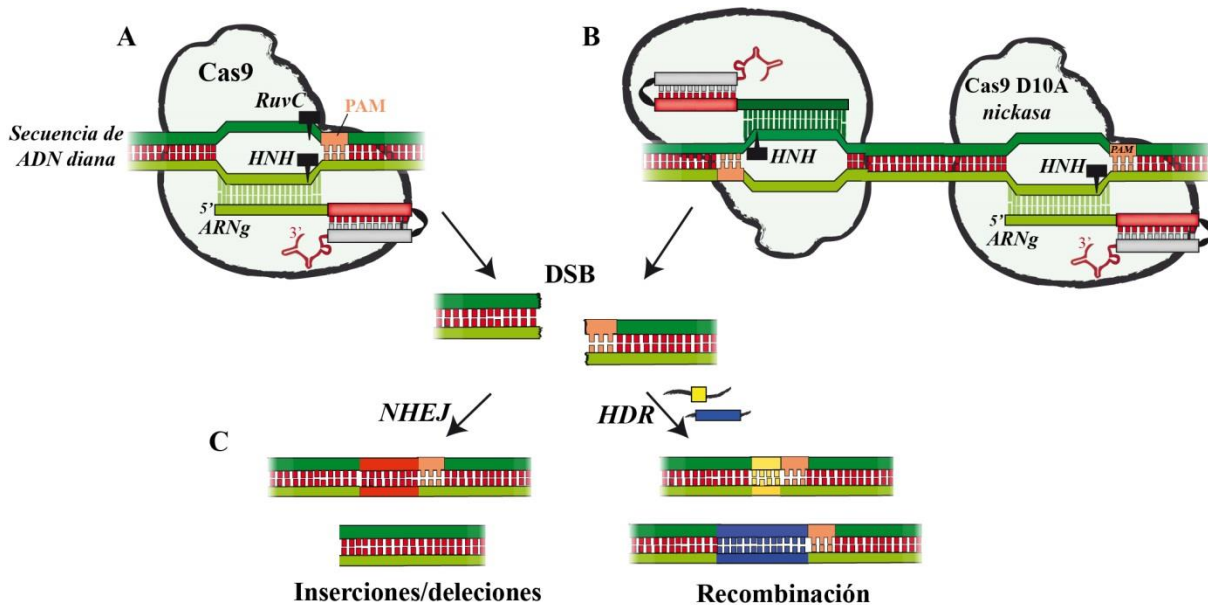
Una de las aproximaciones más comunes para dilucidar la función específica de un gen es neutralizar su función mediante la generación de mutantes. Con este objetivo, en los últimos años se han desarrollado una serie de nucleasas que pueden reconocer sitios concretos del genoma a través de un dominio de unión a ADN específico de secuencia y un dominio nucleasa no específico que escinde el ADN, generando así la ruptura de su doble cadena. Los mecanismos de reparación que actúan a continuación generan las inserciones, deleciones o sustituciones en el locus de interés<sup>165</sup>.

En la última década, se han desarrollado varios sistemas de nucleasas para llevar a cabo esta edición genómica, incluyendo las nucleasas de dedos de zinc (ZFN, *zinc-finger nucleases*) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN, *transcription activator-like effector nucleases*). Más recientemente, el sistema CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) / Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR, *CRISPR associated protein 9*) se está utilizando como una alternativa a las dos anteriores<sup>166</sup>.

El sistema CRISPR/Cas se descubrió en bacterias y arqueas como un sistema inmune adaptativo que confiere resistencia frente a determinados virus y plásmidos<sup>167</sup>. Mediante este sistema, el ADN exógeno es procesado por nucleasas Cas en fragmentos de ADN más pequeños que son incorporados como espaciadores de una secuencia repetida en tándem (locus CRISPR) generando un locus tipo AXBXCX. Estos elementos espaciadores (A, B, C), por tanto, contienen secuencias homólogas a los elementos exógenos que, en futuras presentaciones, se transcribirán en largos transcritos primarios que luego serán procesados en una librería de ARNs (ARNcr, *ARN CRISPR*) (AX, BX, CX). Cada uno de ellos contiene un dominio complementario al ADN invasor (A, B, C) donde anillará, y otro dominio (X) que será reconocido por otra molécula de ARN denominada transactivador de ARNcr (ARNtracr) que será la encargada de reclutar a la nucleasa Cas para que lleve a cabo la escisión y eliminación del ADN foráneo<sup>168, 169</sup>.

El sistema CRISPR/Cas se puede clasificar en tres tipos: I, II y III, en función de la secuencia y estructura de la proteína Cas<sup>170</sup>. En el sistema CRISPR/Cas tipo II participa la proteína Cas9, que tiene dos dominios nucleasa: HNH y RuvC. Este sistema, al que a partir de ahora denominaremos CRISPR/Cas9, es el que se ha utilizado más ampliamente como herramienta para la edición genómica.

Para que tenga lugar la escisión del ADN, la secuencia diana reconocida por el sistema CRISPR y denominada protoespaciadora ha de ir seguida de otra secuencia corta de nucleótidos que se conoce como motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *protospacer adjacent motif*). Una vez se une el complejo a la secuencia protoespaciadora, ambas cadenas del ADN son cortadas por el dominio HNH y el dominio RuvC de la proteína Cas9, generándose un corte de doble cadena (DSB, *double strand break*) en el ADN (Figura 5A).



**Figura 5. Sistema CRISPR-Cas9 como herramienta para la edición genómica.** (A) Representación de la proteína Cas9 de *Streptococcus Pyogenes* unida al ARN guía (ARNg) y a la secuencia diana del genoma. (B) Cas9 puede funcionar como *nickasa* cuando contiene una mutación en el sitio catalítico (D10A) del dominio RuvC. En este caso se utilizan dos ARNg que se unen a una distancia próxima en el genoma. (C) El DSB generado desencadena la maquinaria de reparación de ADN celular, bien NHEJ o bien HDR si existe un molde complementario a la zona editada (representado como rectángulos amarillo y azul). **DSB**: cortes de doble cadena. **NHEJ**: reparación por recombinación no homóloga **HDR**: reparación por recombinación homóloga.

Este sistema está teniendo un gran impacto en el campo de la edición genómica y para simplificarlo se ha diseñado un ARN guía (ARNg), que es un ARN quimérico que contiene el ARNcr y ARNtracr en una única molécula<sup>171</sup>. El ARNg en el interior celular junto con la proteína Cas9, bien por transfección de plásmidos que los codifiquen o bien por transfección directa de los componentes, se unirán a la región del genoma que se desee modificar. El DSB generado desencadena la maquinaria de reparación de ADN celular, incluyendo la reparación por recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end joining*) o la reparación por recombinación homóloga (HDR, *homology directed repair*) (Figura5C). En este último caso se requiere de un molde o donador de la zona a editar. Mediante NHEJ se ligan rápidamente los extremos generados por el DSB pero se generan pequeñas inserciones o deleciones en las secuencias diana, que permitirán modificar el gen de estudio.

Por lo general se utiliza la proteína Cas9 de la cepa bacteriana *Streptococcus pyogenes* la cual requiere que la secuencia PAM esté constituida por los nucleótidos NGG, siendo N cualquiera de los cuatro nucleótidos.

Por último, para minimizar la cantidad de cortes indeseados en secuencias fuera de la diana (*off-targets*) se han desarrollado las proteínas Cas9 *nickasas* (Cas9n) que han perdido la capacidad de cortar una de las cadenas del ADN, ya que poseen una mutación en uno de sus dominios: p.D10A en el dominio RuvC o p.H840A en el dominio HNH. De tal manera que estos cortes (*nicks*) en las posibles secuencias fuera de la diana se repararán eficazmente por el mecanismo de escisión de bases (BER, *base excision repair*) copiando perfectamente la hebra no cortada sin producirse alteraciones en la secuencia. Sin embargo, si se emplea la combinación de dos ARNg que se unen en el genoma a una distancia no mayor de 100 pares de bases y en cadenas complementarias de la región de interés, el corte de Cas9n desencadenará la misma maquinaria de reparación que con los DSBs<sup>172, 173</sup> (Figura 5B), obteniendo por tanto inserciones o deleciones de entre 30 y 100 nucleótidos del mismo modo que ocurría con la proteína Cas9 salvaje pero habiendo disminuido dramáticamente la probabilidad de cortes indeseados.

#### 4.2. Utilización de *Drosophila melanogaster* como herramienta para la identificación de nuevos genes mitocondriales

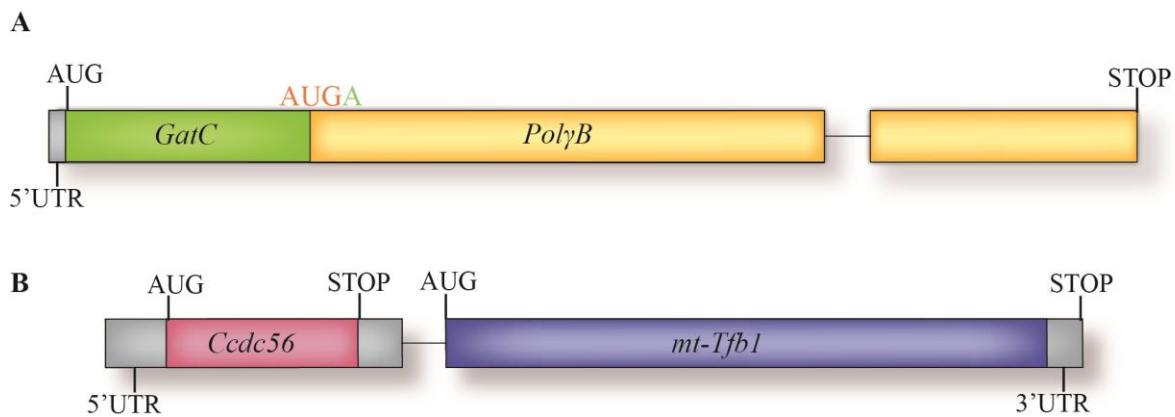
*Drosophila* posee una molécula de ADNmt similar a la de mamíferos y, aunque tiene una organización génica diferente, conserva los mismos elementos responsables de su replicación, transcripción, traducción y mantenimiento. Por ello, *Drosophila* es un modelo de gran utilidad para el estudio de la mitocondria tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

Una de las líneas de trabajo de nuestro laboratorio se ha centrado en la identificación y caracterización de distintos aspectos de la maquinaria del metabolismo del ADNmt, utilizando *D.melanogaster* como modelo. Entre ellos se encuentran proteínas como la ADN polimerasa mitocondrial (Poly)<sup>174, 175</sup>, la ADNmt helicasa<sup>176</sup>, el factor de transcripción mt-Tfb2<sup>177</sup> y el factor de traducción mt-Tfb1<sup>178</sup>.

Durante estos últimos años, hemos descrito cómo los genes *PolyB* y *mt-Tfb1* de *Drosophila* están codificados en ARNm bicistrónicos (Figura 6). Así, el gen *PolyB* es precedido en el ARNm por el gen *GatC*, que codifica la subunidad C del complejo enzimático GatCAB descrito previamente<sup>108</sup>. Por su parte, el ARNm que codifica *mt-Tfb1* contiene en su región 3' la ORF de la proteína Ccdc56, cuyo ortólogo humano es COA3, y que datos de nuestro laboratorio han demostrado que es un modulador de la traducción y un factor de ensamblaje del complejo IV de la cadena respiratoria<sup>179, 180</sup>.

## Introducción

En general, el genoma de *Drosophila* es inusualmente compacto, siendo habitual el solapamiento de las regiones promotoras de genes divergentes<sup>181</sup> y de regiones 3' de genes convergentes. La agrupación de genes mitocondriales podría ser una herramienta adicional para esta densa organización, aunque los ejemplos anteriormente citados sugieren que podría ser una tendencia. Así, el denominado cluster  $\gamma$ -pol es una región de aproximadamente 12 kb que contiene los genes *PolyA* (subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial), *PolyB* (subunidad accesoria de la ADN polimerasa mitocondrial en *Drosophila*), *GatC* (subunidad C de GatCAB) y *mt-RpS23* (proteína de la subunidad menor del ribosoma mitocondrial)<sup>182</sup>. La localización de genes en bicistrones podría suponer un escalón adicional a nivel organizativo y si, además, las proteínas que codifican participan en procesos funcionalmente relacionados podría implicar una nueva herramienta de control de la expresión génica en eucariotas.



**Figura 6. Estructura de los pre-ARNm bicistrónicos de *Drosophila melanogaster*.** (A) En *D.melanogaster*, los genes *GatC* y *PolyB* se encuentran codificados en un mensajero bicistrónico. El codón de terminación de la traducción de *GatC* se encuentra solapado con el codón de inicio de la traducción de *PolyB* (AUGA). Este ARNm no presenta región 3' UTR. En gris se representa la región 5'UTR, los rectángulos representan los exones y la línea representa un intrón de 54 pb. (B) En *D. melanogaster*, el gen *mt-Tfb1* se encuentra codificado en un ARNm bicistrónico junto con *Cdc56*. En gris se representan las regiones no codificantes, los rectángulos representan los exones y la línea muestra un intrón de 63 pb.

Así, encontrar en dos ocasiones distintas un gen no descrito anteriormente (*GatC* y *Cdc56*) sobre el mensajero de otro (*PolyB* y *mt-Tfb1*, respectivamente) y todos ellos implicados en la función OXPHOS abre una posibilidad muy interesante en la búsqueda de genes no descritos hasta la fecha. Estimaciones *in silico* sugieren la presencia de pequeñas regiones codificantes próximas al extremo 5' de, al menos, 401 mensajeros de *Drosophila* pudiendo ser realmente hasta 4561<sup>183</sup>. De ellas, un número significativo acompañan a un gen que codifica proteínas mitocondriales y metiltransferasas<sup>184</sup>. Por ello, uno de los objetivos específicos de esta tesis doctoral es utilizar el genoma de *D.melanogaster* como herramienta para identificar nuevos genes que codifican proteínas de destino mitocondrial.

## *Objetivos*

---

Las disfunciones del sistema OXPHOS son responsables de las denominadas patologías mitocondriales OXPHOS, que engloban a un grupo muy heterogéneo de enfermedades con cuadros clínicos muy variados. Esta variabilidad clínica, el desconocimiento de un gran número de los genes responsables y la ausencia de la caracterización funcional de gran parte del proteoma mitocondrial, dificulta enormemente el diagnóstico genético y molecular de estas enfermedades.

Por ello, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido identificar y caracterizar nuevas proteínas implicadas en la función OXPHOS y asociar sus alteraciones a enfermedades mitocondriales humanas.

Este objetivo general se apoya en los siguientes objetivos específicos:

- Utilizar el genoma de *D.melanogaster* como herramienta para identificar nuevos genes que codifican proteínas implicadas en la función OXPHOS.
- Evaluar la patogenicidad de la mutación p.M78R en la proteína GATC, subunidad de la enzima glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa mitocondrial.
- Estudiar la función molecular de la proteína candidata a participar en la función OXPHOS, C6orf203, mediante la utilización de la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9.

## *Materiales y Métodos*

---

## 1. Materiales

### 1.1. Reactivos, soluciones y tampones

Las soluciones y tampones de uso común empleados en esta tesis doctoral se realizaron de acuerdo con las descripciones detalladas en<sup>185</sup>. La composición de los medios y materiales específicos empleados en los distintos experimentos viene detallada y descrita en el apartado de Métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

### 1.2. Radioisótopos

La mezcla de los aminoácidos marcados con radioisótopos L-[<sup>35</sup>S]-Metionina y L-[<sup>35</sup>S]-Cisteína para el marcaje de las proteínas mitocondriales sintetizadas *de novo* y la molécula de UTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] para el marcaje de sondas radiactivas en la realización de *Northern blot* fueron suministrados por la compañía Perkin Elmer (NEG772 y NEG002A100UC). Estos radioisótopos se utilizaron bajo la autorización y supervisión del Servicio de Protección Radiológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

### 1.3. Líneas celulares

#### • Líneas celulares inmortalizadas:

- Línea celular HEK293T: células embrionarias de riñón humano que contienen el antígeno T grande del virus SV40 (*SV40 large T antigen*). Utilizada para realizar la edición genómica de *C6orf203* y posterior caracterización. Esta línea fue genéticamente comprobada en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.
- Línea celular HeLa: línea derivada de carcinoma del cuello uterino humano. Utilizada para los ensayos de colocación de *C6orf203* con la red mitocondrial.
- Línea celular 143B: línea derivada de osteosarcoma humano. Utilizada en el experimento de *Complexome profiling*.

#### • Líneas celulares primarias:

- Línea comercial de fibroblastos dérmicos humanos, *Normal Human Dermal Fibroblasts* (NHDF), suministrado por PromoCell (referencia C-12300).
- Fibroblastos obtenidos a partir de biopsia de piel procedentes de un paciente portador de una mutación en el gen *GATC* (H.B. Feldman).

### 1.4. Cepas Bacterianas

Para la transformación y amplificación de plásmidos se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>185</sup>. El cultivo de esta cepa se llevó a cabo en medio Luria-Bertani (LB) (1% (p/v) tripton, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl) suplementado con los antibióticos



ampicilina (200 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml), en función de la resistencia portadora por el vector utilizado.

### 1.5. Vectores

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado los siguientes vectores de clonaje y expresión:

- **pGEMT-Easy:** Vector de clonaje de productos de PCR amplificados por polimerasas que dejan una adenina (A) en su extremo 3'. Se utilizó para la secuenciación de dichos productos. Este vector se obtuvo de Promega.
- **pIRESpuro2:** Vector de expresión eucariota bajo el control del promotor de CMV. Contiene un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*) entre el sitio múltiple de clonaje donde se inserta el gen de interés y el gen de resistencia a puromicina (puromicina N-acetyl-transferasa, PAT). Utilizado para la sobreexpresión de C6orf203. Este vector se obtuvo de Clontech.
- **pEGFP-N1:** Vector de expresión eucariota bajo el control del promotor de CMV que permite la generación de proteínas con la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, *Enhanced Green fluorescent protein*) fusionada en su extremo carboxilo terminal. Utilizado en los ensayos de localización subcelular de C6orf203. Este vector se obtuvo de Clontech.
- **MCS-BioID2-HA:** Vector de expresión eucariota que, bajo el control del promotor CMV, permite la generación de proteínas fusionadas en su extremo carboxilo terminal a una biotina ligasa humanizada de la bacteria *Aquifex aeolicus* y mutada en el dominio catalítico (p.R40G) que le confiere la capacidad de biotinar proteínas físicamente próximas (BioID2). Este vector fue desarrollado en el laboratorio de Kyle Roux y adquirido de Addgene (# 74224)<sup>186</sup>.
- **pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n(D10A):** Vector de expresión del ARN guía bajo el control del promotor U6 y de la proteína humanizada de *Streptococcus pyogenes* Cas9 (D10A) nickasa (Cas9n) bajo el control del promotor híbrido de CMV *enhancer*/β-actina de pollo (*CBh, chicken β-actin promoter*). Utilizado para la edición genómica de C6orf203. Este plásmido fue desarrollado en el laboratorio de Feng Zhang y adquirido de Addgene (#42335)<sup>187</sup>.

### 1.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron con el programa *Oligo Analyzer* (*Integrated DNA technologies*) o en el servidor del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. El liofilizado se resuspendió en agua estéril Braun (B.Braun) llevándolo a una concentración de 100 µM. En cada tabla se especifica el nombre y la secuencia de los oligonucleótidos sentido (D) y antisentido (R) en dirección 5'→3'. Las

correspondientes dianas de restricción se indican en negrita y las modificaciones en las secuencias, en caso de haberlas, en color verde.

**1.6.1. Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico mutacional del gen *GATC***

Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
<i>GATC</i> D	CCAAGCTT <b>GGAAGAAATGTGGT</b> CGCGGT <b>TG</b>	Exón 1 <i>GATC</i>
<i>GATC</i> R	CCGAATTGCTACTT <b>CAGCTGTGTGGGAATG</b>	Exón 4 <i>GATC</i>

**1.6.2. Oligonucleótidos utilizados para analizar los niveles de los ARNm de *QRSL1*, *GATB* y *GATC* mediante qRT-PCR**

Gen	Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
<i>QRSL1</i>	h <i>QRSL1</i> _D_qpcr1	CTTGCCTGGCTCCTGTGGTGG	Exón 1
	h <i>QRSL1</i> _R_qpcr1	CCGCAGAAACTTCTCGGAGGCT	Exón 1 y 2
	h <i>QRSL1</i> _D_qpcr2	GGCTGCGCCCATGTAACATCAC	Exón 1
	h <i>QRSL1</i> _R_qpcr2	CCGCAGAAACTTCTCGGAGGCT	Exón 1 y 2
<i>GATB</i>	h <i>GATB</i> _D_qpcr1	AGTGAGAGTCCTGTCACACCCTCTG	Exón 10 y 11
	h <i>GATB</i> _R_qpcr1	TGCCCCCTGGTCCTGCATCA	Exón 12
	h <i>GATB</i> _D_qpcr2	TGGAGGCCCATCCTCAAGTGGTAA	Exón 12 y 13
	h <i>GATB</i> _R_qpcr2	AGTCGCTTTCCGGACCAACCC	Exón 13
<i>GATC</i>	h <i>GATC</i> _D_qpcr1	CCAAGGCGGATCCTCAGGGCA	Exón 1 y 2
	h <i>GATC</i> _R_qpcr1	CCACAAGCGCTAGACGCTCCA	Exón 2
	h <i>GATC</i> _D_qpcr2	CCAAGGCGGATCCTCAGGGCAGT	Exón 1 y 2
	h <i>GATC</i> _R_qpcr2	TGTGTCCACGGCGCGTAGC	Exón 2
<i>HPRT1</i>	HPRT1_D_qpcr1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	Exón 1 y 2
	HPRT 1_R_qpcr1	AGACGTT <b>CAGTCCTGTCCATA</b>	Exón 2 y 3

**1.6.3. Oligonucleótidos utilizados en la cuantificación del ADNmt mediante PCR cuantitativa**

Nombre	Secuencia
12S D	CCACGGGAAACAGCAGTGAT <b>T</b>
12S R	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGT <b>G</b>

### 1.6.4. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en pIRESpuo2

Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
C6orf203-Flag D <b>AflII</b>	CATCTTAAGATGGCTATGGCTAGTGTTAA	Exón 2 <i>C6orf203</i>
C6orf203-Flag R <b>NotI</b>	TAGCGGCCGCTTACTTGTTCGTCATCGTC TTTGTAGTCTTTAGACATTCTCTCT	Exón 4 <i>C6orf203</i>
C6orf203 R <b>NotI</b>	GTAGCGGCCGCTTATTTAGACATTCTCTT CT	Exón 4 <i>C6orf203</i>

### 1.6.5. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en pEGFP-N1

Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
C6orf203-EGFP D <b>XhoI</b>	CCACTCGAGATGGCTATGGCTAGTGTTAAA	Exón 2 <i>C6orf203</i>
C6orf203-EGFP R <b>BamHI</b>	CCAGGATCCTTAGACATTCTCTTCTTAGG	Exón 4 <i>C6orf203</i>

### 1.6.6. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de C6orf203 en MCS-BioID2-HA

Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
BioId-C6orf203 D <b>AgeI</b>	ATACCGGTATGGCTATGGCTAGTGTT	Exón 2 <i>C6orf203</i>
BioId-C6orf203 R <b>BamHI</b>	ATGGATCCTTTAGACATTCTCTTCTTAGG CA	Exón 4 <i>C6orf203</i>

### 1.6.7. Oligonucleótidos utilizados para amplificar y analizar la región editada de *C6orf203* mediante el sistema CRISPR/Cas9

Nombre	Secuencia	Lugar de anillamiento
Ed-C6orf203 D	TTCCTCACTGAGACTCCCAGG	Exón 2 <i>C6orf203</i>
Ed-C6orf203 R	TGGGCCAAGTGATTTGTAATGC	Intrón 2 <i>C6orf203</i>

### 1.6.8. Oligonucleótidos utilizados para analizar los pseudogenes de *C6orf203* localizados en el cromosoma 6 (Cr6) y cromosoma 21 (Cr21)

Nombre	Secuencia
Pseudogen <i>C6orf203</i> Cr6 D	CTTCCTGGAATCAGTACTTGTAT
Pseudogen <i>C6orf203</i> Cr6 R	GATTACAGAAGTGAGCCACC
Pseudogen <i>C6orf203</i> Cr21 D	CCTGGAATCGATATAGCACTAAG
Pseudogen <i>C6orf203</i> Cr21 R	TACATTGGATCCAGAAGATCTCC

1.6.9. Oligonucleótidos utilizados para la generación de los ARN guía

Nombre	Secuencia
Pareja 1 CRISPR-C6orf203 D (D1)	CACCGCTCACTCATCTCATCATGA
Pareja 1 CRISPR-C6orf203 R (R1)	AAACTCATGATGAGATGAGTGAGC
Pareja 2 CRISPR-C6orf203 D (D2)	CACCGTATGATGTTGTCCTGAAGA
Pareja 2 CRISPR-C6orf203 R (R2)	AAACTCTTCAGGACAACATCATAAC

1.6.10. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de C6orf203 en pacientes con patología mitocondrial

Exón secuenciado	Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
Exón 1	<b>C6orf203-I1 D</b>	CAGGGGTCGCTGCTTCGCTG	780
	<b>C6orf203-I2 R</b>	TGGCGTTGGTGTGGGATGAGTG	
Exón 2	<b>C6orf203-I2 D</b>	GTCATGACACTGCAC TTGTGAGATA	610
	<b>C6orf203-I3 R</b>	TGGGCCAAGTGATTTGTAATGCTAT	
Exón 3	<b>C6orf203-I3 D</b>	GGGCTTGAGTGTACCCATCACC	239
	<b>C6orf203-I4 R</b>	CAGAGAAAGAAGAGGAGCCAGAGG	
Exón 4	<b>C6orf203-I4 D</b>	TTGCATTGGCCTGGATTTCCTCA	436
	<b>C6orf203-I5 R</b>	TGGATCAAGGTGGGCAGGGGG	

1.6.11. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las diferentes construcciones

Nombre	Secuencia
<b>PX335 D</b>	GACTATCATATGCTTACCGT
<b>PX335 R</b>	ACCACTTTTCAAGTTGATA
<b>Universal D</b>	GTAAAACG CGGCCAGTG
<b>Universal R</b>	AGCGGATAACAATTCACAC
<b>PIRES T7 D</b>	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>PIRES R</b>	TTTGAGAGGGAGTACTCAAC

### 1.7. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios y sus principales características se detallan en las siguientes tablas.

#### 1.7.1. Anticuerpos primarios contra proteínas humanas

Anticuerpo	Origen	Procedencia, Referencia	Dilución	Utilidad
ND1	Conejo	Dra. Anne Lombès	1:2000	WB
NDUFA9	Ratón	Abcam, ab14713	1:1000	WB/BN
SDHA	Ratón	Abcam, ab14715	1:2000	BN
UQCRC2	Ratón	Abcam, ab14745	1:1000	BN
COX1	Ratón	Abcam, ab14705	1:1000	WB
COX5A	Ratón	Abcam, ab110262	1:1000	WB/BN
ATP5A1	Ratón	Abcam, ab14748	1:1000	BN
Mitoprofile	Ratón	Abcam, ab110411	1:1000	WB
MnSOD	Conejo	Merck Millipore, 06-984	1:1000	WB
MRPL49	Conejo	Proteintech, 15542-1-AP	1:1000	WB
MRPS22	Conejo	Proteintech, 10984-AP	1:1000	WB
GRSF1	Conejo	Sigma-Aldrich, HPA036985	1:1000	WB/IF
C6orf203	Conejo	Abcam, ab151066	1:500	WB/BN
OPA1	Conejo	Abcam, ab42364	1:1000	WB
MFN2	Ratón	Abcam, ab56889	1:2000	WB
NDUFS2	Ratón	Abcam, ab110249	1:5000	WB
GATA	Conejo	ThermoFisher, PA5-48981	1:500	WB
GATB	Ratón	Abcam, ab55606	1:1000	WB
GATC	Conejo	LSBio, LS-C410140	1:1000	WB
VDAC	Conejo	Abcam, ab15895	1:4000	WB
$\alpha$ -tubulina	Ratón	Abcam, ab7291	1:5000	WB
$\beta$ -actina	Ratón	Sigma Aldrich, A5316	1:5000	WB

Abreviaturas: **WB**: Western blot; **BN**: Blue native; **IF**: Inmunofluorescencia.

#### 1.7.2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Origen	Fabricante, Referencia	Dilución
Anti-IgG de ratón HRP	Cabra	Santa Cruz, sc-516102	1:3000
Anti-IgG de conejo HRP	Cabra	Santa Cruz, sc-2357	1:3000
Anti-IgG conejo Alexa Fluor 546	Cabra	Invitrogen, A11029	1:1000

## 2. Métodos

### 2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las ADN polimerasas utilizadas para las PCR se especifican en el apartado 2.2.2 Para llevar a cabo estas reacciones se preparó una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: 1X tampón específico de cada ADN polimerasa, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada 2'-Deoxinucleótido 5'- trifosfato (dNTPs) (BIORON GmbH), 1U de la ADN polimerasa correspondiente y 0,25 μM de cada oligonucleótido directo y reverso utilizados (apartado 1.6). Las condiciones de las PCR fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 1 minuto a la temperatura de anillamiento óptima para cada pareja de oligonucleótidos y 1 minuto/kilobase a amplificar a 72°C, posteriormente un ciclo de 10 minutos a 72°C. Para ello se utilizó un termociclador modelo GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Todos los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de entre el 1% y el 3,5% en función del tamaño del amplicón.

### 2.2. Clonajes

#### 2.2.1. Síntesis de ADNc a partir de ARNm (Retrotranscripción)

La retrotranscripción (RT) del ARNm para la obtención del ADNc se realizó utilizando el kit Quantitect Reverse Transcription (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.2.2. Amplificación de los fragmentos, digestión y ligación

Las reacciones de PCR para el clonaje de los ADNc en los distintos plásmidos se realizó con el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche) que contiene una ADN polimerasa que presenta actividad correctora. Para el resto de casos, como la comprobación de los clonajes mediante PCR de colonias de *E.coli* se utilizó la ADN polimerasa termorresistente de la casa comercial Biotools. El producto obtenido tras la reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa y en algunos casos se purificó la banda del gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. En otros casos el producto de PCR se purificó directamente mediante el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN).

Las enzimas de restricción necesarias para los clonajes vienen detalladas en el apartado 1.6 y se emplearon siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Invitrogen, Roche).

Las reacciones de ligación para el clonaje de los oligonucleótidos de doble cadena que generan los ARN guía en el vector PX335 se realizaron con el kit *Quick ligation* (New England Biolabs). En el resto de casos se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs).

### 2.2.3. Transformación bacteriana y purificación de ADN plasmídico

Tras las ligaciones correspondientes se llevó a cabo la transformación de las bacterias competentes *E.coli* DH5 $\alpha$  siguiendo un protocolo estándar basado en un choque térmico a 42°C<sup>185</sup>. Seguidamente, las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de resistencia correspondiente y se crecieron 16 horas a 37°C. A continuación, se confirmó en diferentes colonias seleccionadas la presencia del plásmido de interés realizando PCR a partir de las mismas, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos específicos de la secuencia clonada o del propio plásmido. Las colonias bacterianas individuales se crecieron en LB líquido con el correspondiente antibiótico de selección durante 16 horas a 37°C en agitación orbital. Finalmente, la purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN plasmídico se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro *Nanophotometer*<sup>TM</sup> *Pearl* (IMPLEN).

### 2.2.4. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias

La secuenciación de ADN tanto de los productos de PCR como de los diferentes clonajes fue realizada en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto-Sols” mediante un secuenciador automático ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied biosystems). El análisis de la secuencias se realizó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5<sup>188</sup>. Los alineamientos y comparaciones de secuencias con las bases de datos del NCBI se realizaron mediante la herramienta informática BLASTN (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2.3. Purificación de ácidos nucleicos

### 2.3.1. Purificación de ADN genómico a partir de cultivo celular

Tras centrifugar las células a 300g durante 5 minutos, los sedimentos celulares se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se procedió a la extracción del ADN genómico (ADNg) utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro *Nanophotometer*<sup>TM</sup> *Pearl* (IMPLEN).

### 2.3.2. Purificación de ARN celular

Tras centrifugar las células a 300g durante 5 minutos, los sedimentos celulares se lavaron dos veces con PBS a 4°C y, a continuación, el ARN total de las células fue obtenido utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El TRIzol es un reactivo

monofásico de fenol e isotiocianato de guanidina que permite mantener la integridad de ARN al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogenización. Los ARN obtenidos fueron resuspendidos en agua Braun (B.Braun) libre de ARNasas. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro *Nanophotometer™ Pearl* (IMPLEN). La pureza e integridad del mismo se analizó utilizando nanochips en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent technologies) obteniéndose valores de integridad (RIN) de entre 9 y 10.

## 2.4. Detección de ácidos nucleicos

### 2.4.1. Northern blot

#### 2.4.1.1. Cuantificación de los ARNm-mt

Para determinar la cantidad y procesamiento de los ARN mitocondriales en la células *C6orf203 knockout* (KO) se realizó *Northern blot* como se describe en<sup>189</sup>. El ARN total extraído con TRIzol Reagent (Invitrogen) se trató en primer lugar con ADNasaI (Roche) con el objetivo de digerir el ADN presente en la muestra que pudiera interferir en el experimento. Se incubaron 5 µg de ARN a 60°C durante 5 minutos en el tampón de carga que contenía 50% formamida, 6,5% formaldehído, azul de bromofenol y bromuro de etidio en tampón MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico y 1 mM EDTA) y seguidamente se incubó 2 minutos a 4°C. A continuación, el ARN se resolvió en geles de fomaldehído al 1% de agarosa y se transfirió a una membrana de nailon Amersham Hybond™-N+ (GE Healthcare). Para unir covalentemente el ARN a la membrana se utilizó el protocolo Optimal Crosslink en un Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corporation). La membrana se prehibridó con el tampón PerfectHyb™ Plus Hybridization (Sigma-Aldrich). A continuación, la hibridación con las sondas de ARN específicas marcadas con <sup>32</sup>P se realizó a 60°C durante 16 h en el tampón de prehibridación. Tras la hibridación, la membrana se lavó 3 veces en solución de lavado 1 (2X SSC, 0,1% SDS) y tres veces en solución de lavado 2 (1X SSC, 0,1% SDS) a 60°C. La señal se detectó mediante autorradiografía.

#### 2.4.1.2. Análisis de la aminoacilación del ARN<sup>Gln</sup>-mt

Para analizar la aminoacilación del ARN<sup>Gln</sup>-mt, los fibroblastos se crecieron en medio DMEM suplementado con Glutamax (Gibco) o en medio MEM (*Minimum Essential Media*) sin glutamina y se siguió el protocolo descrito en<sup>190</sup>. Tras la extracción del ARN utilizando el reactivo TRIzol, se disolvió en 0,1 mM EDTA, 10 mM acetato de sodio pH 5 a 4°C. Para el control de acilado (dAc), el sedimento se resuspendió en 200 mM Tris-HCl a pH 9,5, se incubó 5 minutos a 75°C, se precipitó el ARN y se resuspendió en tampón 10 mM acetato de sodio a pH 5.



Se separaron 5 µg de ARN en geles de poliacrilamida (19:1 acrilamida:biscrilamida) al 6,5% que contenían 8 M urea en 0,1 M acetato de sodio pH 5 a 4°C. A continuación, se transfirió a una membrana de nailon Amersham Hybond<sup>TM</sup>-N+ (GE Healthcare) y el ARN se unió covalentemente mediante UV. Las membranas se lavaron en el tampón de hibridación (7% SDS, 0,25 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6) una hora a 65°C. Seguidamente, las membranas se incubaron durante 16 horas a 65°C en tampón de hibridación con las sondas de ARN marcadas con <sup>32</sup>P. Las sondas se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* utilizando la ARN polimerasa T7 en presencia de α-UTP marcado con <sup>32</sup>P usando moldes linearizados. Tras la hibridación, las membranas se lavaron seis veces con 1X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio) durante 15 minutos a 55°C. Las señales se detectaron mediante un escáner Amersham Typhoon phosphorimager (GE Healthcare).

### 2.4.2. RT-qPCR

La extracción de ARN se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente (apartado 2.3.2). A continuación, se realizó la retrotranscripción de 1 µg de los ARNm a ADNc utilizando QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de los niveles de ARNm de los genes *GATA*, *GATB* y *GATC* humanos se realizó utilizando el reactivo SYBR Green (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos específicos para cada uno de estos genes (apartado 1.6.2.) y para el gen HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) que fue utilizado como control endógeno. Los niveles de expresión de los ARNm se normalizaron frente a los niveles de HPRT1.

Los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron en el termociclador Applied Biosystems Step-One Plus Real-Time thermocycler (Applied Biosystems, ThermoFisher), utilizando las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C de 10 min seguido de 40 ciclos de: desnaturalización (15 segundos a 95°C) y anillamiento/elongación (1min a 60°C).

## 2.5. Cultivos celulares y transfección de HEK293T

Las células HEK293T se crecieron en un incubador a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 4,5 g/l de glucosa suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), 50 µg/ml uridina y los antibióticos 100 U/ml penicilina (Penilevel) y 100 µg/ml estreptomycin (laboratorios Reig Jofré). La uridina fue añadida en estos medios para evitar los efectos adversos que puedan derivar de una disfunción en la biosíntesis de nucleótidos como consecuencia de un defecto mitocondrial en las células *C6orf203 knockout* (KO) o en los fibroblastos portadores de una mutación en *GATC*. Esta dependencia de uridina es debida a que un mal funcionamiento de la CR puede afectar a la enzima dihidroorotato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión de dihidroorotato a orotato, el cual es precursor

de uridina monofosfato (UMP). En esta reacción redox, el aceptor de electrones en primera instancia es la CoQ oxidada y finalmente el oxígeno a través de los complejos III y IV. Por tanto, para una correcta síntesis *de novo* de pirimidinas es necesaria la presencia de una reserva de CoQ oxidada, o lo que es lo mismo, un correcto funcionamiento de la CR.

Para la realización de las curvas de crecimiento, así como para realizar las medidas de consumo de oxígeno utilizando el electrodo tipo Clark las células se crecieron en DMEM sin glucosa suplementado con: 0,9 g/l de galactosa, 0,11 g/l de piruvato sódico, 10% de FBS, penicilina y estreptomina.

Para la transfección de las células HEK293T se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células en placas p35 24 horas antes de la transfección. Al día siguiente las células se transfectaron con 4  $\mu$ g de plásmido (apartado 1.5) en medio sin suero ni antibióticos (OptiMEM, Invitrogen). Después de 6 horas se lavaron las células dos veces con PBS y se les añadió medio completo.

Para generar las líneas celulares estables de sobreexpresión de *C6orf203-Flag / BioID*, 24 horas después de la transfección se le añadió al medio el antibiótico de selección puromicina a una concentración de 1,5  $\mu$ g/ml. Las células seleccionadas se crecieron siempre en este medio.

### 2.6. Curvas de crecimiento

Para la realización de las curvas de crecimiento, se sembraron por cuadruplicado  $2,5 \times 10^4$  células en placas p35 tratadas con poli-L-lisina (Sigma Aldrich) en medio con 4,5 g/l de glucosa o 0,9 g/l de galactosa como fuentes de carbono y se cambió el medio cada 24 horas. Las células se recogieron y contaron en una cámara *Neubauer* cada 24 horas.

### 2.7. Medida de consumo de oxígeno

#### 2.7.1. Electrodo tipo Clark

Para llevar a cabo la medida de consumo oxígeno de las células HEK293T control y sus respectivos clones con el gen *C6orf203* editado se utilizaron técnicas previamente descritas<sup>191</sup> con ligeras modificaciones, para lo cual se utilizó un electrodo tipo Clark S1 (Oxygraph system, Hansatech Instruments). Las calibraciones del equipo se llevaron a cabo antes de realizar las medidas utilizando ditionito sódico, un fuerte agente reductor que permite establecer el cero de oxígeno en la cámara de medida.

Un día antes de la medida se sembraron  $6 \times 10^6$  células en placas p150 en medio que contenía 0,9 g/l de galactosa como fuente de carbono. Al día siguiente,  $4 \times 10^6$  células de cada línea fueron resuspendidas en 1 ml de este mismo medio y se midió el consumo de oxígeno basal (nmoles de oxígeno/ml/min) durante 5 minutos con una agitación constante de 45 rpm. Posteriormente, se

fueron añadiendo de forma sucesiva, y cada 5 minutos, los diferentes inhibidores de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y se registró el descenso de la concentración de oxígeno en la cámara con cada uno de ellos. En primer lugar se añadió 4 µg/ml de oligomicina, inhibidor del complejo V de la cadena respiratoria. A continuación, se añadió 1µM del desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial *carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona*, FCCP, repetidas veces hasta alcanzar el máximo desacoplamiento, determinando así la respiración máxima. Posteriormente, se añadió 2,5 µM de rotenona, inhibidor del complejo I, y 2,5 µg/ml de antimicina A, inhibidor del complejo III. Finalmente se añadió 1 mM de KCN, inhibidor del complejo IV. Tras bloquear completamente la cadena respiratoria mitocondrial, el valor de consumo de oxígeno medido, es decir, el no mitocondrial, se sustrajo a los resultados obtenidos anteriormente. Los datos se representaron como porcentaje de cada línea con respecto al control.

### 2.7.2. Respirometría de alta resolución

En el caso de los fibroblastos control, NHDF, y del paciente portador de una mutación en el gen *GATC* la medida de consumo de oxígeno mitocondrial se determinó mediante técnicas de respirometría de alta resolución utilizando un Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) y el programa DatLab4 (Oroboros Instruments) para el análisis de los datos (adquiriéndolos en intervalos de 1 segundo).

El día de la medida, las células se tripsinizaron y se contaron en una cámara *Neubauer*. A continuación, se resuspendieron en DMEM sin FBS a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se colocaron 2 ml en la cámara correspondiente para realizar la medida. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C y en agitación constante de 750 rpm. Se realizó la medida de consumo de oxígeno basal en células intactas (Cr, *intact Cells Routine respiration*) y se añadieron de forma consecutiva los mismos inhibidores citados en el apartado anterior, salvo KCN, pero a diferentes concentraciones. En primer lugar se añadió 2 µg/ml de oligomicina (CrO). A continuación 0,5 µM de FCCP (CrU) obteniéndose la medida de la capacidad respiratoria máxima. Posteriormente 0,1 µM de rotenona (CRot) y finalmente 2,5 µM de antimicina A (ROX, *Residual Oxygen Consumption*), con lo que se obtuvo la medida de la respiración no mitocondrial. Las medidas fueron normalizadas por el número de células y la respiración no mitocondrial (ROX) fue sustraída de cada una de ellas. Los datos se representaron como porcentaje del consumo de oxígeno del paciente con respecto al control.

### 2.8. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial

Para analizar el potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$  o MIMP) en los fibroblastos control y del paciente se empleó la sonda fluorescente tetrametilrodamina etil ester perclorato

(TMRE, Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con 100 nM TMRE en medio completo a 37°C durante 30 minutos y en oscuridad. A continuación, se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se recogieron<sup>192</sup>. Tras resuspender las células en medio DMEM, se analizaron mediante un citómetro de flujo Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter). La intensidad de fluorescencia media se determinó mediante el *software* MXP (Beckman Coulter). Como control, 10 minutos antes de añadir TMRE, se añadió a las células FCCP, agente despolarizante de la membrana mitocondrial.

### 2.9. Cuantificación de los niveles de ADNmt

Tras aislar el ADNg de las células tal y como se especifica en el apartado 2.3.1., la cuantificación relativa del ADNmt frente al ADNn se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real en multiplex utilizando el termociclador Applied Biosystems Step-One Plus real-time thermocycler (Applied Biosystems, ThermoFisher) como se ha descrito previamente<sup>193</sup>. Se cuantificó el ADNmt utilizando oligonucleótidos específicos del gen 12S ARNr (12S D y 12S R) descritos en el apartado 1.6.3 y la sonda TaqMan marcada con FAM (6FAM-5'TGCCAGCCACCGCG3'-MGB). Para la detección del ADNn se emplearon una pareja de oligonucleótidos y una sonda Taqman marcada con VIC contra el gen nuclear de la ARNasaP incluidos en el TaqMan RNaseP Control Reagent Kit (Applied Biosystems). La mezcla de reacción se realizó con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.10. Medida de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria

La medida de las actividades específicas de los complejos de la cadena respiratoria se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente<sup>194</sup> con modificaciones.

El extracto celular se preparó a partir de  $1,5 \times 10^7$  células que se resuspendieron en 400-800  $\mu$ l de tampón manitol: 225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl a pH 7,2. A continuación, las células se lisaron en frío mediante sonicación (2 ciclos de 15 segundos, con descanso de 45 segundos, a una amplitud de 15 micrones). La cantidad de proteína presente en el extracto se cuantificó mediante el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) y todas las muestras se llevaron a una concentración de 3 mg/ml.

Las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial fueron determinadas mediante espectrofotometría, utilizando el espectrofotómetro DU 800 de Beckman Coulter a una temperatura de 37°C. Todos los resultados se representaron como actividades específicas, teniendo en cuenta la cantidad de proteína utilizada y el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de cada compuesto.

- *Medida de la actividad NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I):*

La actividad del complejo I fue determinada monitorizando la disminución de la absorbancia a 340 nm que se produce debido a la oxidación del NADH ( $\epsilon=6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a  $\text{NAD}^+$ , que transfiere sus electrones a la decilubiquinona en el medio de reacción. Este medio contenía 50 mM tampón fosfato potásico pH 7,5, 100  $\mu\text{M}$  decilubiquinona y 3,75 mg/ml BSA, al cual se le añadieron, por duplicado, 300  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular. Tras añadir 100  $\mu\text{M}$  de NADH se registró la disminución de la absorbancia durante 3 minutos. A uno de los duplicados se le añadió desde un inicio 12,5  $\mu\text{M}$  de rotenona para valorar la actividad sensible a la rotenona, que se calculó substrayendo la actividad insensible a la rotenona de la total.

- *Medida de la actividad succinato deshidrogenasa (Complejo II):*

La actividad del complejo II se determinó monitorizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) ( $\epsilon=19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) midiendo la disminución de la absorbancia a 600 nm del DCPIP oxidado. El medio de reacción contenía 25 mM tampón fosfato pH 7,5, 20 mM succinato, 50  $\mu\text{M}$  DCPIP, 1 mM KCN y 2 mg/ml BSA. Se añadió 40  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular y tras medir la línea base, la actividad de la succinato deshidrogenasa se registró durante 3 minutos después de haber añadido 100  $\mu\text{M}$  de decilubiquinona que actúa como iniciador de la reacción.

- *Medida de la actividad ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III):*

La actividad del complejo III se midió registrando la aparición del citocromo c reducido ( $\epsilon=18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 550 nm, gracias a la presencia en el medio de reacción de decilubiquinol. Este medio contenía 25 mM tampón fosfato pH 7,5, 75  $\mu\text{M}$  citocromo c, 0,5 mM KCN, 0,1 mM EDTA y 0,025% (v/v) Tween-20. A continuación, se añadió por duplicado 20  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular y a una de las cubetas se añadió 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de antimicina A. Tras añadir 213  $\mu\text{M}$  de decilubiquinol, el incremento de la absorbancia se registró durante 3 minutos. Finalmente, la actividad ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa se calculó substrayendo la actividad insensible a la antimicina A de la actividad total.

- *Medida de la actividad citocromo c oxidasa (Complejo IV)*

Para valorar la actividad del complejo IV se midió la oxidación del citocromo c reducido ( $\epsilon=18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 550 nm en una solución que contenía 100  $\mu\text{M}$  de citocromo c (reducido entre el 90-95%) en 50 mM tampón fosfato pH 7,0 y 40  $\mu\text{g}$  de proteína del homogenado celular. La reacción se monitorizó durante 3 minutos.

### 2.11. Medida de la actividad citrato sintasa

La enzima de la matriz mitocondrial citrato sintasa es utilizada frecuentemente para valorar la masa mitocondrial de una muestra determinada. La actividad de esta enzima se determinó monitorizando el cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción de DTNB (ácido-5-5'ditio-bis-2-nitrobenzoico) ( $\epsilon=13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) con el coenzima A libre (CoA-SH) que previamente se ha formado en la reacción catalizada por la citrato sintasa a partir de oxalacetato. El medio de reacción contenía 100 mM Tris-HCl pH 8,1, 100  $\mu\text{M}$  DTNB, 0,1% Tritón X-100 y 300  $\mu\text{M}$  Acetil CoA, al que se le añadió 20  $\mu\text{g}$  del extracto total de proteína y 500  $\mu\text{M}$  oxalacetato para iniciar la reacción, la cual se monitorizó durante 4 minutos.

### 2.12. Inmunofluorescencia

Para los ensayos de colocalización de la proteína C6orf203 con la red mitocondrial se sembraron  $7 \times 10^4$  células de la línea HEK293T o HeLa sobre cristales cubreobjetos en placas p24 tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Al día siguiente las células se transfectaron con Lipofectamina 2000 (apartado 2.5) 0,8  $\mu\text{g}$  del plásmido pEGFPN1 en el que se había clonado previamente el ADNc de *C6orf203*, para generar la proteína de fusión C6orf203-GFP. 24 horas más tarde, tras confirmar en un microscopio de fluorescencia que las células mostraban fluorescencia verde (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*), las células se incubaron con 0,3  $\mu\text{M}$  MitoTracker Red CMXRos (Thermo Scientific) en medio completo durante 45 minutos a 37°C para teñir la red mitocondrial. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 20 minutos. Finalmente, tras realizar dos lavados con PBS se montaron los cristales sobre un portaobjetos con ProLong Gold (Molecular Probes). Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Carl Zeiss.

Para el ensayo de colocalización de la proteína C6orf203 con la proteína presente en los gránulos de ARN mitocondriales, GRSF1, se transfectó de nuevo la construcción C6orf203-GFP tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con tampón PBS y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 20 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS y las células fijadas se permeabilizaron durante 30 minutos usando 1% Tritón X-100 en PBS que contenía 3% BSA. Tras realizar un lavado con PBS, las células se incubaron 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-GRSF1 (Sigma-Aldrich)

diluido 1/250 en PBS-3%BSA. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 546. Finalmente, tras realizar dos lavados con PBS se montaron los cristales sobre un portaobjetos con ProLong Gold y las muestras se analizaron mediante microscopía confocal.

### 2.13. Análisis de proteínas

#### 2.13.1. Purificación de mitocondrias

La purificación de mitocondrias a partir de cultivos celulares se llevó a cabo mediante centrifugaciones diferenciales siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Vizarra y colaboradores<sup>195</sup>.

#### 2.13.2. Preparación de extractos totales o mitocondriales

Para la extracción de proteínas tanto de los sedimentos celulares (previamente lavados dos veces con PBS) como de las mitocondrias purificadas se utilizó el tampón RIPA que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5% deoxicolato, 1% Nonidet P40, 1 mM EDTA y 0,1% SDS al que se habían añadido previamente una mezcla de inhibidores de proteasas 1X (Complete EDTA free, Roche). En el caso de los extractos totales, las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de RIPA por cada  $3 \times 10^6$  células. Las mitocondrias se resuspendieron en 50-100  $\mu$ l de RIPA dependiendo de la cantidad obtenida. Tras incubar las muestras 20 minutos en hielo agitando con *vortex* cada 5 minutos, se centrifugaron a 14.000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Finalmente se procedió a medir la concentración de proteína mediante Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.13.3. Tratamiento alcalino con $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Mediante esta técnica se consiguió separar la fracción soluble mitocondrial (matriz y espacio intermembrana) de la fracción de membrana.

A partir de  $4 \times 10^7$  células HEK293T que corresponden a aproximadamente 3 placas p150 a un 80-90% de confluencia, se purificaron las mitocondrias como se describe en el apartado 2.13.1. A continuación, se resuspendieron en tampón MB (10 mM HEPES-KOH pH 7,4, 70 mM sacarosa, 210 mM manitol, 1 mM EDTA) al que se le añadió 0,1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 11 y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, se pasaron a tubos de 1,5ml Microfuge® Tube, Polypropylene (Beckman Coulter, ref. 357448) y se centrifugaron a 100.000g en un rotor TLA100.3 (Beckman) a 4°C durante 30 minutos para separar las proteínas de membrana (sedimento) de las solubles (sobrenadante). Este sobrenadante se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 25%. Para ello, al sobrenadante se le añadió un volumen de TCA al 50% y se incubó 10 minutos en

hielo. A continuación la muestra se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad y se realizaron dos lavados con acetona a 4°C.

Las proteínas precipitadas, correspondientes a las proteínas mitocondriales solubles, y el sedimento, correspondiente a las proteínas de la membrana mitocondrial, se resuspendieron en tampón Laemmli 1X y se analizaron mediante *Western blot* (apartado 2.13.5) utilizando los anticuerpos correspondientes.

#### **2.13.4. Localización submitocondrial de proteínas mediante el tratamiento con proteinasa K**

Tras la purificación de las mitocondrias de las células HEK293T se procedió al análisis de la localización submitocondrial de C6orf203 mediante el tratamiento con proteinasa K siguiendo el protocolo descrito en<sup>73</sup> con algunas modificaciones. Todos los pasos se realizaron en hielo.

Las mitocondrias se resuspendieron a una concentración final de 0,5 µg/µl de proteína en el tampón MB (10 mM HEPES-KOH pH 7,4, 70 mM sacarosa, 210 mM manitol, 1 mM EDTA), en tampón de *swelling* o hinchamiento (10 mM HEPES-KOH pH 7,4) para conseguir la ruptura de la membrana mitocondrial externa, o en tampón MB suplementado con 0,5% (v/v) Tritón X-100 para facilitar la disgregación de las membranas mitocondriales. Las muestras en el tampón MB + Triton X-100 se incubaron 30 minutos mientras que la incubación de las muestras en el tampón de hinchamiento fue de 10 minutos. A continuación, se añadió la proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml y se incubó durante 20 minutos en hielo. La digestión de la proteinasa K se inhibió mediante la adición del inhibidor de proteasas PMSF (2 mM). Finalmente, tras la precipitación de las proteínas con TCA al 25%, las muestras fueron analizadas por *Western blot* (apartado 2.13.5).

#### **2.13.5. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (*Western blot*)**

Para la separación de proteínas en condiciones desnaturizantes y posterior transferencia se utilizó el sistema Mini-PROTEAN® 3 cell (BioRad). Entre 50 y 100 µg de proteína de cada extracto total o mitocondrial se resuspendieron en buffer Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol), se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente o 5 minutos a 95°C, dependiendo de la hidrofobicidad de las proteínas a analizar, y se cargaron en geles al 10% o al 12% de poliacrilamida. La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó a un voltaje constante de 80 V en tampón Tris-glicina/SDS (25mM Tris pH 8,3, 125 mM glicina, 0,01% SDS) hasta la salida del frente iónico de migración. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore) en tampón de transferencia (Tris-glicina con 20% metanol) a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora a 4°C. A continuación, las membranas se incubaron en solución de bloqueo TBS-T/leche (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM



NaCl, 0,1% Tween 20 y 5% leche desnatada en polvo) una hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (apartado 1.7.1) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con tampón TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, 0,1% Tween 20) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con tampón TBS-T y se procedió a revelar la señal de quimioluminiscencia con películas autorradiográficas o con el analizador de imágenes ChemiDoc MP (BioRad). Como reactivo de revelado se utilizó 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 1,25 mM Luminol, 0,2mM ácido p-cumárico y 0,03% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El análisis densitométrico de las señales se realizó en el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) y se expresó como unidades relativas a la línea control.

Para analizar la recuperación de las proteínas mitocondriales tras el tratamiento con el inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol, los fibroblastos se crecieron durante seis días con este antibiótico a una concentración de 50 µg/ml. A continuación, las células se crecieron en medio completo sin cloranfenicol y se recogieron a las 10, 16, 24 y 48 horas después de la retirada del antibiótico. Finalmente se realizó *Western blot* como se ha detallado anteriormente.

### 2.14. Electroforesis nativa azul (*Blue native electrophoresis, BN-PAGE*)

Con el objetivo de separar los complejos proteicos de la cadena respiratoria mitocondrial en su conformación nativa se realizó una electroforesis nativa azul en una primera dimensión (1D-BN-PAGE). Posteriormente, las subunidades que componen dichos complejos se pueden separar en una segunda dimensión realizando una electroforesis en condiciones desnaturizantes (2D-BN/SDS-PAGE). Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por el Dr. Leo G.J. Nijtmans<sup>196</sup> con algunas modificaciones. Brevemente, para la obtención de una fracción enriquecida en mitocondrias, se trataron 15x10<sup>6</sup> células con digitonina a una concentración de 2 mg/ml en PBS durante 10 min y posteriormente se solubilizaron los supercomplejos mitocondriales con un detergente suave como es la digitonina a una concentración de 4g/g (4 gramos de digitonina por gramo de proteína) durante 10 minutos. En otros casos, se solubilizaron los complejos con 2% n-dodecil-β-D-maltósido, un detergente más fuerte. Se separaron entre 40 y 80 µg de cada extracto en geles nativos de poliacrilamida con un gradiente del 4 al 15%. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF a voltaje constante de 30 V durante toda la noche y se incubaron con los anticuerpos correspondientes. El análisis densitométrico de las señales se realizó en el programa ImageJ y se expresó como unidades relativas a la línea control.

### 2.14.1. Geles bidimensionales

Para los experimentos de 2D BN/SDS-PAGE se cortó con un bisturí cada carril del gel de 1D-BN-PAGE y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con solución acuosa desnaturalizante que contenía 1% SDS y 1%  $\beta$ -mercaptoetanol. A continuación el carril se rotó 90° y se colocó sobre un gel desnaturalizante al 12% de poliacrilamida para a continuación llevar a cabo la electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de PVDF, que se incubaron con los anticuerpos correspondientes.

### 2.15. Análisis del ensamblaje de los ribosomas mitocondriales con gradiente de sacarosa

Se recogieron alrededor de  $2,4 \times 10^7$  células de la línea HEK293T en PBS suplementado con 10 mM  $MgCl_2$ . Tras centrifugar las células 5 minutos a 300 g, se lisaron en 300  $\mu$ l del tampón de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 10 mM  $Mg(CH_3COO)_2$ , 40 mM  $NH_4Cl_2$ , 100 mM KCl, 1mM del inhibidor de proteasas PMSF y 1% n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido. Se dejaron 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 14.000g durante 20 min a 4°C. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron con el kit Pierce BCA y se cargaron 800  $\mu$ g de proteína en un volumen de 200  $\mu$ l sobre 4 ml de un gradiente continuo de sacarosa del 10% al 30% (p/v). A continuación se centrifugó a 74.000 g durante 6 horas en un rotor basculante MLS-50 (Beckman Coulter). Posteriormente, se recogieron 15 fracciones de 250  $\mu$ l cada una, las proteínas se precipitaron con TCA al 25% y se analizaron mediante *Western blot* (apartado 2.13.5).

### 2.16. Biosíntesis de las proteínas mitocondriales *de novo*

El marcaje de la proteínas mitocondriales sintetizadas *de novo* se realizó siguiendo el protocolo descrito en<sup>197</sup>. Se marcaron  $4 \times 10^5$  células en placas p35 de la línea HEK293T y  $6 \times 10^5$  células en placas p100 en el caso de los fibroblastos con 200  $\mu$ Ci/ml de los aminoácidos radiactivos L- $[^{35}S]$ -Metionina y L- $[^{35}S]$ -Cisteína en medio DMEM sin metionina ni cisteína (Gibco, Life technologies). Este medio se suplementó con 100  $\mu$ g/ml de emetina, un inhibidor de la síntesis de proteínas citoplasmáticas. Tras 90 minutos de incubación, las células se lavaron con PBS y se levantaron con tripsina, para posteriormente extraer las proteínas en 30  $\mu$ l de tampón RIPA (ver apartado 2.13.2).

Para el análisis de las proteínas marcadas se cargaron entre 50 y 100  $\mu$ g de proteínas en geles al 17,5% de poliacrilamida (37,5:1 BioRad) y se realizó la electroforesis a un amperaje constante de 20 mA durante alrededor de 6 horas. A continuación, los geles se incubaron en solución de fijación (30% metanol y 10%  $CH_3COOH$ ) durante 30 minutos y después en una solución que contenía 20% polietilenglicol 400 (Sigma-Aldrich) y 50% metanol en el amplificador de señal Amplify™ (GE Healthcare) durante 15 minutos. Los geles se secaron durante 2 horas a 75°C en un “seca geles” (modelo 583, BioRad). Finalmente, las proteínas mitocondriales marcadas se visualizaron mediante

autorradiografía o se cuantificaron utilizando un Typhoon Trio phosphorimager system (GE Healthcare).

### 2.17. Inmunoprecipitación de C6orf203-Flag

La inmunoprecipitación de C6orf203-Flag con el anticuerpo anti-Flag se llevó a cabo utilizando el “FLAG Immunoprecipitation Kit” (Sigma Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante salvo ligeras modificaciones. A partir de  $1,8 \times 10^8$  células (aproximadamente 15 placas p150) de la línea HEK293T que sobreexpresa C6orf203-Flag y de las HEK293T como control negativo, se purificaron las mitocondrias por centrifugaciones diferenciales (apartado 2.13.1). A continuación se lisaron en 250  $\mu$ l de tampón 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1X de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) y 0,5% de n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido. La fracción mitocondrial se incubó 20 minutos en hielo y se centrifugó a 16.000g durante 15 minutos. Tras cuantificar la cantidad de proteína presente en el sobrenadante, que corresponde al extracto mitocondrial total, se guardaron 50  $\mu$ g. A continuación, el lisado restante se incubó en rotación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-Flag unido a la resina de agarosa. Se realizaron tres lavados con 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl para eliminar las proteínas no unidas al anticuerpo y finalmente se realizó la elución de C6orf203-Flag, con sus interactores, utilizando 150 ng/ $\mu$ l del péptido Flag que incluye el propio kit. Las proteínas presentes en el eluido se identificaron mediante espectrometría de masas.

### 2.18. Identificación de biotina dependiente de la proximidad (*proximity-dependent biotin identification* (BioID))

La región codificante de C6orf203 se amplificó mediante RT-PCR a partir de ARN total de HEK293T y los oligonucleótidos que se especifican en el apartado 1.6.6. Tras digerir tanto el inserto como el vector MCS-BioID2-HA con las enzimas de restricción AgeI y BamHI (New England Biolabs), se procedió a la ligación, transformación de *E.coli* DH5 $\alpha$ , selección de colonias transformantes y purificación del plásmido (MCS-C6orf203-BioID2-HA) (apartado 2.2.2). A continuación, la fusión de C6orf203 al dominio biotinil transferasa (C6orf203-BioID2-HA) se extrajo del plásmido y se clonó en el vector pIRESpuro2, para así conseguir un vector de expresión estable en células HEK293T (pIRESpuro2::C6orf203-BioID2-HA). Cabe destacar, que el vector inicial MCS-BioID2-HA tiene una resistencia en células eucariotas a neomicina, no pudiéndose seleccionar células HEK293T transfectadas con este plásmido debido a que esta línea celular ya es resistente a este antibiótico.

Tras la transfección con lipofectamina 2000 de HEK293T con el vector pIRESpuro2::C6orf203-BioID2-HA y posterior selección con puromicina, se llevó a cabo el

experimento siguiendo el protocolo que se describe en<sup>198</sup> incubando  $6 \times 10^7$  células con 50  $\mu\text{M}$  de biotina durante 24 horas. En el último paso, donde todas las proteínas biotiniladas ya se han unido a la resina de estreptavidina, éstas se proteolizaron añadiendo 1  $\mu\text{g}$  de lisozima C y 1  $\mu\text{l}$  de tripsina y los péptidos liberados se analizaron mediante espectrometría de masas.

### 2.19. *Complexome profiling*

El experimento de *Complexome profiling* para analizar el perfil de migración en condiciones nativas de C6orf203 se realizó en *Nijmegen Center for Mitochondrial diseases* (Países Bajos) gracias a la colaboración con el Dr. Leo G. Nijtmans y se desarrolló tal y como se indica en<sup>199</sup>.

### 2.20. Búsqueda *in silico* de genes candidatos para la realización del estudio

La identificación de los ARNm de *Drosophila melanogaster* anotados como bicistrones se llevó a cabo mediante el análisis de la base de datos del genoma de *Drosophila* Flybase (<http://flybase.org/>). Tras analizar la localización genómica y estructura de los bicistrones y confirmar su correcta anotación, se seleccionaron un primer grupo de genes de función desconocida conservados evolutivamente y con ortólogos en humanos. A continuación, se realizó un análisis *in silico* de las proteínas en los programas de predicción de destino mitocondrial MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)<sup>200</sup>, TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)<sup>201</sup>, PSORT II (<http://ipsort.hgc.jp/>)<sup>202</sup> y Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>)<sup>203</sup>. Asimismo, se realizó la búsqueda de las proteínas potencialmente mitocondriales en MitoCarta tanto de humanos (<https://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/human.mitocarta.html>) como de ratón (<https://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/mouse.mitocarta.html>)<sup>155</sup>. También se analizó la distribución de las proteínas seleccionadas en distintos tejidos y su localización subcelular en Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org))<sup>204</sup>.

Para la identificación de dominios conservados en estas proteínas se utilizaron los programas informáticos Prosite (<http://prosite.expasy.org/>)<sup>205</sup>, NCBI conserved domain database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)<sup>206</sup> e Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)<sup>207</sup>.

### 2.21. Edición genómica de C6orf203 mediante el sistema CRISPR/Cas9

Para la construcción de los plásmidos y utilización del sistema CRISPR/Cas9 se siguió el protocolo de Cong y colaboradores<sup>187</sup> con algunas modificaciones.

### 2.21.1. Diseño de los ARN guía

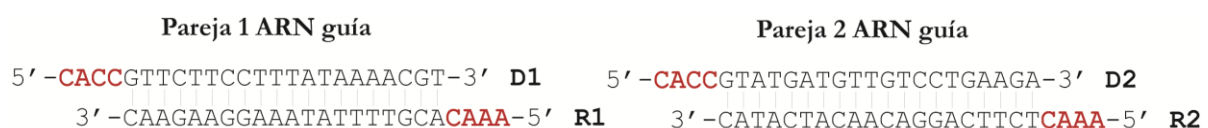
Para el diseño de los ARN guía se utilizó el programa informático E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) desarrollado por el laboratorio del Dr. Boutros<sup>208</sup>. Para ello se introdujo en este programa la secuencia del exón 2 de *C6orf203* que era la región deseada para generar la edición del gen. Se seleccionaron los dos ARNg con mejor puntuación, es decir, aquellos con completa homología con la secuencia diana y menor probabilidad de unión en sitios distintos a la diana (*off-targets*). Además, puesto que la proteína Cas9 procede de *S.pyogenes*, se seleccionaron aquellos que tuviesen como motivo adyacente al protoespaciador en su extremo 3' (PAM, *protospacer adjacent motif*) la secuencia de nucleótidos NGG, siendo N cualquiera de los 4 nucleótidos.

Las secuencias de los oligonucleótidos que se seleccionaron para la generación de los ARNg aparecen en el apartado 1.6.9 del apartado Materiales.

A la hora de diseñar los ARNg también se añadió a los oligonucleótidos la diana de restricción de la enzima BbsI para poder clonarlos en el vector PX335 y se creó la cadena complementaria de cada uno para poder llevar a cabo el anillamiento de los mismos (Figura 7).

### 2.21.2. Anillamiento de los oligonucleótidos para la generación de los ARN guía

Para el anillamiento de las parejas de ARNg D1 con R1 y D2 con R2 (ver apartado 1.6.9), se utilizaron 3 nmoles de cada oligonucleótido y se llevó a un volumen final de 50 µl en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) suplementado con 50mM NaCl. Se calentó la muestra a una temperatura de 95°C durante 5 minutos y a continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente, con el objetivo de que fuese disminuyendo muy lentamente la temperatura y favorecer el anillamiento (Figura 7). Para confirmar el anillamiento de los ARNg se cargaron 8 µl (0,96 nmoles) de cada pareja en un gel al 8% de poliacrilamida (19:1, BioRad). La electroforesis se realizó en tampón TBE 1X (90mM Tris-borato, 2mM EDTA) a un amperaje constante de 15mA.



**Figura 7. Esquema de anillamiento para la formación de los ARN guía.** En rojo se destaca la diana de restricción de la enzima BbsI. D1 y R1 hacen referencia a los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente para formar el ARN guía 1. D2 y R2 hacen referencia a los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente para formar el ARN guía 2.

### 2.21.3. Clonaje de los ARN guía en el vector pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh hSpCas9n(D10A)

En primer lugar, se llevó a cabo la digestión de 2 µg del plásmido PX335 con 10U de la enzima de restricción BbsI (*New England Biolabs, R0539S*) en un volumen final de 50 µl de tampón 1X NEB 2.1. A continuación, la mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Finalmente, tras

resolver la digestión en un gel al 1% agarosa se recortó y purificó la banda única como se describe en el apartado 2.2.2 y se cuantificó en un *Nanodrop*.

La ligación de cada ARNg con el PX335 digerido se realizó con el kit comercial *Quick ligation kit* (*New England Biolabs*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de incubar la mezcla de reacción 5 min a 25°C, se procedió a transformar las bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  que finalmente se sembraron en cantidades crecientes en placas de LB suplementadas con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Para identificar los transformantes positivos se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de colonias de cada transformación con los oligonucleótidos indicados en el apartado 1.6.11 y se resolvieron en geles al 3,5% de agarosa. Cuatro de las colonias positivas se crecieron en LB líquido con ampicilina 16 horas a 37°C con agitación. Finalmente se obtuvo el ADN plasmídico a pequeña escala (mini-prep) tal y como se indica en 2.2.3 y se secuenció en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” utilizando los mismos oligonucleótidos citados anteriormente.

Los plásmidos resultantes se denominaron PX335::ARNg1 y PX335::ARNg2, según portase el ARN guía 1 o 2.

#### **2.21.4. Cotransfección de PX335::ARNg1 y PX335::ARNg2**

Se contransfectaron 2  $\mu$ g de cada plásmido utilizando Lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Ver apartado 2.5.

#### **2.21.5. Aislamiento de clones**

Tras las 48 horas de la transfección se purificó el ADN de las células como se indica en el apartado 2.3.1 y se realizó una PCR con oligonucleótidos que flanquean la zona donde anillan los ARNg (apartado 1.6.7) y donde, por tanto, se habrá producido la edición genómica. Las condiciones de la PCR fueron: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 59°C y 1 minuto a 72°C, posteriormente 10 minutos a 72°C y un paso final a 4°C.

Una vez confirmada la presencia significativa de deleciones e inserciones sobre el conjunto celular, se llevó a cabo el aislamiento de clones. Para ello, se sembraron 40 células en tres placas p100 tratadas con poli-L-Lisina. Ocho horas más tarde se seleccionaron las células individuales adsorbidas a la placa y aisladas. Cuando los clones adquirieron un tamaño suficiente para su expansión se levantaron utilizando cilindros de clonaje (Sigma-Aldrich, C1059) y se pasaron a placas p35.

#### **2.21.6. Caracterización de la edición genómica**

Tras el crecimiento de los diferentes clones, se aisló el ADNg de 12 de ellos en primer lugar y se analizó la edición genómica mediante PCR utilizando los oligonucleótidos citados en el apartado

1.6.7 y con las condiciones explicadas en el apartado anterior. El tamaño de los fragmentos se analizó en geles al 3,5% de agarosa, se purificaron las distintas bandas, se clonaron en el vector pGEMT-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante y, finalmente, 10 de las colonias se secuenciaron con los oligonucleótidos universales que aparecen en el apartado 1.6.11.

## *Resultados*

---



## 1. Estudio molecular de una mutación en el gen *GATC* en fibroblastos de un paciente portador

En este primer apartado se describen los resultados obtenidos del estudio molecular realizado en fibroblastos primarios obtenidos a partir de una biopsia de piel de un paciente portador de una mutación en el gen *GATC*.

### 1.1. Antecedentes

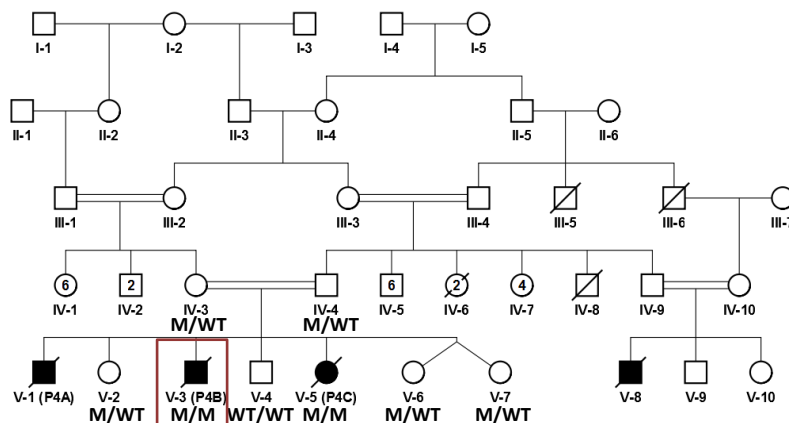
Como ya se ha comentado en el apartado anterior, en un proyecto desarrollado previamente en nuestro laboratorio se observó que el ARNm que codifica la proteína PolyB en *Drosophila melanogaster* presenta en su región 5'UTR una ORF que codifica una proteína implicada en la traducción mitocondrial, GatC. Este ARNm bicistrónico está organizado de tal manera que el codón de terminación de GatC solapa con el inicio de la traducción de PolyB (AUGA) (Figura 6, Introducción). En el proyecto mencionado se observó que las subunidades GATA, GATB y GATC que constituyen la enzima heterotrimérica glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa (GatCAB) se encuentran en la mitocondria, y que esta actividad es esencial para la traducción mitocondrial *in vivo* en mamíferos. Tal y como se describe en el apartado 2.2.3.1 de la introducción (Figura 4), debido a que en mitocondrias no existe la glutaminil-ARNt sintetasa (QARS2), el ARNt<sup>Gln</sup> mitocondrial es aminoacilado con ácido glutámico por la glutamil-ARNt sintetasa mitocondrial (EARS2). A continuación, el Glu-ARNt<sup>Gln</sup> es convertido a Gln-ARNt<sup>Gln</sup> por una reacción amidotransferasa llevada a cabo por la enzima GatCAB, que utiliza la glutamina como donante de amidas.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral la Dra. Hagit N. Baris del Instituto de Genética del *Rambam Health Care* Campus, en Haifa (Israel) nos remitió fibroblastos derivados de piel de un paciente portador de una mutación en el gen *GATC* para su caracterización molecular.

### 1.2. Cuadro clínico del paciente portador de la mutación en *GATC*

El paciente (V-3, P4B) era un varón de origen Druso, de familia consanguínea de cuarto grado que falleció a los pocos meses de vida (Figura 8). El desarrollo fue normal hasta los 2 meses de edad, momento en el que desarrolló cianosis y dificultad respiratoria, llegando a necesitar ventilación mecánica. Los resultados de la ecocardiografía revelaron una cardiomiopatía hipertrófica y dilatada. Los estudios metabólicos mostraron una acidosis severa, con niveles altos de lactato en suero. El paciente también presentaba un aumento en los niveles de creatina fosfoquinasa y un aumento en las enzimas hepáticas AST, ALT y LDH. Los niveles de alanina también eran elevados, al igual que los niveles de lactato y cetonas en la orina. Tras varios episodios de cianosis y fallo respiratorio el paciente falleció. Se obtuvo una biopsia muscular para los estudios

mitocondriales. En los primeros estudios se observó que la actividad piruvato deshidrogenasa no se encontraba afectada.

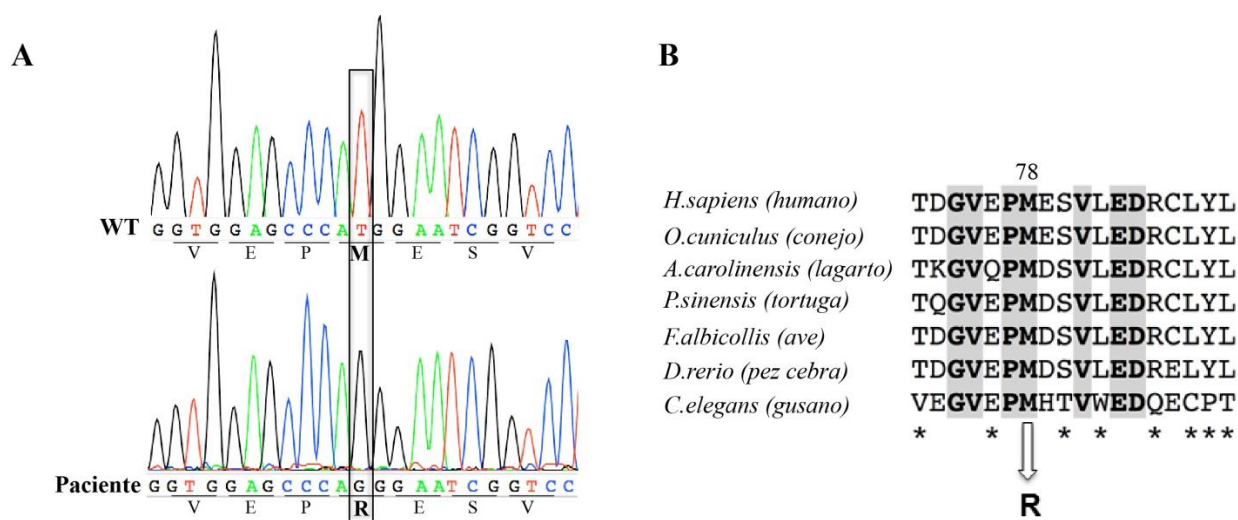


**Figura 8. Pedigrí de la familia portadora de la mutación en el gen *GATC*.** Se puede observar que el patrón de herencia es autosómico recesivo. El rectángulo rojo destaca el paciente de estudio. M: alelo mutado. WT: alelo silvestre.

### 1.3. Análisis por secuenciación directa del gen *GATC* en los fibroblastos del paciente de estudio

Para confirmar el resultado obtenido por secuenciación masiva realizada en el Instituto de Genética del centro previamente mencionado, se diseñó un ensayo de PCR para amplificar y secuenciar la región de la mutación en el gen *GATC* en los fibroblastos del paciente (Figura 9).

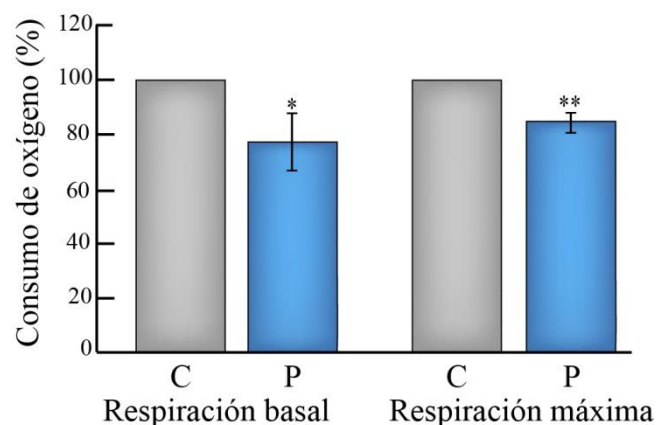
El análisis corroboró la mutación observada por secuenciación masiva, en el que se observa un cambio en homocigosis en el exón 2 de *GATC* del nucleótido c.233T>G que da lugar a un cambio de aminoácido p.M78R (Figura 9A). Como muestra el alineamiento de diferentes proteínas de las diferentes especies, la variante afecta a un aminoácido conservado a lo largo de la evolución y el programa PolyPhen2<sup>209</sup> predice que este cambio es altamente patogénico (*score* de 0,997) (Figura 9B).



**Figura 9. Secuenciación de la mutación en *GATC* en el paciente y en la línea control. (A)** Análisis por secuenciación Sanger de la región donde se localiza la mutación en el gen *GATC*. En el panel superior se muestra la secuenciación en los fibroblastos control, NHDF (WT). En el panel inferior se muestra la secuenciación en los fibroblastos del paciente. El rectángulo negro detalla el cambio de nucleótido, timina (T) en el control y guanina (G) en el mutante, el cual general un cambio de aminoácido: de metionina (M) en el control a arginina (R) en el paciente. Se puede observar que este cambio se encuentra en homocigosis ya que se observa un solo pico en la secuenciación. **(B)** Comparación de secuencias en diferentes especies mediante la herramienta informática *Clustal Omega* (EMBL-EBI: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de la región de la proteína *GATC* donde se encuentra la mutación. Los aminoácidos conservados en todas las especies representadas se indican en *negrita* y sombreados en gris mientras que aquellos conservados en 6 de las 7 especies se indican con un asterisco (\*). Se destaca el aminoácido metionina que se encuentra en la posición 78 en la proteína *GATC* humana que cambia a arginina en el paciente. Las referencias de Uniprot-KB de las diferentes proteínas son: O43716 (*Homo sapiens*), G1SY25 (*Oryctolagus cuniculus*), H9G6S2 (*Anolis carolinensis*), K7FWB7 (*Pelodiscus sinensis*), U3JYN4 (*Ficedula albicollis*), A2BHB7 (*Danio rerio*), Q9BI40 (*Caenorhabditis elegans*).

#### 1.4. Medida del consumo de oxígeno

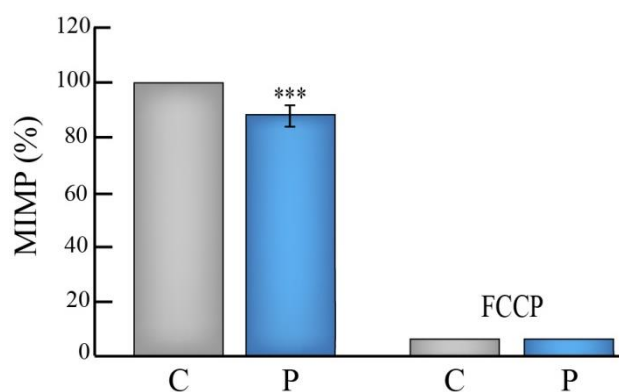
En primer lugar, para determinar si la mutación p.M78R podría estar afectando a la maquinaria del metabolismo del ADNmt y, por tanto, a la cadena transportadora de electrones, alterando así a la respiración mitocondrial, procedimos a medir tanto la respiración basal como máxima en los fibroblastos control, NHDF, y los fibroblastos del paciente. Para ello, medimos la respiración mitocondrial por respirometría de alta resolución (Figura 10). Los resultados mostraron que tanto la respiración basal como la capacidad máxima respiratoria (tratando las células con el desacoplante de la cadena respiratoria FCCP) estaban reducidas un 22% y un 16,7% respectivamente en los fibroblastos del paciente comparados con la línea control. Estos datos confirman una afectación moderada aunque significativa de la función mitocondrial en este sistema celular como consecuencia de la mutación en el gen *GATC*.



**Figura 10. Medida del consumo de oxígeno por respirometría de alta resolución.** Las medidas del consumo de oxígeno (pmoles de  $O_2$ /min) se realizaron en  $2 \times 10^6$  células. Se muestra tanto la respiración basal como la respiración máxima tras añadir FCCP. Los valores se expresan como porcentaje de las medidas de los fibroblastos procedentes del paciente (P) con respecto a la línea control NHDF (C) y representan las medias  $\pm$  DE (n=5). El grado de significación estadística se muestra como \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

### 1.5. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial

Como ya se ha comentado anteriormente, la transferencia de electrones a través de los distintos complejos de la CR está acoplada a un bombeo de protones por los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando así un gradiente electroquímico a través de la MIM, conocido también como potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Psi_m$ ) o MIMP. La medida de este potencial, por tanto, correlaciona con la función de la CR, viéndose disminuido cuando hay un descenso del flujo de electrones a través de la CR con la consiguiente disminución del bombeo de protones. Es importante destacar que en una situación de disfunción extrema de la CR, como es el caso de las células  $g^0$  que carecen de ADNmt, el MIMP es aproximadamente el 60-65% de la línea salvaje (observación personal). Por este motivo, y con el objetivo de continuar el estudio de la función mitocondrial de los fibroblastos del paciente, cuantificamos el MIMP tanto en la línea control como en los fibroblastos procedentes del paciente mediante citometría de flujo. Para ello utilizamos TMRE, una sonda fluorescente dependiente del potencial (Figura 11). Los resultados mostraron una disminución significativa de alrededor del 14% en los fibroblastos portadores de la mutación con respecto al control. Al añadir FCCP observamos cómo en ambas líneas el potencial de membrana desaparece. Estos datos confirman de nuevo una afectación de la función mitocondrial producida por una mutación en el gen *GATC*.



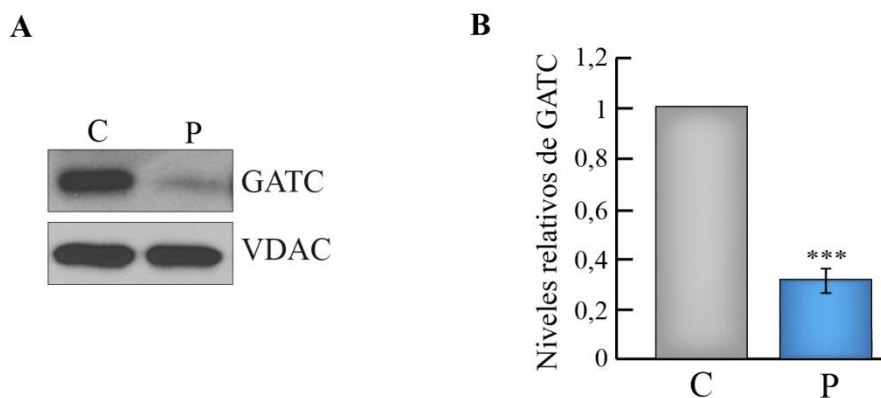
**Figura 11. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial.** Las medidas del MIMP se realizaron por citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente TMRE. Los valores se expresan como porcentaje de las medidas de los fibroblastos procedentes del paciente (P) con respecto a la línea control NHDF (C) y representan las medias  $\pm$  DE (n=8). El MIMP se disipó utilizando FCCP. El grado de significación estadística se muestra como \*\*\* $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

#### 1.6. Medida de la producción de ATP, especies reactivas del oxígeno (ROS), lactato y actividad de los complejos de la cadena respiratoria.

Continuando con la caracterización funcional de los fibroblastos del paciente medimos la síntesis de ATP total, citosólica y mitocondrial así como la producción de ROS mitocondriales y la producción de lactato. También cuantificamos la actividad de los complejos I, II, III y IV de la CR, utilizando la actividad de la enzima mitocondrial citrato sintasa como medida de la masa mitocondrial. En ningún caso observamos diferencias significativas entre ambas líneas (datos no mostrados).

#### 1.7. Análisis de los niveles de la proteína GATC

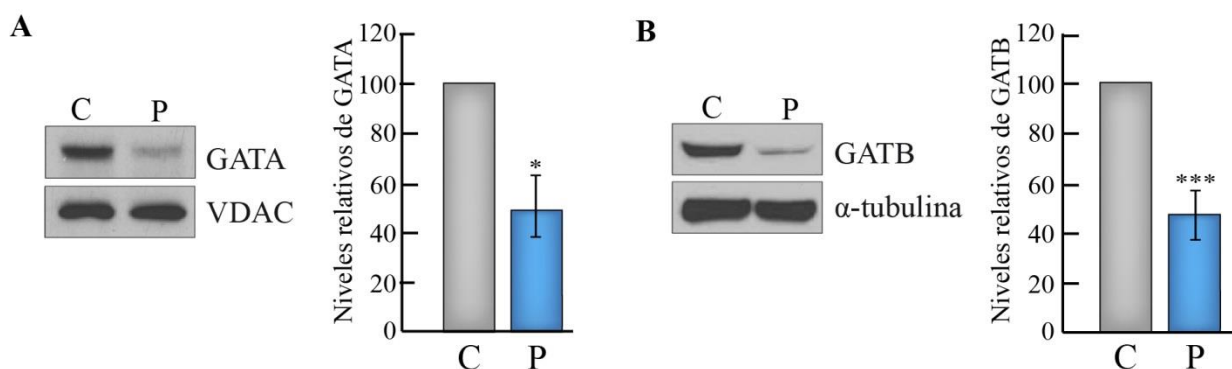
Como hemos observado en la Figura 9 el aminoácido metionina en la posición 78 es un residuo conservado a lo largo de la evolución, sugiriendo que podría tener un papel importante en la función de la misma. Con el objetivo de analizar el efecto de la mutación p.M78R en los niveles de GATC, los extractos proteicos mitocondriales tanto de la línea control como de los fibroblastos afectados se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) seguida de *Western blot* utilizando un anticuerpo específico que reconoce a esta proteína (Figura 12A). Los resultados mostraron que la mutación en los fibroblastos del paciente produce una disminución muy marcada, de alrededor del 70%, de los niveles estacionarios de GATC. La cuantificación de las señales de cinco experimentos independientes y su normalización respecto al control de carga VDAC revelaron una disminución de la proteína GATC en los fibroblastos del paciente estadísticamente significativa, sugiriendo que la mutación pueda estar provocando una caída en la estabilidad de la proteína (Figura 12B).



**Figura 12. Cuantificación mediante *Western blot* de los niveles de la proteína GATC en la línea control y en los fibroblastos portadores de una mutación en *GATC*.** (A) Se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% 50  $\mu$ g de proteínas procedentes de mitocondrias purificadas. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de GATC tanto en los fibroblastos control (C) como en los del paciente (P). Como control de carga se utilizó la proteína mitocondrial VDAC. (B) Densitometría de las señales de cinco experimentos independientes. Los valores se normalizaron respecto al control de carga VDAC. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea relativizada frente a la línea control. El grado de significación estadística se muestra como \*\*\* $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

### 1.8. Análisis de los niveles estacionarios de las proteínas GATA y GATB

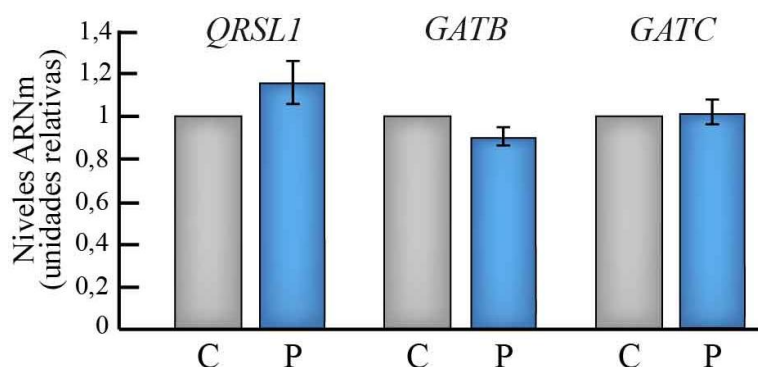
Dado que la actividad glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa es llevada a cabo por la enzima heterotrimérica GATA-GATB-GATC (GatCAB) y la mutación p.M78R en GATC que porta el paciente causa una disminución en los niveles estacionarios de esta proteína, nuestra siguiente aproximación fue analizar los niveles de las otras dos subunidades que constituyen la enzima: GATA y GATB. Los extractos proteicos mitocondriales en el caso de GATA y extractos proteicos totales en el caso de GATB, se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (Figura 13). En ambos casos observamos que la falta de GATC provoca una caída significativa de alrededor del 50% de GATA y GATB con respecto a la línea control. Estos datos podrían sugerir que una disminución de la subunidad GATC esté provocando una desestabilización del trímero GatCAB y que ello conduzca a la degradación o al aumento de la inestabilidad del resto de subunidades que conforman la enzima.



**Figura 13. Cuantificación mediante *Western blot* de los niveles de las proteínas GATA y GATB en la línea control y en los fibroblastos portadores de una mutación en *GATC*.** (A) Se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% 50  $\mu$ g de proteínas procedentes de mitocondrias purificadas. En el panel de la izquierda se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de GATA tanto en los fibroblastos control (C) como en los del paciente (P). Como control de carga se utilizó la proteína mitocondrial VDAC. En el panel de la derecha se muestran los resultados de la densitometría de las señales de tres experimentos independientes. Los valores se normalizaron respecto al control de carga VDAC. (B) Se separaron 50  $\mu$ g de proteínas procedentes de extracto celular total mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. En el panel de la izquierda se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de GATB tanto en los fibroblastos control (C) como en los del paciente (P). Como control de carga se utilizó la proteína citoplasmática  $\alpha$ -tubulina. En el panel de la derecha se muestran los resultados de la densitometría de las señales de cinco experimentos independientes. Los valores se normalizaron respecto al control de carga  $\alpha$ -tubulina. En ambos casos los datos se representan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea relativizada frente a la línea control. El grado de significación estadística se muestra como \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

### 1.9. Análisis de los niveles de los ARNm de *QRSL1*, *GATB* y *GATC*

Para descartar que la disminución en los niveles de estas proteínas pudiera ser el resultado de un efecto regulador sobre la expresión de los genes *QRSL1* (que codifica la proteína GATA), *GATB* y *GATC*, analizamos los niveles de sus ARNm. Para ello realizamos RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos. Los resultados mostraron que la disminución de los niveles de proteína observados no estaba causada por una disminución en la transcripción de los genes correspondientes con respecto a la línea control (Figura 14).

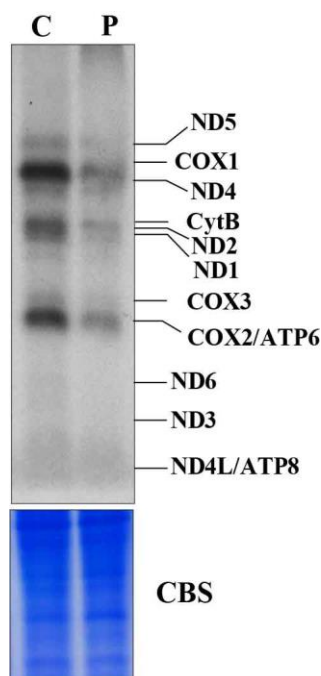


**Figura 14. Análisis de los niveles de los ARNm de *QRSL1*, *GATB* y *GATC* en la línea control y los fibroblastos portadores de una mutación en *GATC*.** Se muestran los resultados obtenidos de la RT-PCR cuantitativa de los ARNm de *QRSL1*, *GATB* y *GATC* utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos tanto en la línea control (C) como en los fibroblastos del paciente (P). Los niveles de ARNm se normalizaron frente a los niveles del control endógeno *HPRT1* y los datos se representan como la media  $\pm$  DE de cada línea relativizada frente a la línea control.

Estos datos corroboran que la estabilidad de las proteínas GATA y GATB se ve disminuida como consecuencia de la disminución de los niveles estacionarios de GATC.

### 1.10. Análisis de la síntesis de las proteínas mitocondriales *de novo*

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la disminución en los niveles de las subunidades que constituyen la enzima GatCAB podría estar causando algún efecto en la síntesis *de novo* de las proteínas codificadas en el ADNmt. Para ello se marcaron *in vivo* los productos de la traducción mitocondrial incubando las células con metionina marcada con el radioisótopo  $^{35}\text{S}$  en presencia de un agente bloqueante de la traducción citoplasmática como es la emetina (ver apartado Materiales y Métodos) tanto en la línea de fibroblastos control NHDF como en los fibroblastos portadores de la mutación en *GATC*. Tras realizar un pulso de marcaje durante 90 minutos, las proteínas mitocondriales recién sintetizadas se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 17,5% y la señal se detectó mediante autorradiografía directa de los geles (Figura 15). Los resultados mostraron un defecto generalizado en la síntesis de proteínas mitocondriales en los fibroblastos del paciente, que llega a estar disminuida de manera global hasta un 70% respecto a la línea control. Como control de carga el gel fue teñido con el colorante azul de *Coomassie*. Estos datos confirman las consecuencias moleculares producidas por la mutación p.M78R en la proteína GATC.

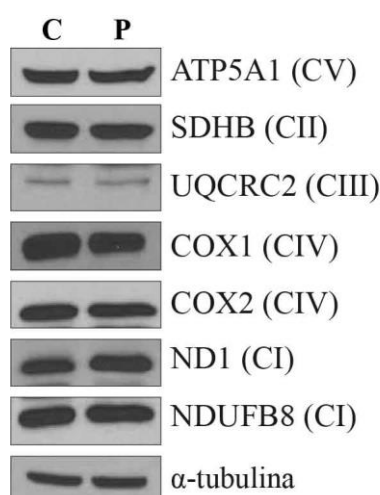


**Figura 15. Biosíntesis de las proteínas mitocondriales en los fibroblastos control y en los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC.** La síntesis de proteínas citosólicas se inhibió con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de emetina. Las proteínas mitocondriales se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina en un pulso de 90 minutos como se describe en materiales y métodos. Se separaron 100  $\mu\text{g}$  de las proteínas marcadas de la línea control (C) y de los fibroblastos del paciente (P) mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17,5%. Se muestra una autorradiografía directa de los geles representativa. Como control de carga se realizó la tinción del gel con azul de *Coomassie* (CBS).



### 1.11. Cuantificación de los niveles estacionarios de las proteínas OXPHOS

Los resultados obtenidos tras el análisis de la biosíntesis de las proteínas mitocondriales *de novo* en los fibroblastos del paciente indican que una disminución en las subunidades que constituyen el trímero GatCAB tiene un gran impacto en el proceso de traducción mitocondrial, corroborando la importancia de la ruta de transamidación en la mitocondria humana para formar el Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt. Esta disminución tan marcada en la tasa de síntesis de las proteínas mitocondriales debería afectar a los niveles estacionarios de las mismas. Para comprobarlo analizamos los extractos proteicos totales mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para diferentes proteínas que forman parte del sistema OXPHOS, algunas de ellas codificadas en el ADNmt (Figura 16). Cabe destacar que las proteínas OXPHOS NDUFB8 (subunidad del CI) y UQCRC2 (subunidad del CIII) son muy inestables si no están formando parte del complejo ensamblado, y un descenso en los niveles del complejo da lugar a una disminución en los niveles de las subunidades individuales. Por ello, a pesar de que NDUFB8 y UQCRC2 están codificadas en el ADNn podríamos esperar que una disminución en las proteínas ND1-6 (CI) y Cytb (CIII), las cuales están codificadas en el ADNmt, también pueda provocar una disminución en los niveles de NDUFB8 y UQCRC2, respectivamente. Sin embargo, sorprendentemente, no se observaron variaciones en los niveles estacionarios de ninguna de las proteínas analizadas a pesar de que los niveles de GATA, GATB y GATC así como la biosíntesis de proteínas codificadas en el ADNmt se encuentren significativamente reducidos. Estos datos podrían explicar el hecho de no observar diferencias significativas ni en la producción de ATP, de los ROS mitocondriales, de lactato ni tampoco en la actividad de los diferentes complejos de la CR.

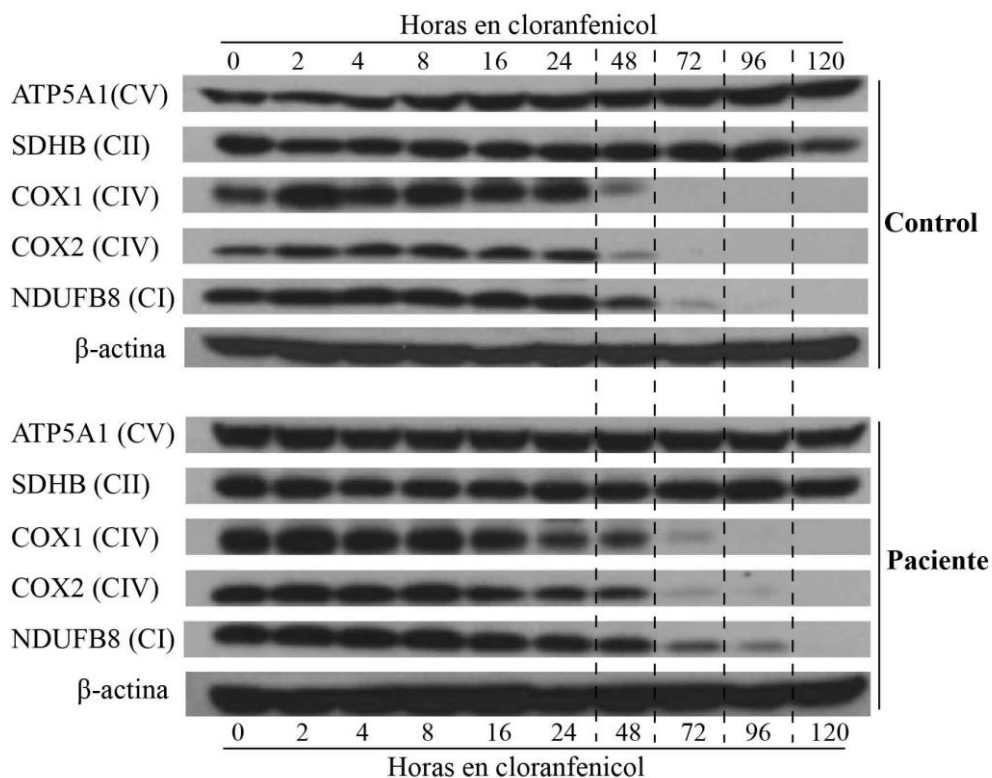


**Figura 16. Análisis de los niveles de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS mediante *Western blot*.** Se separaron 50 µg de extractos proteicos procedentes de lisados celulares de la línea control (C) y del paciente (P) mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de las subunidades ATP5A1 del complejo V, SDHB del complejo II, UQCRC2 del complejo III, COX1 y COX2 del complejo IV y NDUFB8 y ND1 del complejo I. Como control de carga se utilizó la proteína citosólica α-tubulina.

**1.12. Análisis de la estabilidad de las proteínas mitocondriales**

Una posible explicación a este resultado es el que se observa que los niveles estacionarios de algunas de las proteínas codificadas en el ADNmt como son COX1, COX2 y ND1 no presentan cambios en los fibroblastos del paciente, a pesar de presentar una tasa de síntesis disminuida, es un incremento en la estabilidad de las subunidades de la CR. Para analizar la estabilidad de estas proteínas, se llevó a cabo un experimento de pulso y caza para ver diferencias en la estabilidad a las 48 horas de marcaje. Sin embargo, en este tiempo analizado no se encontraron diferencias (datos no mostrados).

Para analizar la estabilidad en un periodo más largo de tiempo, se crecieron los fibroblastos control NHDF y los fibroblastos del paciente en presencia del inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol. Para ello, se incubaron las células 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 y 120 horas en medio DMEM suplementado con cloranfenicol a una concentración de 50 µg/ml. A continuación, los lisados celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para las subunidades OXPHOS (Figura 17).

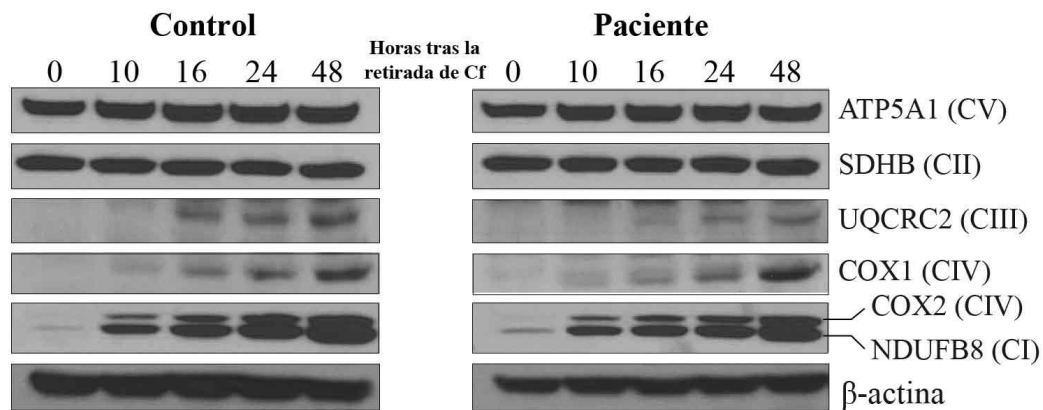


**Figura 17. Análisis de las proteínas OXPHOS a distintos tiempos de incubación con el inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol.** Tanto los fibroblastos control (NHDF) como los fibroblastos del paciente se crecieron en medio DMEM suplementado con 50 µg/ml de cloranfenicol los tiempos indicados (horas en cloranfenicol). Se separaron 50 µg de extractos proteicos procedentes de los lisados celulares mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de las subunidades ATP5A1 del complejo V, SDHB del complejo II, COX1 y COX2 del complejo IV y NDUFB8 del complejo I. Como control de carga se utilizó la proteína citosólica β-actina.

Los resultados mostraron que NDUFB8, COX1 y COX2 presentan mayor estabilidad en los fibroblastos mutantes con respecto a la línea control. Cabe destacar que la subunidad SDHB pertenece al complejo II, el cual no presenta subunidades codificadas en el ADNmt. Por tanto, en principio, sus niveles deberían ser independientes de los niveles de las proteínas OXPHOS codificadas en el ADNmt. Por este motivo, los niveles de SDHB no mostraron diferencias. Del mismo modo, los niveles de la subunidad ATP5A1 también son independientes al proceso de traducción mitocondrial, ya que esta proteína forma parte de la región F1 del complejo V que es capaz de ensamblarse en ausencia de las subunidades codificadas en el ADNmt (a y A6L). Por ello, los niveles de ATP5A1 tampoco mostraron diferencias entre los fibroblastos del paciente y del individuo sano tras el tratamiento con cloranfenicol.

Para descartar que el aumento en la estabilidad de las proteínas mitocondriales se debiese a una posible disminución de la proteasa mitocondrial principal, LONP1, en los fibroblastos portadores de la mutación en *GATC* procedimos a analizar por SDS-PAGE y *Western blot* los niveles de dicha proteína. Sin embargo, los resultados no mostraron cambios (datos no mostrados).

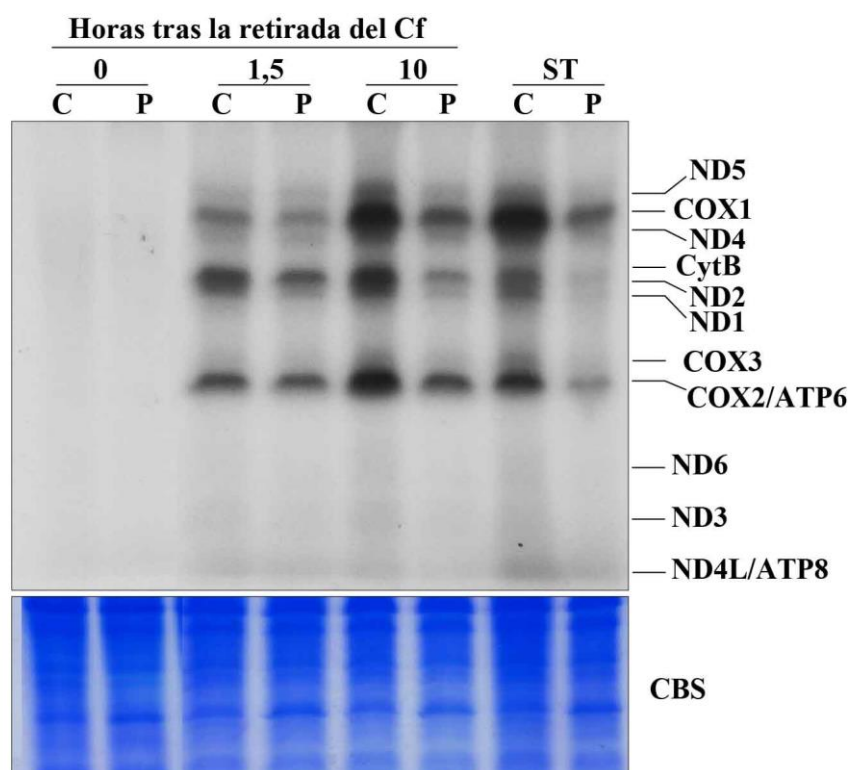
Con objeto de profundizar en la afectación de la síntesis de las proteínas mitocondriales como consecuencia de la mutación c.233T>G en *GATC*, procedimos a analizar la cinética de recuperación de los niveles de dichas proteínas tras deplecionarlas utilizando previamente el antibiótico cloranfenicol (Figura 18). Tras crecer las células durante 6 días en presencia del inhibidor de la traducción mitocondrial éste se retiró, y las células se crecieron 10, 16, 24 y 48 horas en medio DMEM completo sin cloranfenicol. También se recogieron las células que habían crecido 6 días exclusivamente en presencia del inhibidor (tiempo 0). Tras analizar los lisados celulares mediante *Western blot* pudimos observar que tanto las proteínas COX1 y COX2, codificadas en el ADNmt, como UQCRC2 y NDUFB8, codificadas en el ADNn, desaparecen completamente después de incubar las células 6 días en presencia de cloranfenicol. Los resultados mostraron que tanto la línea control como los fibroblastos afectados recuperan paulatinamente los niveles de las proteínas durante las 48 horas posteriores a la retirada del cloranfenicol y, además, ambas líneas lo hacen de una manera similar sin mostrar diferencias significativas en la cinética de recuperación de las proteínas OXPHOS. De nuevo, SDHB y ATP5A1, independientes de la traducción mitocondrial, permanecieron estables durante el ensayo.



**Figura 18. Cinética de recuperación de los niveles de las subunidades OXPHOS tras la retirada del inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol.** Los fibroblastos control, NHDF, y los fibroblastos del paciente crecieron durante 6 días en medio DMEM que contenía 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloranfenicol. A continuación, ambas líneas se crecieron en medio DMEM sin cloranfenicol los tiempos indicados (horas tras la retirada de Cf). Se separaron 50  $\mu\text{g}$  de los extractos proteicos procedentes de los lisados celulares mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles y la cinética de recuperación de las subunidades ATP5A1 del complejo V, SDHB del complejo II, UQCRC2 del complejo III, COX1 y COX2 del complejo IV y NDUFB8 del complejo I. Como control de carga se utilizó la proteína citosólica  $\beta$ -actina. Cf: cloranfenicol.

Una posible explicación de no observar diferencias en la cinética de recuperación de las proteínas OXPHOS entre ambas líneas podría ser la presencia de una cantidad y actividad remanente de la enzima GatCAB que estuviese sintetizando una fracción del  $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}\text{-mt}$ . El ARNt aminoacilado, como ocurre con otros precursores de la traducción, se podría estar acumulando cuando la traducción mitocondrial se encuentra inhibida por cloranfenicol, dando como resultado una recuperación inmediata en la cinética de síntesis de las subunidades OXPHOS tras su retirada.

Para confirmar una posible acumulación de  $\text{Gln-ARNt}^{\text{Gln}}\text{-mt}$ , volvimos a analizar la síntesis de las proteínas mitocondriales *de novo*. En este caso realizamos los marcajes con  $^{35}\text{S}$ -metionina a distintos tiempos tras la incubación y retirada del inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol (Figura 19).



**Figura 19. Biosíntesis de las proteínas mitocondriales a distintos tiempos tras la retirada del cloranfenicol.** Los fibroblastos control, NHDF, y los fibroblastos del paciente se crecieron durante 6 días en medio DMEM que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol. A continuación, ambas líneas se crecieron en medio DMEM sin cloranfenicol los tiempos indicados (0 horas, 1,5 horas y 10 horas). ST representa a las células sin tratar con cloranfenicol. La síntesis de proteínas citosólicas se inhibió con 100 µg/ml de emetina y las proteínas mitocondriales se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina en un pulso de 90 minutos como se describe en materiales y métodos. Se separaron 100 µg de las proteínas marcadas de la línea control (C) y los fibroblastos del paciente (P) mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17,5% que fueron analizadas posteriormente por autorradiografía directa. Como control de carga se realizó la tinción del gel con azul de *Coomassie* (CBS). Cf: cloranfenicol.

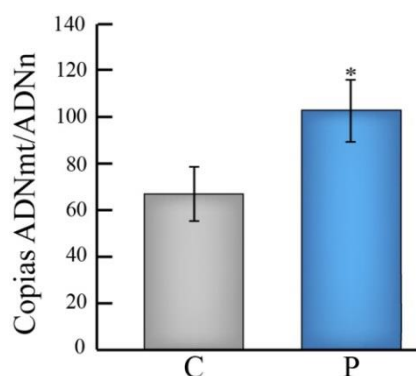
Los resultados obtenidos mostraron que los fibroblastos crecidos durante 6 días en cloranfenicol tienen inhibida completamente la traducción mitocondrial (carriles 1 y 2). Tras 6 días de incubación con el antibiótico, éste se retiró y seguidamente se realizó el marcaje con  $^{35}\text{S}$ -metionina durante 90 minutos. En estas condiciones, observamos que la tasa de síntesis *de novo* de las proteínas mitocondriales era muy similar en ambas líneas, lo que sugeriría una disponibilidad similar de los ARNt aminoacilados, incluyendo el Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt (carriles 3 y 4), tal y como habíamos hipotetizado. Sin embargo, esta rápida tasa de síntesis inicial no se mantiene en los fibroblastos del paciente tras las 10 horas de la retirada del cloranfenicol, momento en el que la diferencia con la línea control se hace más evidente, muy probablemente debido a la menor disponibilidad del Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt en los fibroblastos afectados, cuyo ratio consumo/reemplazamiento es mayor (carriles 5 y 6). Esta diferencia, se hace aún más marcada en las células que no han sido sometidas al tratamiento con cloranfenicol (carriles 7 y 8), como ya hemos observado anteriormente (Figura 15). En resumen, podemos afirmar que los fibroblastos portadores de la mutación c.233T>G en *GATC* tienen una actividad remanente de la enzima

GatCAB que aminoacila el ARNt<sup>Gln</sup> formando Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt. Este ARNt aminoacilado se acumula tras un bloqueo de la traducción mitocondrial transitorio en cantidades suficientes como para sustentar una síntesis de proteínas similar a los fibroblastos control durante un periodo corto de tiempo una vez se retira el inhibidor de la traducción. Sin embargo, la generación *de novo* del Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt es insuficiente para mantener la síntesis de proteínas a unos niveles como los que presenta la línea control a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en este experimento (Figura19) pudimos observar que a las 10 horas tras la retirada del cloranfenicol las diferencias en la síntesis de proteínas mitocondriales *de novo* entre los fibroblastos control y afectados son bastante marcadas, sin embargo en la cinética de recuperación de las proteínas OXPHOS mostrada en la Figura 18 no observamos diferencias entre ambas líneas. Estos datos, en principio contradictorios, sugerirían de nuevo la posibilidad de un incremento en la estabilidad de las proteínas mitocondriales de los fibroblastos portadores de una mutación en *GATC*.

### 1.13. Medida del número de copias del ADNmt

Para evaluar los niveles de ADNmt en los fibroblastos del paciente que pudiesen dar una explicación adicional en relación a los altos niveles de las subunidades OXPHOS pese a encontrarse la tasa de síntesis de las proteínas codificadas en el ADNmt gravemente afectada, procedimos a analizar el número de copias de ADNmt mediante PCR cuantitativa absoluta en la que se analizaron los niveles del gen del ARNr mitocondrial 12S frente a los niveles de ADN nuclear analizando los niveles de ARNasaP (Figura 20).



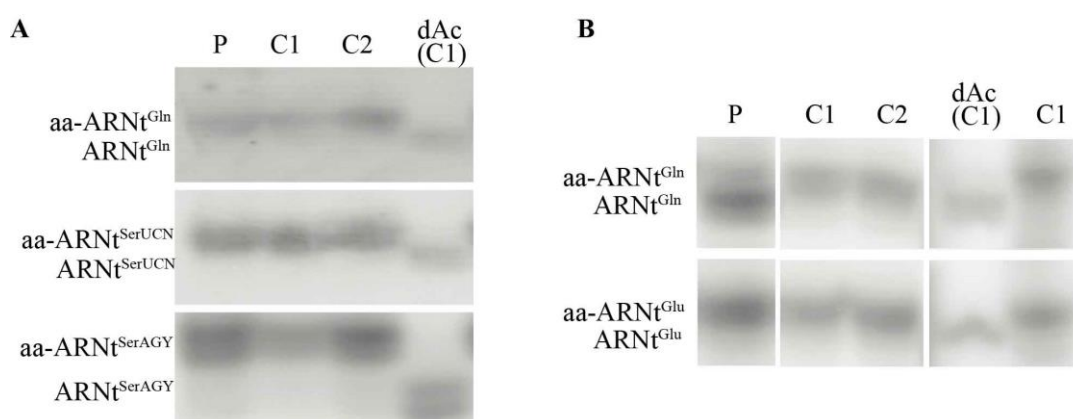
**Figura 20. Cuantificación del número de copias del ADNmt.** Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se determinó el número de copias de ADNmt de la línea control (C) y del paciente (P) utilizando sondas específicas para el gen ARNr 12S mitocondrial y se relativizó frente a la cantidad de ADNn, que se determinó utilizando sondas específicas para la ARNasa P nuclear. Los valores representan la medias  $\pm$  DE (n=3). El grado de significación estadística se muestra como \*p<0,05 (*prueba t de student*) en relación a la línea control.

Pese a no haber observado diferencias significativas entre ambas líneas en la actividad de la enzima citrato sintasa que, como se ha comentado previamente se utiliza frecuentemente como marcador de la masa mitocondrial, en este ensayo sí observamos un mayor número de copias de

ADNmt estadísticamente significativo en los fibroblastos del paciente. Este resultado podría indicar un efecto compensatorio por parte de los fibroblastos afectados para suavizar los efectos adversos de la mutación.

#### 1.14. Análisis de la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup>-mt

Nuestro último objetivo fue determinar el impacto de la mutación p.M78R en GATC en la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup> mitocondrial. Para ello, gracias a la colaboración con el Dr. Michal Minczuk (Cambridge, UK) donde fue realizado este experimento, se analizó el ARN extraído de los fibroblastos primarios mediante *Northern blot*. Cabe destacar que en la línea celular humana HeLa se ha observado que defectos en la transamidación de Glu-ARNt<sup>Gln</sup> da lugar a una rápida deacilación de este precursor, resultando en una reducción del conjunto de Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt<sup>210</sup>. Los datos mostraron que no existen diferencias en la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup>-mt en las muestras de ARN del paciente con respecto a las líneas control tras su crecimiento en medio DMEM suplementado con glutamina (Figura 21A).



**Figura 21. Análisis de la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup> mitocondrial mediante *Northern blot*.** Se separaron 10  $\mu$ g de ARN de dos líneas de fibroblastos control (C1 y C2) y de los fibroblastos del paciente (P) mediante Urea-PAGE en geles de poliacrilamida al 6,5%. Tras realizar la transferencia a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con sondas específicas de los ARNt indicados marcadas con <sup>35</sup>P. Las señales fueron detectadas con *phosphor imaging* (Typhoon). En (A) se muestra el experimento realizado a partir de fibroblastos crecidos en medio con un contenido alto en glutamina y en (B) se muestran los resultados obtenidos a partir de fibroblastos crecidos en medio DMEM sin glutamina añadida. **dAc** indica un control deacilado.

Como la glutamina es el donador de amidas de la enzima GatCAB, siendo por tanto un cofactor de la misma, altos niveles de este aminoácido en el medio podría facilitar la actividad remanente que pueda estar teniendo esta enzima en los fibroblastos del paciente. Por el contrario, una reducción en la disponibilidad de glutamina estaría limitando la ya limitada actividad de la enzima GatCAB del mutante para producir suficiente Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt. Por este motivo, este experimento se realizó de nuevo incubando las células durante 3 días en medio suplementado con todos los aminoácidos esenciales a excepción de la glutamina (Figura 21B). En estas condiciones, los fibroblastos del paciente mostraron un descenso significativo de la cantidad de ARNt<sup>Gln</sup> cargado con glutamina comparado con la línea control.

## 2. Identificación de nuevos genes implicados en la función OXPPOS

En este apartado se exponen los resultados obtenidos de la identificación de *C6orf203* como gen candidato a participar en la función OXPPOS y la caracterización parcial de su función en la línea celular HEK293T mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

### 2.1. Estudio *in silico* de genes candidatos implicados en la función mitocondrial

El punto de partida de esta segunda parte de la tesis doctoral se encuentra en varios proyectos previamente desarrollados en nuestro grupo. En estos trabajos se encontraron en varias ocasiones genes implicados en la función OXPPOS codificados en bicistrones en *Drosophila melanogaster*, como ocurre en el caso de GatC. Así, se planteó el rastreo de los bicistrones de *Drosophila* como herramienta de identificación de nuevos genes OXPPOS candidatos, además de ser responsables de patologías mitocondriales aún no diagnosticadas molecularmente como queda demostrado en el capítulo anterior.

Por este motivo, nuestra primera aproximación para desarrollar el objetivo general propuesto de esta tesis doctoral fue realizar la búsqueda de genes no descritos que se encontraban en estos bicistrones y tuviesen una alta probabilidad de codificar proteínas de destino mitocondrial. Para ello seguimos una serie de etapas que vienen resumidas en la siguiente figura (Figura 22).

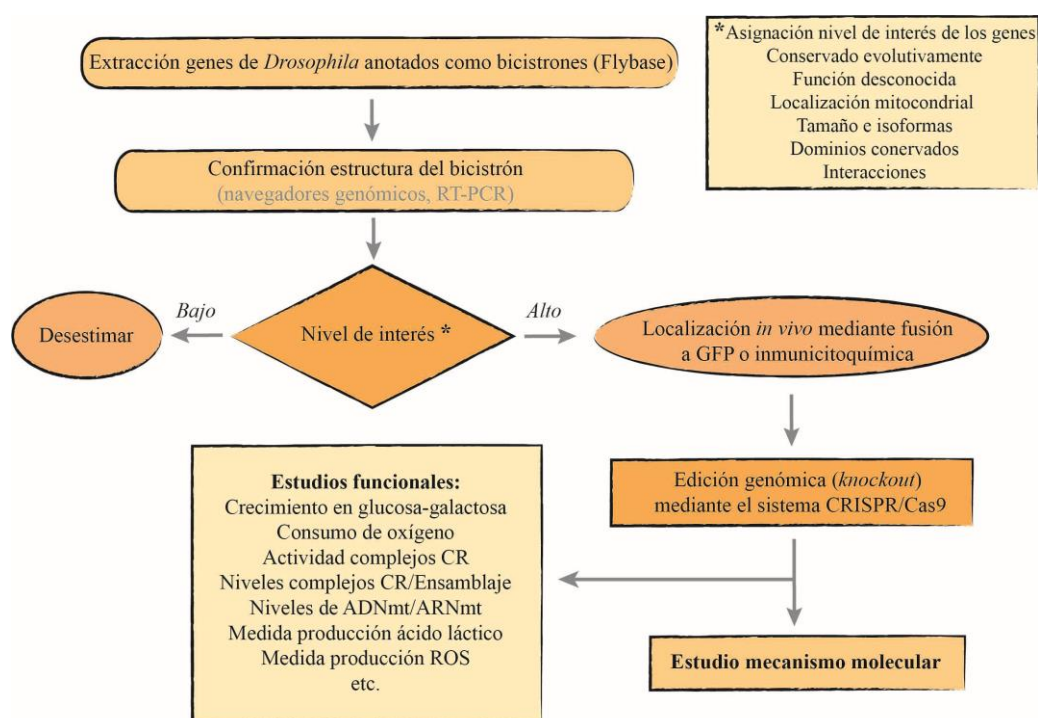


Figura 22. Diagrama de flujo en el proceso de identificación de nuevos genes implicados en la función OXPPOS.

Tal y como se ha comentado en el apartado 4.2 de la introducción de esta tesis doctoral se estima que existe al menos un centenar de genes en *Drosophila*<sup>183</sup> que siguen esta distribución dentro



de su genoma por lo que procedimos a extraer de la base de datos del genoma de *Drosophila* Flybase (<http://flybase.org/>) todos aquellos genes anotados como bicistrones. Tras confirmar la estructura real de éstos haciendo uso bien de otros navegadores genómicos (Ensembl, UCSC) o mediante RT-PCR, asignamos a cada gen un nivel de interés, alto o bajo, en función de si cumplían los siguientes criterios:

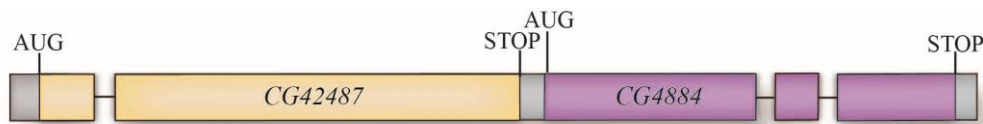
- 1) La proteína debe estar conservada evolutivamente y tener un ortólogo humano.
- 2) Analizar si la inserción de un elemento transponible en el locus de interés de *Drosophila* (si existe) presenta algún fenotipo característico de disfunción mitocondrial.
- 3) La proteína debe carecer de una función asignada.
- 4) Deben existir evidencias de un posible destino mitocondrial de la proteína, bien por algoritmos como son Mitoprot, TargetP 1.1, PSORT II y Predotar o por la aparición en la base de datos MitoCarta.
- 5) Análisis de sus potenciales interactores en el programa informático STRING o en la base de datos de genes del NCBI.
- 6) Análisis del tamaño de la proteína y posibles dominios conservados, siendo aquellas de menor tamaño y con dominios transmembrana las que cobran más interés.

Cabe destacar que todos estos criterios son elementos de valoración. Excepto el punto 1 ningún otro criterio es decisivo en la elección. Los criterios 2 y 4 son importantes y el 3 queda sujeto al peso de la información disponible.

Tras un primer análisis de alrededor de 70 bicistrones obtuvimos un grupo de genes que, en base a nuestros criterios, podrían ser de alto interés para su estudio. Finalmente decidimos continuar este trabajo con la proteína CG4884, cuyo ortólogo humano es C6orf203.

## **2.2. CG4884 de *Drosophila* es una proteína potencialmente mitocondrial.**

El gen *CG4884* se encuentra en un ARNm bicistrónico junto con *CG42487*, siendo éste el que se localiza en el extremo 5' del ARNm (Figura 23). *CG42487* codifica una proteína de 309 aminoácidos que sólo se encuentra en *Drosophila*, no presentando ningún ortólogo en otras especies. Tampoco presenta dominios conservados ni secuencia de localización mitocondrial de acuerdo a las herramientas informáticas utilizadas. Sin embargo, *CG4884* codifica una proteína de 189 aminoácidos (Referencia en Uniprot-KB: Q9VAX9) y los algoritmos informáticos utilizados le asignan una alta probabilidad (~95%) de tener una localización mitocondrial. De hecho posee una secuencia de localización mitocondrial (SLM) en el extremo amino terminal de 16 aminoácidos que, probablemente, determinará el destino de esta proteína a este orgánulo.



**Figura 23. Representación esquemática de la unidad transcripcional bicistónica de los genes *CG42487* y *CG4884* de *Drosophila*.** Los rectángulos representan exones y las líneas entre ellos intrones. En naranja se detalla la secuencia codificante de *CG42487* y en morado los exones que forman parte de la secuencia codificante de *CG4884*. En gris se muestran las regiones no traducidas.

Otra característica adicional que también nos llevó a analizar en más profundidad este gen es el hecho de que esta proteína posee un dominio conservado que pertenece a la superfamilia de unión a ARN S4 (IPR036986, Interpro) entre los aminoácidos 73 y 168. Este dominio se encuentra en la proteína ribosómica S4 de bacterias, en la proteína ribosomal eucariota S9, en dos familias de pseudouridina sintetasas, en una nueva familia de ARN metilasas, en la tirosil-ARNt sintetasa bacteriana y en un número de proteínas pequeñas sin caracterizar implicadas en la maquinaria de traducción. Siendo, por tanto, un dominio que probablemente medie la unión a ARN. Asimismo, el buscador de dominios conservados del NCBI<sup>206</sup>, le asigna un dominio de unión a ARN que pertenece a la superfamilia YlmH que se detallará en el siguiente apartado.

### 2.3. *CG4884* se encuentra conservada evolutivamente y presenta un ortólogo humano: C6orf203

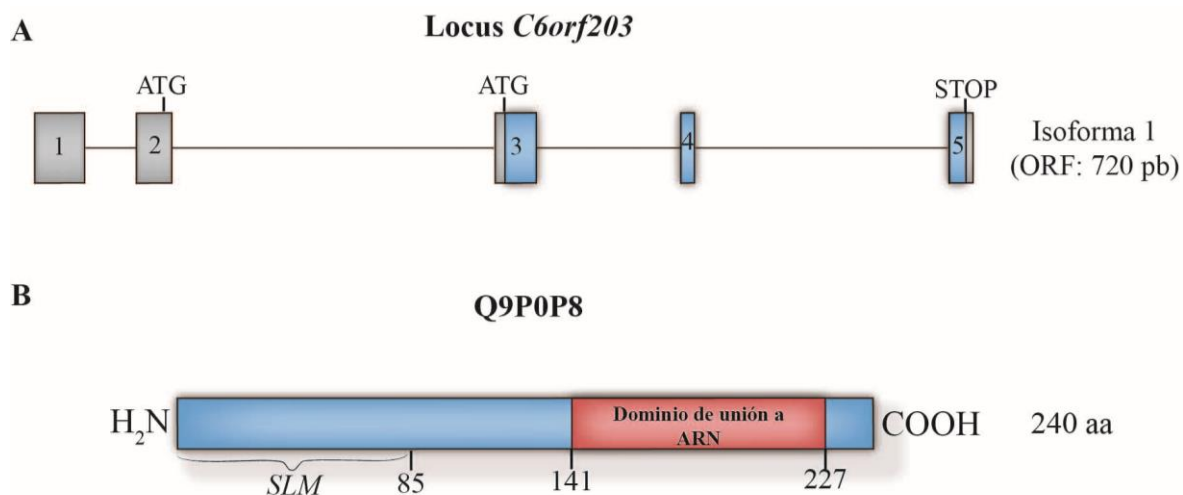
Al observar que esta proteína se encuentra conservada evolutivamente y presenta un ortólogo en humanos, C6orf203, decidimos continuar con su estudio.

Tras confirmar en las bases de datos que C6orf203 se encuentra presente en humanos procedimos a comparar su secuencia de aminoácidos en diferentes especies utilizando la herramienta informática *Clustal Omega* (EMBL-EBI: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los análisis comparativos mostraron que esta proteína se encuentra conservada en metazoos, desde *D.melanogaster* hasta humanos (Figura 24). Asimismo, este estudio mostró que C6orf203 se encuentra ausente en bacterias, hongos, plantas o eucariotas inferiores como *Sacharomyces cerevisiae*.

H.sapiens (Q9P0P8)	1	MAMASVKLLAGVLRKPDAWIGLWGVLRGT-PSSYKLCCT--SWNRYLYFSSTKLRAPNYKT	57
M.musculus	1	MAVPGVRLTGTALRKPDAWTRLWGVIQGT-S-SHKLCA--SWNRYLYFSSTKLNITSNYKT	56
G.gallus	1	--MTGFRLPVTVFRRNLNVVWGLWEKFP-----SNQLFP--SWRRSIFCSCQASTIND--R	49
X.tropicalis	1	-----RFSVRAFRNAQTCIRLCQ-----DPYMMCRTCSWTLCLRHLN-----YYHGHCCK	44
D.erio	1	--MQSLSVQALALRQLGRNLNQLLTPCHGSGLSMWCPRMLHARQLWGSATSQTHRT---	55
D.melanogaster	1	-----MLRTEFQIA-----RGRSLRT	17
		:.:*	
H.sapiens	58	LFYNIFSLRLPG-LLLSPECFIPFVSRLKSNIRSTKSTKKSLOKV-DEEDSDEESHDEM	115
M.musculus	57	LFRNIFSLRLPE-LLVSPCYFPFSLRLKSNINSKSTKTKLQKEADEEDSDEETSYPER	115
G.gallus	50	RWFSFSPVKLCA-LRLSPDYISVLSLRLKSKSKSRN-RQTVOEEEE-----EEEADEQE	102
X.tropicalis	45	PLLGVLPTDSTGFLTVSSENCLLSPFRLKSKSHKKGSKGSSEVE-----EEERPED	98
D.erio	56	-AMG--PK----SWDARQSWTLHQIRLKSSTRK--KQKQK-----AVHQEETEET	96
D.melanogaster	18	PFP---SKSLPK-LSTTLELQAP----VHTSASAWKYDKKSSRAS-D-----D	56
		: : : : :	
H.sapiens	116	SEQEELEDDPTVVKNYKDLEKAVOSFRYDVVLRKTGLDIGNKNKVEDAFYKGLRLNEEKL	175
M.musculus	116	SEQEELESEPGVAKDYKDLEKVVOSFRYDVILKRTGLDVGRNKVEDAFYKGLRLNGEKL	175
G.gallus	103	SDLEDEFENDPNVVKDYKDLEKVVOSLRYDVVMKAGLDIARNKVEDAFYNNELRLNGEKL	162
X.tropicalis	99	VSDYEDEPEDLNVQDYKDLEKAVOSFRFDVILTAGLDISRNKTEAFYNSLLRLNGEKL	158
D.erio	97	SDYEDEFPDDPLPNYKDKNEKVVOSLRFDLVLSGLDIAHRSVEDSFYSLKRLNGOKL	156
D.melanogaster	57	LDSDDEDEDFKDERDSKVVVKVNSLRADLLKAGLGMARNKVELNFEYSKIRVNGKKL	116
		. : : . : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
H.sapiens	176	WKKSRIVKVGDTLDLLIGEDKEAGTETVM-RILLKVKVEEKTESEKYRVNLRWRSLKLP	234
M.musculus	176	WKKSRIVKVGDTLDLLTGENKETGTETVVM-RILLKVKVEEKTENDKHRVLRWRSLKLP	234
G.gallus	163	WKKSRIVKIGDTLDLLVGEDKETGTAVVM-RVVLKVKV-NKTESEKYRVLIRWRNLKVP	220
X.tropicalis	159	WKKSRIVKVGDTLDLLVEEDKQNETTVM-RIIIFKHVLEEKTTTEKYRVLRWRNLKVP	217
D.erio	157	SKKGLVKVGDTLDQLLSDDKERTILLK-RVILKVKVSETKDGEKLVLRWRSLQLP	215
D.melanogaster	117	PKKSAQLEVGDITDVRGFSQSNPSHLVVARVLSLS---VSEEEGLSVHRLRYRSLIVE	173
		** . : : ** * : : . : : : : * : : . : : * * * : : * * * : *	
H.sapiens	235	KRMSK-----	240
M.musculus	235	KKTLK-----	240
G.gallus	221	KQDLK-----	226
X.tropicalis	218	KQDTLHK-----	225
D.erio	216	RKDVKD-----	222
D.melanogaster	174	NYRGPNAFKSSEHVAH	189
		. : :	

**Figura 24. Alineamiento mediante Clustal Omega de la secuencia de aminoácidos de la proteína C6orf203 con diferentes ortólogos.** Las referencias de Uniprot-KB de las diferentes proteínas son: Q9P0P8 (*H.sapiens*), Q9CQF4 (*M.musculus*), F1NMS1 (*G.gallus*), F7AXE1 (*X.tropicalis*), B7ZD93 (*D.erio*), Q9VAX9 (*D.melanogaster*). Los asteriscos (\*) y color gris oscuro indican aminoácidos completamente conservados mientras que los dos puntos (:), puntos (.) y tonos gris claros indican aminoácidos con propiedades químicas similares. El dominio de unión a ARN que le asignan las bases de datos se indica subrayado en rojo.

El gen *C6orf203* humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q21) y, de acuerdo a las bases de datos, codifica dos isoformas de 240 y 245 aminoácidos que solo se diferencian en que esta última posee cinco aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal y su ARNm tiene una región 5' UTR de mayor longitud. Estas dos isoformas podrían formarse bien por un proceso de reordenamiento de los exones alternativo o bien por un inicio de la traducción alternativo, ya que el codón de iniciación de la traducción, ATG, de la isoforma de mayor tamaño se encuentra en el exón 2, mientras que el ATG inicial de la isoforma corta se encuentra en el exón 3 (Figura 25). Cabe destacar que solo la isoforma corta, a la que nos referiremos como isoforma 1, aparece como la isoforma validada en Uniprot-KB/Swiss-Prot, siendo su número de acceso Q9P0P8 y teniendo un peso molecular teórico de 27,9 kDa. En adelante todos los datos, como la posición de los nucleótidos y aminoácidos vendrán referidos a la isoforma 1.



**Figura 25. Representación esquemática del gen y la proteína C6orf203.** (A) Locus *C6orf203* en el que se representan los dos posible codones de iniciación de la traducción, ATG, de ambas isoformas. Cada uno de los rectángulos representa un exón del gen, los cuales aparecen numerados. En azul se muestra la región codificante de la isoforma 1 (isoforma validada en Uniprot-KB/Swiss-Prot), que es común a ambas isoformas. En gris se indican las regiones no traducidas en la isoforma 1. Las líneas representan los intrones. (B) La isoforma 1 de *C6orf203*, Q9P0P8, está constituida por 240 aminoácidos. En rojo se destaca el dominio de unión a ARN asignado por las bases de datos, que se encuentra entre los aminoácidos indicados (141-227). También se muestra la secuencia de localización mitocondrial en el extremo amino-terminal asignada en la herramienta informática Mitoprot (SLM), que se extiende hasta el aminoácido 85.

La herramienta informática Mitoprot asigna a *C6orf203* una localización mitocondrial, detectando una SLM en los primeros 85 aminoácidos, del mismo modo que también aparece en la base de datos del proteoma mitocondrial MitoCarta 2.0<sup>156</sup> tanto de humano como de ratón (referencia Uniprot-KB en ratón: Q9CQF4). Asimismo, al igual que su ortólogo en *Drosophila*, el buscador de dominios conservados del servidor NCBI<sup>206</sup> asignan a *C6orf203* un dominio de unión a ARN tipo S4 característico de la superfamilia YlmH. La proteína YlmH está presente en bacterias, algas y plantas<sup>211</sup>, y no se había identificado hasta el momento ninguna proteína humana que presentara un dominio similar. En el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los distintos ortólogos se observa que es precisamente este dominio el que mantiene una mayor conservación evolutiva (Figura 24).

Durante el inicio de este trabajo también pudimos observar que existen dos pseudogenes de *C6orf203* en el genoma humano. La secuencia de nucleótidos de ambos tiene una alta homología con la secuencia de ADN complementario (ADNc) de *C6orf203*. El primero de los pseudogenes se encuentra en el mismo cromosoma 6, concretamente en la posición citogenética 6q25.2 (Ensembl: LOC100129996). Al analizar su secuencia mediante la herramienta informática *ORFfinder* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) pudimos observar que no posee ninguna pauta abierta de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) porque presenta gran cantidad de codones de parada. El segundo pseudogen se encuentra en el cromosoma 21, en la posición 21q22.11 (Ensembl:

AP000563) y, al contrario que el primero, al analizar su secuencia observamos que posee una ORF que podría dar lugar a una proteína con una composición de aminoácidos similar a la de C6orf203 y a la que se le asigna también una localización mitocondrial (98%) en el algoritmo Mitoprot (Figura 26).

C6orf203 (Q9P0P8)	1	MAMASVKLLAGVLRKPDAWIGLWGVLRGTPSSYKLCSTSWNRYLYFSSTKLRAPNYKTLFY	60
PseudogenCr21	1	MAMTSVKLLAIVLRKPDWTWIGLWGVLRGTPSSHKLCTSWNRY----STKLCAPNYKRLIH	56
		***:***** *****:*****:*****:*****:***** ***** **:	
C6orf203	61	NIFSLRLPGLLLSPECFIPFSVRLKSNIRSTKSTKKSLOKQVDE-EDSDEESHHEMSEQE	119
PseudogenCr21	57	NIFSLKFSGLLISPEYIFPFSIRLKSNSKSTTKSLOKVEDEEDSEEDSNHDEMSEQE	116
		*****: **:* ** *****:***** * **.* *****: **:* ** *****:	
C6orf203	120	EELEDDPTVVKNYKDLEKAVQSEFRYDVVLKLTGLDIGRNKVEDAFYKGE LRLNEEKLWKKS	179
PseudogenCr21	117	EELEDDPTIVKDYQDLEKAVQSEFWYDDVLKLTGLDIGRNKVEDAFYKGE LRLNGEKLWKKN	176
		*****: **:* ** *****:***** ** *****:*****:***** *****:	
C6orf203	180	RTVKVGD TLDL-----LIGEDKEAGTETVMRILLK KVFEEKTESEKYR	222
PseudogenCr21	177	RTVKVGD TLDL LIGD LLDPMYLG DILDL LFGEDKEGGTETVMRILLK KVFED-----	228
		*****:***** *:***** *****:*****:***** *****:	
C6orf203	223	VVLRRWKSLKLPKKRMSK	240
PseudogenCr21	229	-----	228

**Figura 26. Comparación de la secuencia de aminoácidos de C6orf203 con la posible proteína codificada por el pseudogen de C6orf203 presente en el cromosoma 21.** Los residuos conservados en ambas proteínas están indicados con un asterisco (\*) y en color gris oscuro. En tonos gris claros, los dos puntos (:) y el punto (.) se indican residuos con un menor grado de similitud pero con propiedades químicas parecidas. En blanco se indican los residuos no conservados. C6orf203: Q9P0P8. PseudogenCr21: secuencia de aminoácidos teórica del pseudogen de C6orf203 localizado en el cromosoma 21 empleando la herramienta informática *ORFfinder*.

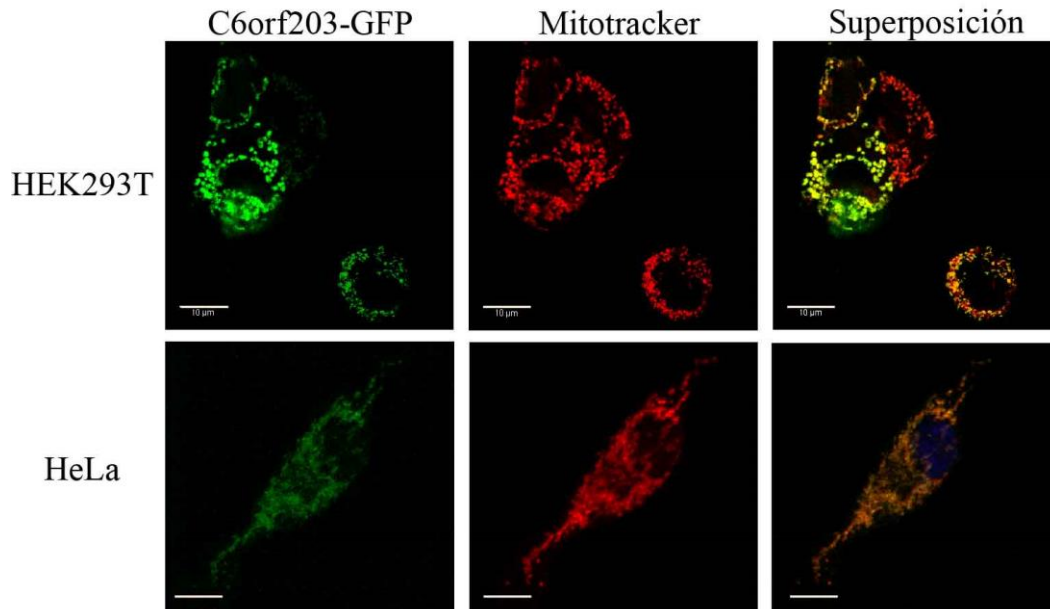
#### 2.4. Caracterización funcional de C6orf203 en la línea celular humana HEK293T

Puesto que C6orf203 se encuentra presente en humanos, no tiene una función asignada y es potencialmente mitocondrial, consideramos que es un buen candidato de estudio por lo que proseguimos la caracterización funcional de esta proteína en la línea celular humana HEK293T, derivada de riñón humano embrionario. Se eligió esta línea celular por su alta capacidad respiratoria, su elevada frecuencia de transfección y por la alta expresión del ARNm de C6orf203 en esta línea celular tal y como se indica en GTEx (<https://www.gtexportal.org>).

##### 2.4.1. C6orf203 es una proteína localizada en la matriz mitocondrial

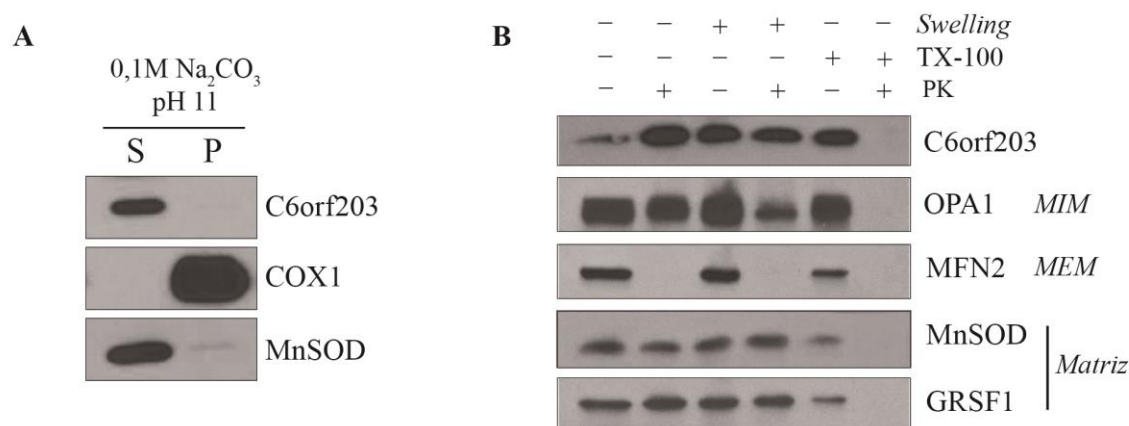
El primer paso en la caracterización funcional de C6orf203 fue comprobar si esta proteína se localiza en la mitocondria como así se le asigna en las bases de datos. Para ello, en primer lugar, mediante RT-PCR se amplificó el ADNc correspondiente a la isoforma 1 de C6orf203 y se clonó en el vector de expresión eucariota pEGFP-N1 fusionado en fase con el extremo N-terminal de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Se realizaron transfecciones transitorias de la construcción tanto en la línea celular HEK293T como en la línea celular humana HeLa, derivada de un carcinoma del cuello uterino. A las 24 horas se analizó la señal de la proteína GFP mediante microscopía confocal, utilizando como marcador de la red mitocondrial el colorante fluorescente Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen), dependiente del potencial de membrana mitocondrial.

Como muestra la superposición de imágenes de microscopía confocal (Figura 27) la señal de C6orf203-GFP colocaliza totalmente con la señal de Mitotracker, confirmando que la proteína C6orf203 se localiza en la mitocondria.



**Figura 27. Localización subcelular de C6orf203.** Las líneas celulares humanas HEK293T (panel superior) y HeLa (panel inferior) fueron transfectadas de manera transitoria con la proteína EGFP fusionada a la proteína C6orf203. La localización subcelular de C6orf203-GFP (en verde) fue analizada mediante microscopía confocal 24 horas después de la transfección. La distribución mitocondrial de las células se analizó mediante incubación con el marcador específico mitocondrial Mitotracker Red (en rojo). Ambas imágenes se combinaron para mostrar la colocalización de ambas señales. Escala de 10 µm en todas las imágenes.

Con objeto de estudiar con precisión en qué compartimento mitocondrial se encuentra esta proteína, procedimos a purificar las mitocondrias y, a continuación, realizamos dos tipos de estudios. Por un lado separamos las proteínas de membrana de las proteínas solubles mediante un tratamiento alcalino con carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) y posterior centrifugación. Ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* (Figura 28A). Como muestran los resultados, COX1, proteína de la MIM, aparece en la fracción de proteínas de membrana, esto es el sedimento o *pellet* (P). Por el contrario, la proteína MnSOD mitocondrial, que es una proteína de matriz, aparece en la fracción de las proteínas solubles, es decir, en el sobrenadante (S), fracción en la que también se encuentra C6orf203. En vista a estos resultados, pudimos concluir que C6orf203 es una proteína mitocondrial que no está asociada a membrana.



**Figura 28. Localización submitocondrial de C6orf203.** (A) Análisis mediante *Western blot* del extracto mitocondrial después del tratamiento alcalino a pH 11 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. **S**: sobrenadante (fracción de proteínas solubles). **P**: sedimento o *pellet* (fracción de membrana). COX1 y MnSOD son marcadores de la membrana y matriz mitocondrial respectivamente. (B) Análisis mediante *Western blot* del extracto mitocondrial tras el tratamiento con proteinasa K en presencia (+) o ausencia (-) de TX-100 o de tampón hipotónico (*Swelling*). OPA1 es una proteína del espacio intermembrana anclada a la MIM. MFN2 es una proteína de la MEM. MnSOD y GRSF1 son proteínas de la matriz mitocondrial. **PK**: Proteinasa K. **TX-100**: Tritón X-100. **MIM**: membrana interna mitocondrial. **MEM**: membrana externa mitocondrial.

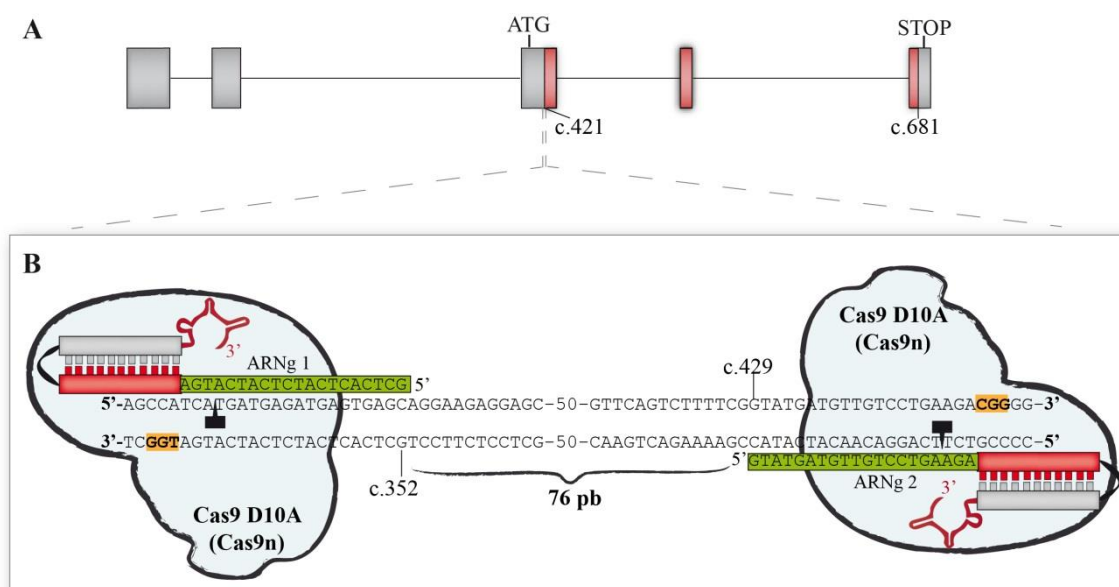
El siguiente paso fue discriminar si esta proteína se encuentra en la matriz o en el espacio intermembrana, los dos posibles compartimentos donde se localizan las proteínas solubles mitocondriales. Para ello, tras purificar las mitocondrias, se trataron con proteinasa K en presencia o ausencia de Tritón X-100. La proteinasa K degrada tanto los restos de proteínas citosólicas como las que quedan expuestas en la membrana externa mitocondrial pero no las proteínas de membrana interna mitocondrial ni las expuestas al espacio intermembrana, ni tampoco las que se encuentran en la matriz. La adición del detergente Tritón X-100 rompe las membranas mitocondriales y permite a la proteinasa K acceder a todo el contenido mitocondrial, pudiendo así digerirlas. Los extractos mitocondriales de las diferentes condiciones experimentales se separaron mediante SDS-PAGE. A continuación, se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos contra C6orf203 y contra proteínas de distinta localización submitocondrial (Figura 28B). El tratamiento con proteinasa K condujo a la degradación de MFN2, proteína localizada en la MEM. Sin embargo, el resto de las proteínas analizadas fueron solo digeridas tras añadir Tritón X-100. Por otro lado, las mitocondrias se incubaron en un tampón hipotónico (*Swelling*) para obtener mitoplastos, que carecen de membrana externa mitocondrial. A continuación, se añadió proteinasa K, pudiendo observar la digestión parcial de OPA1, proteína del espacio intermembrana anclada a la MIM, y una digestión total de MFN2. Sin embargo, las proteínas de la matriz mitocondrial GRSF1 y MnSOD quedaron intactas tras el proceso, del mismo modo que le sucede a C6orf203.

Teniendo en cuenta estos resultados en los que C6orf203 estaba protegida de la digestión por proteinasa K tanto en las mitocondrias intactas como en mitoplastos pudimos confirmar que C6orf203 es una proteína que se localiza en la matriz mitocondrial.

### 2.4.2. Generación de la línea HEK293T knockout para C6orf203

Una vez demostrada la localización mitocondrial de C6orf203 y con el objetivo de estudiar la función que desempeña esta proteína dentro de la mitocondria, generamos una línea celular deficiente para C6orf203 (*C6orf203 knockout*, KO) mediante la tecnología CRISPR/Cas9, utilizando la variante de la proteína Cas9 que porta una mutación en el dominio RuvC (D10A) y actúa como *nickasa* (Cas9n).

Para llevar a cabo la edición génica se diseñaron dos ARN guía (ARNg) con diana en el exón 3, primer exón codificante común a ambas isoformas. Para ello, utilizamos la herramienta informática E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) desarrollada por el laboratorio del Dr. Boutros<sup>208</sup>. Tal y como se detalla en el apartado 2.21.1 de Materiales y Métodos seleccionamos aquella pareja de ARNg con menor homología con otras zonas del genoma y aquella con homología completa con parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio conservado teórico de unión a ARN. Elegimos modificar el gen en esta zona específica porque a nivel de proteína es la región que presenta mayor conservación evolutiva (Figura 24) sugiriendo que este dominio podría tener un papel importante en la función de la misma. Además, haciendo uso de los programas PsiPred<sup>212</sup> y Phyre2<sup>213</sup> pudimos observar que el inicio de este dominio presenta una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, sugiriendo adicionalmente que puede ser una región importante para su estructura. Uno de los ARNg seleccionados se une entre los nucleótidos de la secuencia codificante c.333 y c.352 y el siguiente entre los nucleótidos c.429 y c.448, muy próximo al intrón 3. La pareja de ARNg, por tanto, se encuentra separada a una distancia de 76 pares de bases (Figura 29).

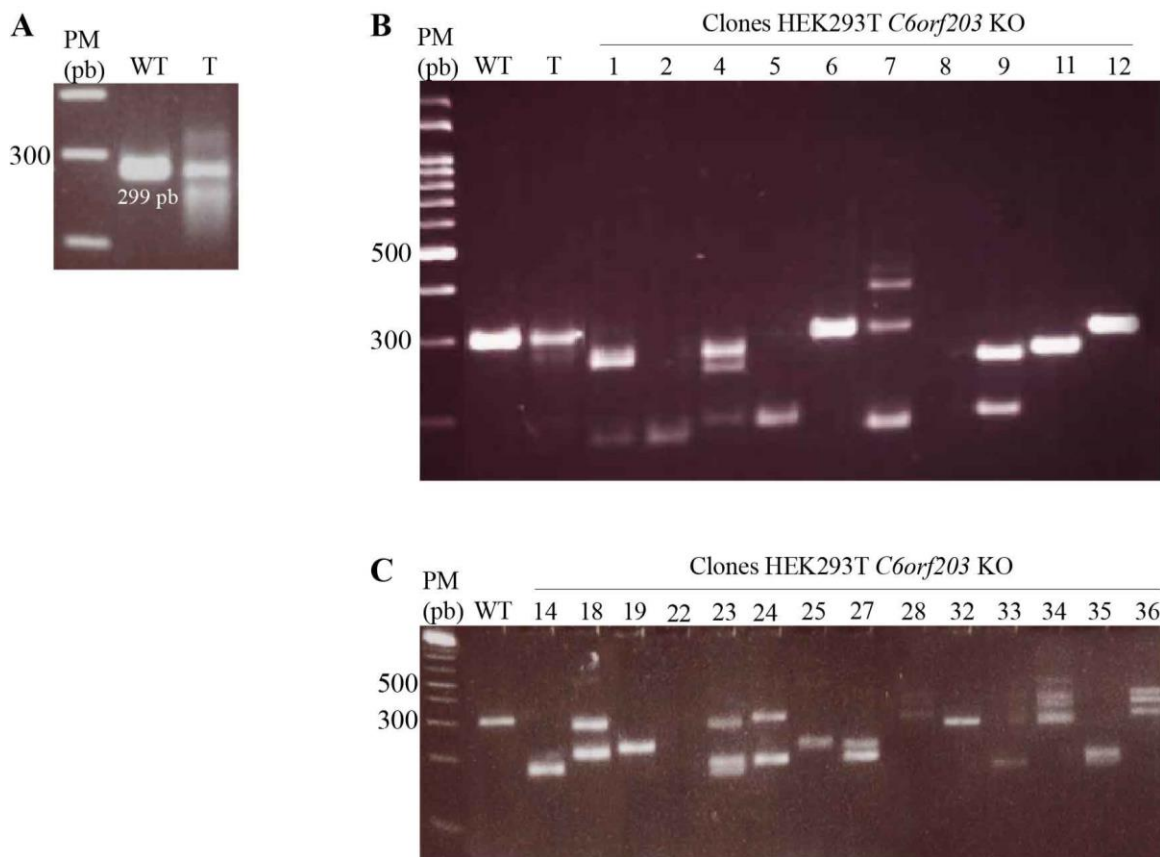


**Figura 29. Región editada del gen *C6orf203* por el sistema CRISPR/Cas9n. (A)** Representación esquemática del gen *C6orf203* donde cada uno de los rectángulos representa un exón del mismo. Destacado en rojo se muestra la región que codifica el dominio teórico de unión a ARN, que se encuentra entre los nucleótidos c.421 y c.681. **(B)** Ampliación de la secuencia del gen *C6orf203* donde se unen los ARNg. En verde se muestra la secuencia de los ARNg homóloga a *C6orf203*. ▴ indica el punto de corte teórico de la proteína Cas9n. ▮ indica la secuencia PAM.



Tras realizar el clonaje de cada ARNg en el vector PX335, obteniendo los plásmidos a los que nombraremos como PX335::ARNg1 y PX335::ARNg2, procedimos a co-transfectar ambos vectores en la línea celular HEK293T para que se llevase a cabo la edición de *C6orf203* gracias a la acción de la Cas9n codificada en este vector. A las 24 horas de la transfección, para comprobar si el sistema CRISPR/Cas9n había funcionado correctamente, se extrajo el ADN de parte del conjunto de células transfectadas y se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean la zona de unión de los ARNg. En el alelo salvaje (WT, *wild type*) esta pareja de oligonucleótidos amplifica un fragmento de 299 pb. Se pudo observar que en el conjunto de células, como consecuencia de la acción de la Cas9n y posterior reparación por NHEJ, aparecía tanto el alelo salvaje como un conjunto de inserciones y deleciones, confirmando que los ARNg junto con la Cas9n habían actuado correctamente. (Figura 30A).

A continuación, procedimos a la selección individual de clones *knockout* (KO). Para ello, partiendo del conjunto celular transfectado se realizó una dilución límite, obteniéndose en un primer momento 10 clones (Figura 30B) y más adelante otros 14 clones (Figura 30C), que fueron analizados mediante PCR con la misma pareja de oligonucleótidos que flanquea la zona de unión de los ARNg. El resultado de la PCR de los clones mostró la aparición de varias bandas de peso molecular inferior al control silvestre (deleciones), como por ejemplo en los clones 2, 5, 9 y 35. También observamos la aparición de bandas de peso molecular superior (inserciones), como por ejemplo en los clones 7, 34 y 36. Asimismo, observamos clones como el 6 y 7 portando el alelo silvestre. Decidimos continuar con aquellos clones que portaban deleciones claras, para tener la certeza de que iba a haber cambios en la secuencia codificante deseada. Nos referiremos a éstos como clones *C6orf203* KO.



**Figura 30. Amplicones de PCR de la región editada del gen *C6orf203* por el sistema CRISPR/Cas9n en células HEK293T silvestre y en clones *C6orf203* KO resueltos en geles de agarosa al 3,5%. (A)** Amplicones de la PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean la región de acción del sistema CRISPR/Cas9n en células HEK293T silvestre (WT) y en el conjunto celular 24 horas después de la transfección de PX335:ARNg1 y PX335::ARNg2 (T). En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (en pb) y se detalla en letras blancas el peso molecular de la banda silvestre de 299 pb. **(B)** Amplicones de la PCR en las células silvestre (WT), en el conjunto celular tras la transfección (T) y en los clones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 generados tras la dilución límite. **(C)** Amplicones de la PCR tanto en las células silvestre (WT) como en los clones 14, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 32, 33, 34, 35 y 36 generados tras la dilución límite.

Para caracterizar las deleciones presentes en cada uno de los clones seleccionados y debido a la presencia de bandas de peso molecular muy similar y de difícil purificación por separado, los fragmentos de PCR de los clones 1, 2, 5, 9, 11 y 35 se clonaron en el plásmido pGEMT-Easy y posteriormente se aislaron colonias bacterianas. Se secuenciaron para cada banda purificada 10 colonias y el resultado obtenido se muestra en la Tabla 1. Cabe destacar que en algunos de estos clones se han obtenido más de dos bandas debido a la poliploidía de esta línea celular<sup>214, 215</sup>.

Tabla 1. Mutaciones encontradas por secuenciación en los clones *C6orf203* KO.

Clones <i>C6orf203</i> KO			
Nº clon	Bandas clonadas	Cambios detectados ADN	Cambios proteína ( <i>in silico</i> )
<i>Clon 1</i>	2 bandas	c.327_448del ( $\Delta$ 122pb) c.426_462del ( $\Delta$ 37pb)	p.(Glu109Aspfs*18) p.(Phe142Leufs*17)
<i>Clon 2</i>	1 banda	c.327_448del ( $\Delta$ 122pb)	p.(Glu109Aspfs*18)
<i>Clon 5</i>	2 bandas	c.336_446del( $\Delta$ 111pb) c.414_455del ( $\Delta$ 41pb)	p.(His112_Lys149del) p.(Val139_Leu152del)
<i>Clon 9</i>	3 bandas	c.339_445del( $\Delta$ 107pb) c.416_457del ( $\Delta$ 42pb) c.421_447del ( $\Delta$ 27pb)	p.(Asp113Glu fs*18) p.(Val139_Leu152del) p.(Ser141_Lys149del)
<i>Clon 11</i>	1 banda	c.421_452del ( $\Delta$ 32pb)	p.(Ser141Alafs*16)
<i>Clon 35</i>	3 bandas	c. 329_446del( $\Delta$ 118pb) c. 336_446del( $\Delta$ 111pb) c.344_448del( $\Delta$ 105pb)	p.(Ser110Argfs*4) p.(His112_Leu149del) p.(Met115_Lys149del)

Mutaciones en nomenclatura HDVS (*human genome variation society*) y en referencia a las secuencias ENST00000405204.6 (ADN) y Q9P0P8 (proteína). **del( $\Delta$ )**,delección. **fs**, *frame shift*. **\***, *codón de parada*.

Una vez conocida la naturaleza de las diferentes deleciones en los distintos clones procedimos a analizar su secuencia a nivel de proteína *in silico* utilizando la herramienta informática ORFfinder. En todos ellos pudimos ver una deleción de aminoácidos, de mayor o menor tamaño, pertenecientes al dominio de unión a ARN, así como la aparición de codones de parada prematuros en algunos casos, dando lugar a proteínas truncadas (Tabla 1). Adicionalmente, comprobamos mediante SDS-PAGE a partir extractos proteicos de mitocondrias purificadas y posterior *Western blot*, los niveles de *C6orf203* en cada clon. Para ello, empleamos un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína *C6orf203* (Figura 31).

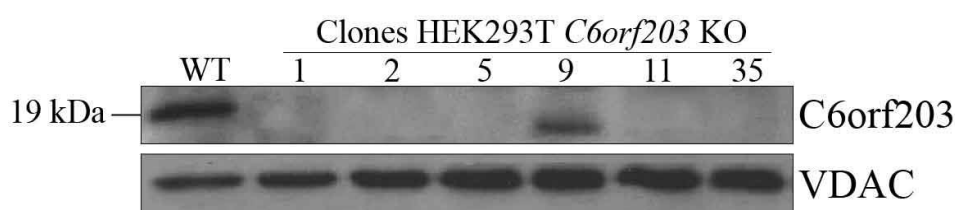


Figura 31. Análisis de la presencia de *C6orf203* en los clones *knockout* mediante *Western blot*. Se separaron 25  $\mu$ g de proteínas procedentes de mitocondrias purificadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizó la presencia y peso molecular de *C6orf203* tanto en las células HEK293T silvestre (WT) como en los clones 1, 2, 5, 9, 11 y 35 *C6orf203* KO. Se indica el peso molecular aproximado de la proteína *C6orf203* silvestre madura (19 kDa). Como control de carga se utilizó la proteína mitocondrial VDAC.

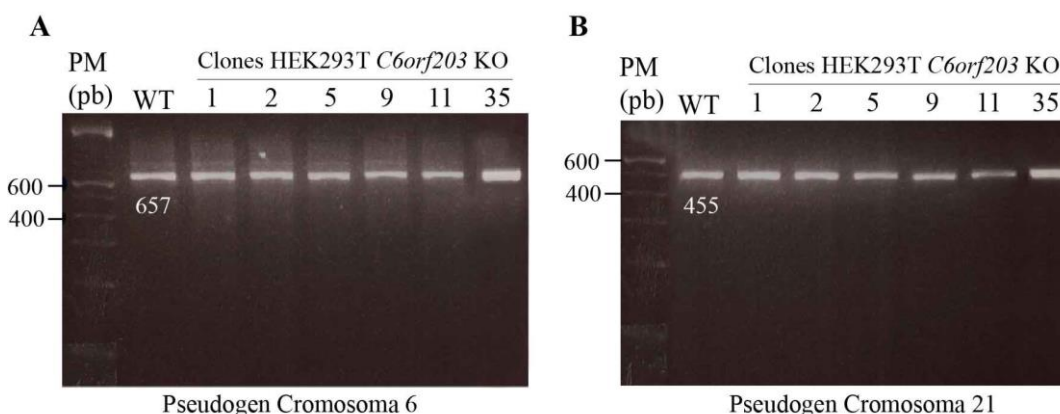
En este estudio se comprobó que, tal y como predice la herramienta informática Mitoprot, *C6orf203* posee una SLM de alrededor de 9 kDa que podría corresponder a los 85 primeros aminoácidos, ya que observamos un peso molecular de aproximadamente 19 kDa, frente a los 27,94 kDa de la proteína inmadura. Además, pudimos observar que en los clones 1, 2, 5, 11 y 35 la

deleción o deleciones presentes en el gen *C6orf203* provocan una ausencia de la proteína, mientras que en el clon 9 se expresa una proteína truncada, probablemente correspondiente a una versión de *C6orf203* que carece de los aminoácidos comprendidos entre p.Ser141 y p.Lys149 dando lugar a una proteína con un peso molecular algo inferior.

### 2.4.3. Caracterización funcional de los clones *C6orf203* KO

#### 2.4.3.1. Análisis de la secuencia de los pseudogenes de *C6orf203*

Antes de continuar con el resto del trabajo procedimos a confirmar en un grupo de clones que los pseudogenes de *C6orf203* no se habían visto modificados por la acción del sistema CRISPR/Cas9. Para ello realizamos una PCR utilizando una pareja de oligonucleótidos específica para cada pseudogen. Aunque, como ya se ha comentado anteriormente, estos pseudogenes tienen una secuencia muy similar al ADNc de *C6orf203*, se pudieron encontrar regiones específicas de cada uno para analizar la región teórica de acción del sistema CRISPR/Cas9. Cabe destacar, que los ARNg que elegimos para deleccionar *C6orf203* tienen una homología completa con este gen, pero no con los pseudogenes y además, éstos no presentaban la secuencia PAM requerida para el funcionamiento de la Cas9 de *S.pyogenes*. Realizamos estas PCR en los clones 1, 2, 5, 9, 11 y 35 (Figura 32) y posteriormente secuenciamos sus productos. Pudimos confirmar que en ninguno de los clones los pseudogenes estaban editados.



**Figura 32. Análisis mediante PCR y posterior resolución en geles de agarosa de la región de reconocimiento del sistema CRISPR/Cas9 en los pseudogenes de *C6orf203*.** Amplicones de la PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean la región teórica de acción del sistema CRISPR/Cas9 en el pseudogen de *C6orf203* localizado en el cromosoma 6 (**A**) y en el pseudogen de *C6orf203* localizado en el cromosoma 21 (**B**). En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (en pb) y se detalla en blanco el peso molecular de la banda silvestre de 657 pb en el caso del pseudogen del cromosoma 6 y de 455 pb en el caso del pseudogen localizado en el cromosoma 21.

#### 2.4.3.2. Análisis de la función OXPHOS mediante la realización de curvas de crecimiento

Como se ha comentado previamente la mayor parte del ATP celular se produce en el interior de la mitocondria gracias a la fosforilación oxidativa mediante la oxidación de los cofactores reducidos procedentes del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. La galactosa entra en la vía de la

glucolisis transformándose a galactosa-1-fosfato para a continuación convertirse en glucosa-1-fosfato y ésta en glucosa-6-fosfato, sustrato de la glucolisis. Esta conversión de la galactosa no es muy eficiente y se produce de manera más lenta, por lo que el suministro de ATP procedente de la glucolisis a partir de galactosa es insuficiente para satisfacer las necesidades energéticas de las células en ausencia de un sistema OXPHOS funcional. Las células con una mitocondria funcional, por el contrario, pueden crecer, pese a que lo hagan más lentamente, utilizando galactosa como fuente de carbono, ya que obtienen el resto de la energía necesaria mediante el metabolismo oxidativo mitocondrial. Así, como primera aproximación para comprobar si la falta de C6orf203 causaba algún defecto en el sistema OXPHOS, se realizaron curvas de crecimiento con los diferentes clones en presencia de 4,5 g/l glucosa o 0,9 g/l galactosa como fuente de carbono, contando el número de células y cambiando el medio cada 24 horas.

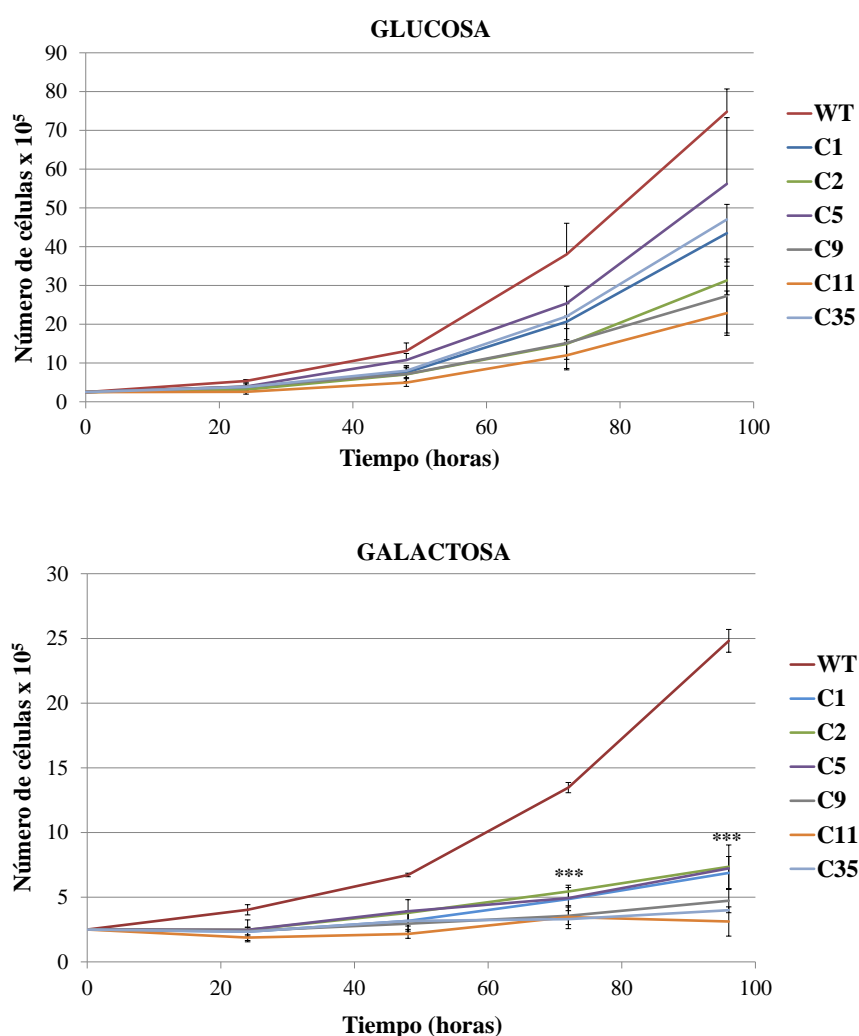
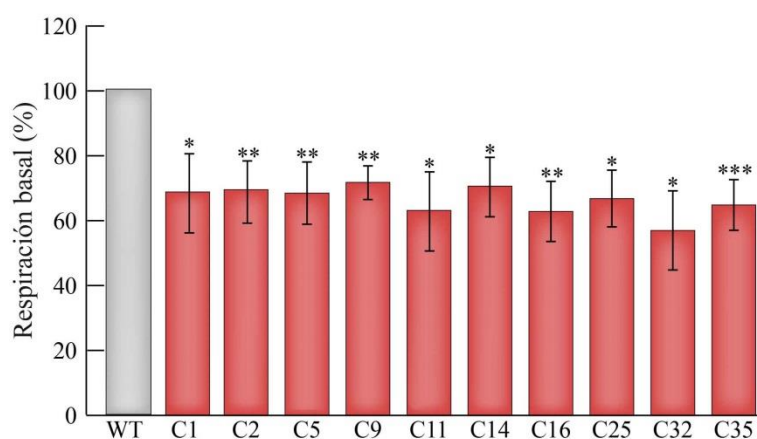


Figura 33. Curvas de crecimiento en 4,5 g/l glucosa o 0,9 g/l galactosa como fuentes de carbono de los clones de HEK293T deficientes de C6orf203. Las células control (WT) o los clones C6orf203 KO (C1, C2, C5, C9, C11 y C35) fueron crecidas en medio suplementado con 4,5 g/l de glucosa (panel superior) o 0,9 g/l de galactosa (panel inferior). Los datos se representan como la media  $\pm$  DE. El grado de significación estadística se muestra como \*\*\*  $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a las células control.

### 2.4.3.3. Medida del consumo de oxígeno

Con el objetivo de comprobar si la incapacidad de crecer en galactosa como única fuente de carbono podía ser consecuencia de una disfunción general de la CR, procedimos a medir el consumo de oxígeno en células vivas en suspensión utilizando un electrodo tipo Clark. En este caso incluimos algunos clones adicionales para su estudio como son los clones 14, 16, 25 y 32, los cuales también portaban una delección en el gen *C6orf203*. Tras medir la respiración basal tanto de las células silvestre HEK293T como de los diferentes clones crecidos 16 horas en medio con 0,9 g/l de galactosa, con el fin de forzar la maquinaria respiratoria, pudimos observar que de manera general todos los clones *C6orf203* KO presentan una reducción de aproximadamente el 35% en el consumo de oxígeno o respiración basal (Figura 34) de igual manera que ocurre cuando se midió la respiración máxima tras añadir el desacoplante FCCP (datos no mostrados).



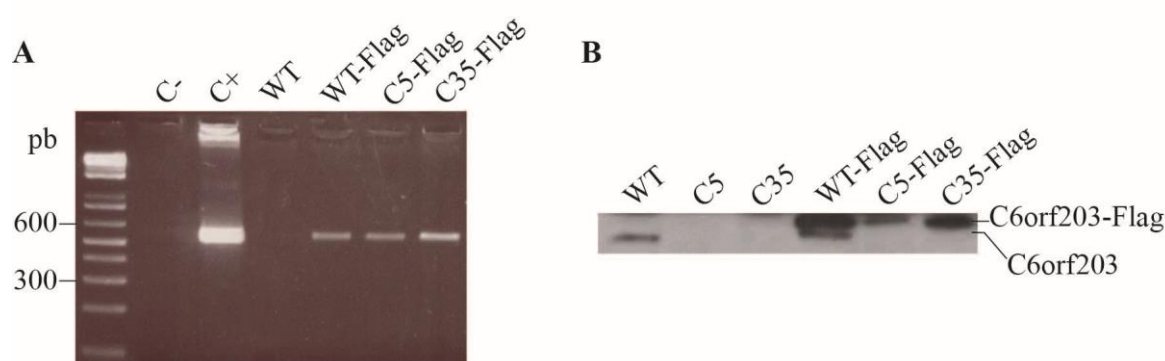
**Figura 34. Medida de consumo de oxígeno en los clones *C6orf203* KO.** Las medidas se realizaron en  $4 \times 10^6$  células en medio que contenía 0,9 g/l de galactosa utilizando un electrodo tipo Clark. Los valores se expresan como porcentaje de los resultados obtenidos en los distintos clones KO con respecto a la línea silvestre (WT) HEK293T y como la media  $\pm$  DE (n=3). El grado de significación estadística se muestra como \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

### 2.4.3.4. Rescate del fenotipo mediante la sobreexpresión de *C6orf203*

Una vez realizadas las dos primeras aproximaciones para valorar de manera general el estado del sistema OXPHOS en los diferentes clones editados, decidimos continuar con la caracterización funcional de *C6orf203* en los clones 5 y 35. Para ello, en primer lugar y con objeto de confirmar que los fenotipos observados no eran consecuencia de la acción del sistema CRISPR/Cas9 en otros puntos del genoma o de otros procesos no controlados si no que se debían exclusivamente al efecto de la delección de *C6orf203*, se diseñó un experimento de complementación para revertir el defecto de los clones *knockout*.

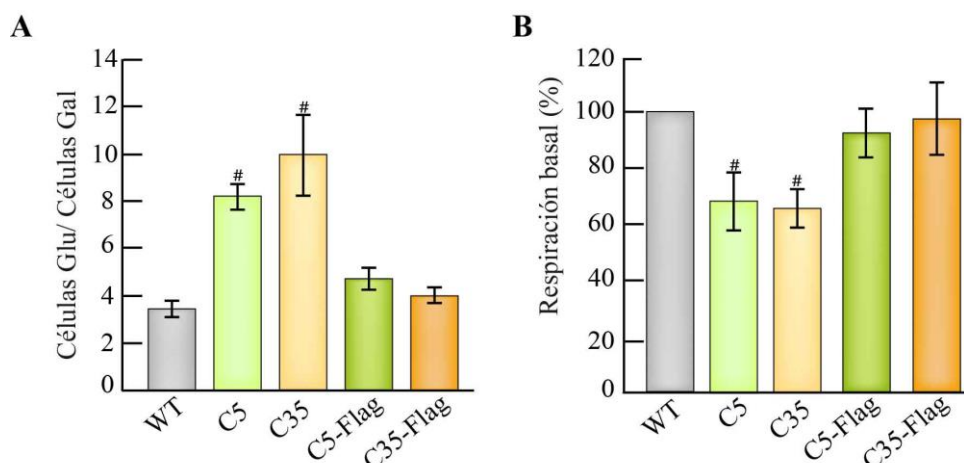
En primer lugar, mediante PCR confirmamos que el gen que codifica la proteína Cas9 no se encontraba presente en el genoma de los dos clones seleccionados (datos no mostrados) y, por tanto, no era necesario modificar la secuencia de *C6orf203* en un hipotético rescate. A

continuación, fusionamos en el extremo carboxilo terminal del ADNc de C6orf203 el epítipo Flag, cuya secuencia de aminoácidos es DYKDDDDK, y se clonó en el vector de expresión eucariota pIRESpuro2. Tras transfectar la construcción tanto en las células HEK293T silvestres como en los clones 5 y 35 *C6orf203* KO y mediante la selección con el antibiótico puomicina, obtuvimos estas líneas celulares que sobreexpresaban de manera estable y constitutiva la proteína C6orf203-Flag. Confirmamos la presencia del ADNc de C6orf203-Flag en el genoma de las células transfectadas mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (Figura 35A) y su correcta expresión mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* (Figura 35B) utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína C6orf203.



**Figura 35. Sobreexpresión de C6orf203-Flag en células HEK293T y en los clones 5 y 35 *C6orf203* KO.** (A) Resultado del análisis por PCR en gels de agarosa al 2% sobre ADNc extraído de las células HEK293T silvestre (WT) y de las líneas transfectadas con el vector pIRESpuro2 que contenían la construcción C6orf203-Flag. C- (control negativo): agua. C+ (control positivo): plásmido pIRESpuro2::C6orf203-Flag. (B) *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-C6orf203 en células HEK293T silvestre (WT), en los clones 5 y 35 (C5 y C35) y en las líneas transfectadas con el vector pIRESpuro2 que expresaba la construcción C6orf203-Flag (WT-Flag, C5-Flag y C35-Flag). Se señala tanto la proteína endógena (C6orf203) como la fusionada al epítipo Flag (C6orf203-Flag).

Tras confirmar la sobreexpresión de C6orf203 volvimos a realizar las curvas de crecimiento en glucosa y galactosa así como las medidas de la respiración basal con el objetivo de analizar el rescate del fenotipo. Tanto el clon 5 como el clon 35 *C6orf203* KO que sobreexpresaban la proteína C6orf203-Flag mostraron un ratio en el crecimiento en glucosa frente al crecimiento en galactosa similares a la línea celular HEK293T silvestre. Asimismo, estas líneas mostraron unos niveles de respiración basal similares a la línea control. Estos datos confirmaron que el fenotipo observado hasta este punto era debido a la edición del gen *C6orf203* y que la versión de la proteína C6orf203 fusionada al epítipo Flag era totalmente funcional (Figura 36).

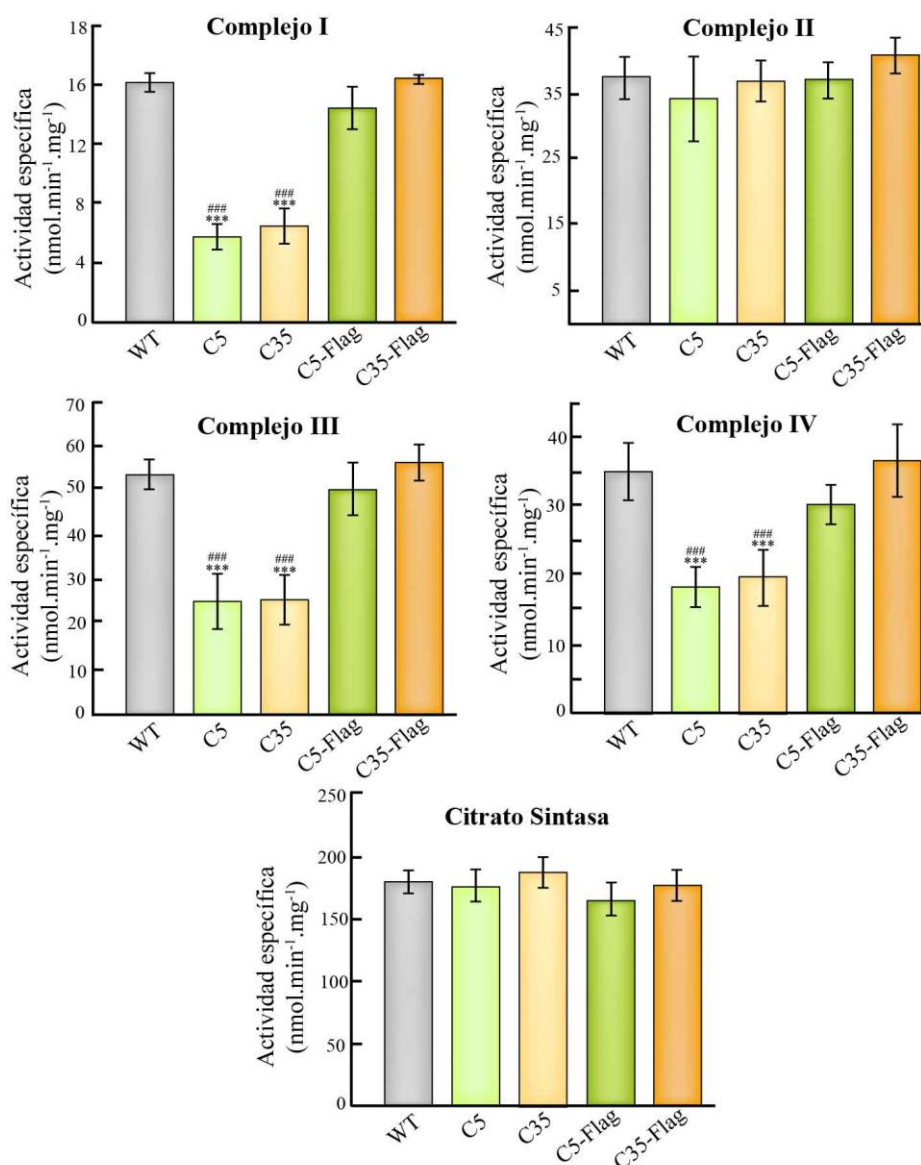


**Figura 36. Rescate del fenotipo de los clones 5 y 35 *C6orf203* KO mediante la sobreexpresión estable de *C6orf203-Flag*.** (A) Se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células de la línea silvestre HEK293T (WT), los clones 5 y 35 *C6orf203* KO (C5 y C35 respectivamente) y los clones 5 y 35 *C6orf203* KO que sobreexpresan de manera estable la proteína *C6orf203-Flag* (C5-Flag y C35-Flag respectivamente) y se crecieron en medio suplementado con 4,5 g/l glucosa o con 0,9 g/l galactosa como fuente de carbono, cambiando el medio cada 24 horas. A las 96 horas las células se recogieron y se contaron. En la gráfica se muestra el número de células contadas en glucosa (Glu) frente al número de células contadas en galactosa (Gal). (B) Medida de consumo de oxígeno en los clones *C6orf203* KO y en los correspondientes rescates. Las medidas se realizaron en  $4 \times 10^6$  células en medio que contenía 0,9 g/l de galactosa utilizando un electrodo tipo Clark. Los valores se expresan como porcentaje de los clones KO con respecto a las células silvestre HEK293T. Se muestran las medias  $\pm$  DE ( $n=3$ ). El grado de significación estadística entre cada clon KO y su correspondiente rescate se muestra como #  $p < 0,05$  (prueba *t de student*).

#### 2.4.3.5. Determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria

Tras observar que la deficiencia de *C6orf203* produce un defecto en la respiración celular, quisimos comprobar si este fenotipo estaba siendo causado por un defecto en la actividad de los complejos de la CR. Para ello, medimos las actividades enzimáticas de los complejos I, II, III y IV y de la enzima citrato sintasa, que se localiza en la matriz mitocondrial y es utilizada frecuentemente como medida de la masa mitocondrial (Figura 37). Esta aproximación permite valorar la capacidad máxima de actividad de los complejos de manera individual y en condiciones no limitantes de disponibilidad de sustrato. Los resultados mostraron que los clones 5 y 35 *C6orf203* KO presentaban tanto una disminución de aproximadamente el 60% de la actividad del complejo I como una disminución de aproximadamente el 50% de las actividades de los complejos III y IV con respecto al control. Por el contrario, tanto la actividad del complejo II como de la enzima citrato sintasa no mostraron diferencias. Todas estas medidas además se realizaron en los correspondientes clones rescatados y, de nuevo, confirmamos que la sobreexpresión de *C6orf203-Flag* en los clones KO proporcionaba un aumento en las actividades de los complejos afectados hasta llegar a niveles similares al control. Como ya se mencionó anteriormente los complejos I, III y IV contienen proteínas codificadas en el ADNmt mientras que las proteínas que constituyen el CII y la proteína citrato sintasa están codificadas exclusivamente en el ADNn.





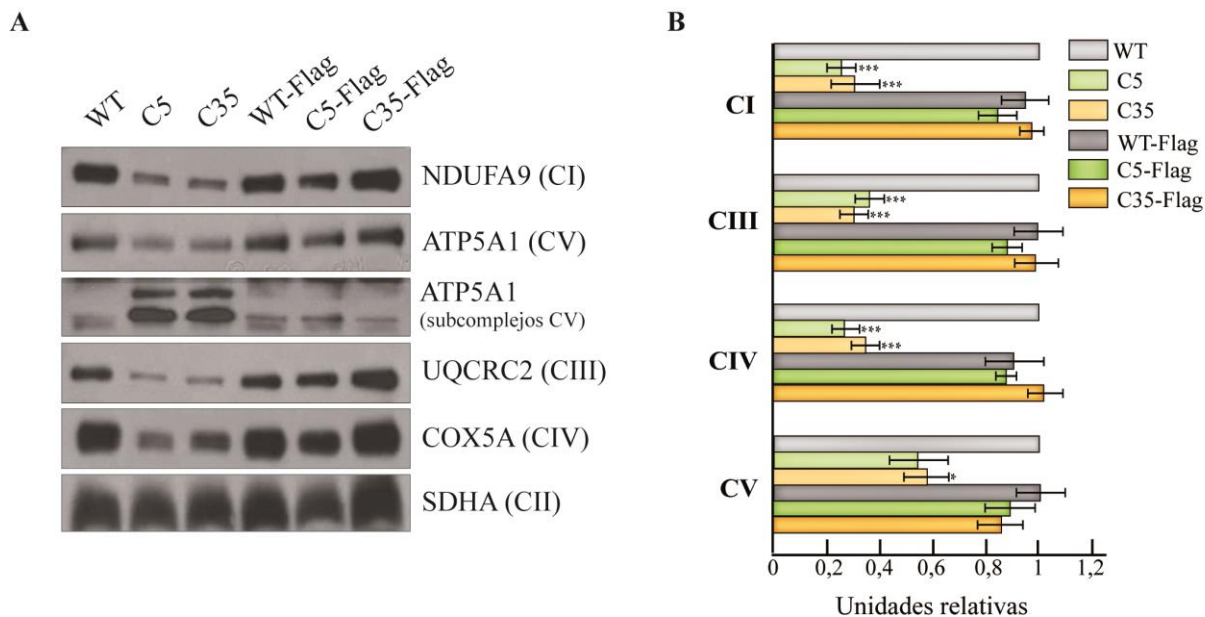
**Figura 37. Medida de la actividad enzimática específica de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria y de la enzima citrato sintasa.** Mediante medidas espectrofotométricas se determinó la actividad enzimática específica expresada en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de los complejos de la CR indicados y de la enzima de la matriz mitocondrial citrato sintasa, que refleja la cantidad de masa mitocondrial. Estas medidas se realizaron en la línea celular silvestre HEK293T (WT), en los clones 5 y 35 *C6orf203* KO (C5 y C35 respectivamente) y en sus correspondientes rescates mediante la sobreexpresión de *C6orf203*-Flag (C5-Flag y C35-Flag). El grado de significación estadística se muestra como \*\*\* $p < 0,001$  en relación a la línea control (WT) o ### $p < 0,001$  en relación al correspondiente rescate.

#### 2.4.3.6. Evaluación de los niveles de los complejos del sistema OXPHOS

El defecto en la actividad de los diferentes complejos en los clones *C6orf203* KO podría deberse a que la ausencia de *C6orf203* produzca bien una disminución en los niveles de los mismos o bien una disminución en su capacidad funcional. Para confirmar alguna de las dos posibilidades analizamos los niveles de los complejos totalmente ensamblados en los clones *C6orf203* KO. Para ello, se prepararon los extractos mitocondriales tanto de la línea control como de los clones 5 y 35

## Resultados

*C6orf203* KO y sus correspondientes rescates y se separaron los complejos del sistema OXPHOS mediante electroforesis nativa azul (*Blue Native-PAGE*) (Figura 38).

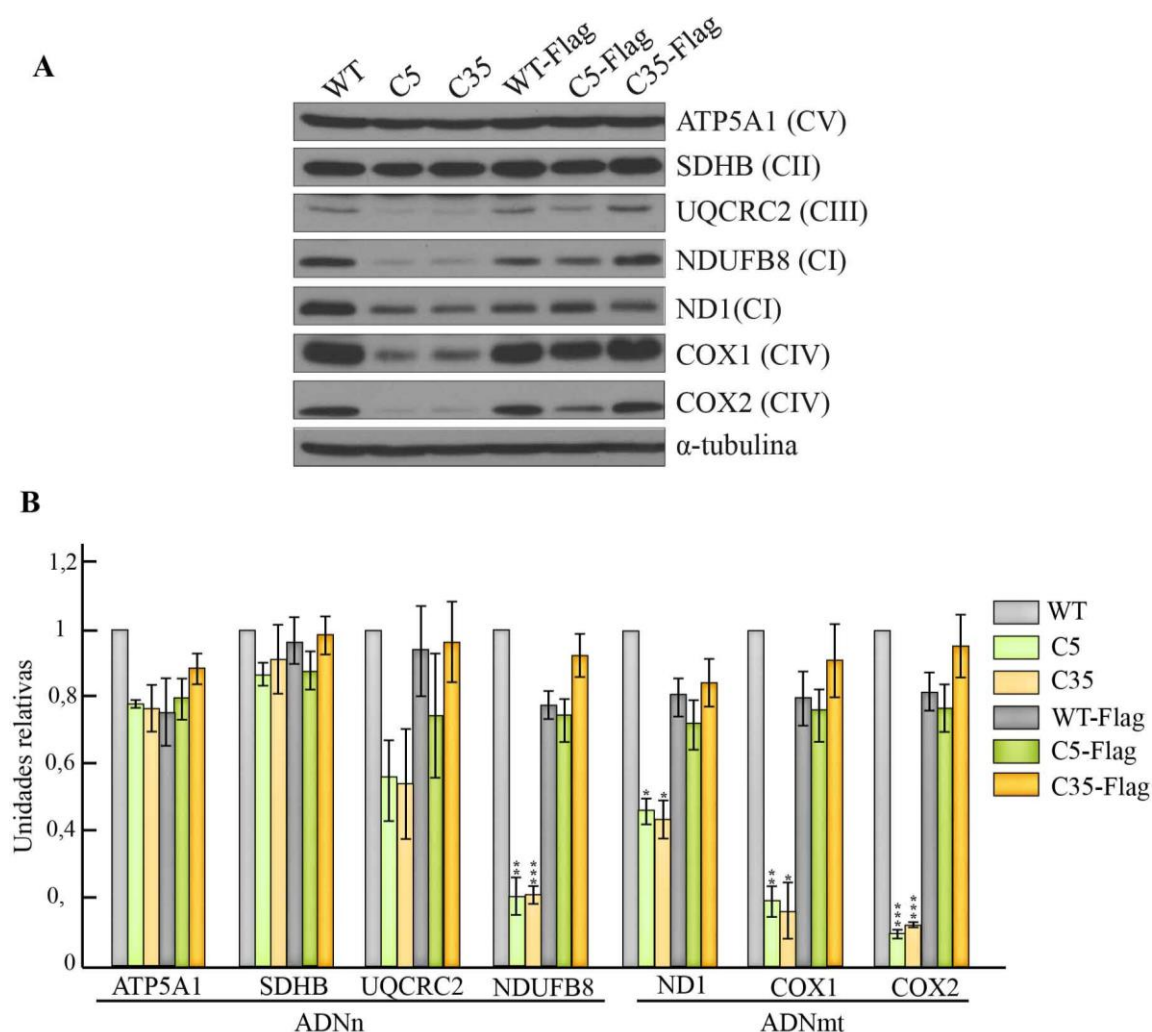


**Figura 38. Análisis de los niveles de los complejos del sistema OXPHOS totalmente ensamblados mediante BN-PAGE. (A)** BN-PAGE representativo de la línea control, las líneas *C6orf203* KO y sus respectivos rescates sobreexpresando *C6orf203*-Flag. Se separaron 80 µg de los extractos mitocondriales en geles de acrilamida del 4 al 15% y se realizó un análisis de los niveles de los complejos mediante *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen la subunidad NDUFA9 del complejo I, ATP5A1 del complejo V, UQCRC2 del complejo III, COX5A del complejo IV y SDHA del complejo II. **(B)** Densitometría de las señales de cuatro experimentos independientes para cada línea y cada complejo. Los valores se normalizaron respecto al complejo II, utilizado como control de carga. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea relativizada frente a la línea control (WT). El grado de significación estadística se muestra como \*\*\* $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control. **WT:** línea HEK293T control. **C5:** clon 5 *C6orf203* KO. **C35:** clon 35 *C6orf203* KO. **C5-Flag:** clon 5 *C6orf203* KO sobreexpresando *C6orf203*-Flag. **C35-Flag:** clon 35 *C6orf203* KO sobreexpresando *C6orf203*-Flag.

Los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa en los clones *C6orf203* KO de aproximadamente el 70% en los niveles de los complejos I, III y IV de la CR totalmente ensamblados. En relación a los niveles del complejo V se observan diferencias más sutiles, con una disminución de aproximadamente el 50%, siendo solo estadísticamente significativo en el caso del clon 35. Sin embargo, los resultados mostraron una acumulación clara y significativa de los subcomplejos del mismo, constituidos exclusivamente por el dominio F1 del complejo (Figura 38) que no posee proteínas codificadas en el ADNmt. Las bandas adicionales que se muestran en este caso están relacionadas bien con el ensamblaje incompleto del complejo V o bien con una disminución en su estabilidad. Este fenotipo se ha observado frecuentemente en patologías que afectan a la estabilidad del ADNmt, a su transcripción o traducción<sup>216, 217</sup>. Asimismo, confirmamos de nuevo que los clones rescatados poseían unos niveles de todos los complejos similares a la línea control y carecían de los subcomplejos del CV. Estos datos corroboran que la deficiencia en la actividad de los diferentes complejos de la CR se debe a una menor cantidad de los mismos.

## 2.4.3.7. Cuantificación de los niveles de las proteínas que constituyen los complejos del sistema OXPHOS

Dado el bajo nivel de los complejos I, III y IV ensamblados que presentan los clones *C6orf203* KO, a continuación nos planteamos analizar los niveles de las proteínas que constituyen dichos complejos, con el objetivo de determinar si este defecto podría deberse a una disminución en los niveles de las proteínas que los conforman, o si por el contrario tuviese lugar una reducción de la estabilidad de dichos complejos. Para ello, analizamos mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* los niveles estacionarios de las proteínas codificadas en el ADNmt COX1, COX2 y ND1, únicas proteínas codificadas en este genoma de las que disponemos anticuerpos específicos. También analizamos los niveles de otras proteínas codificadas en el ADNn, como son ATP5A1, SDHB, UQCRC2 y NDUFB8 (Figura 39).

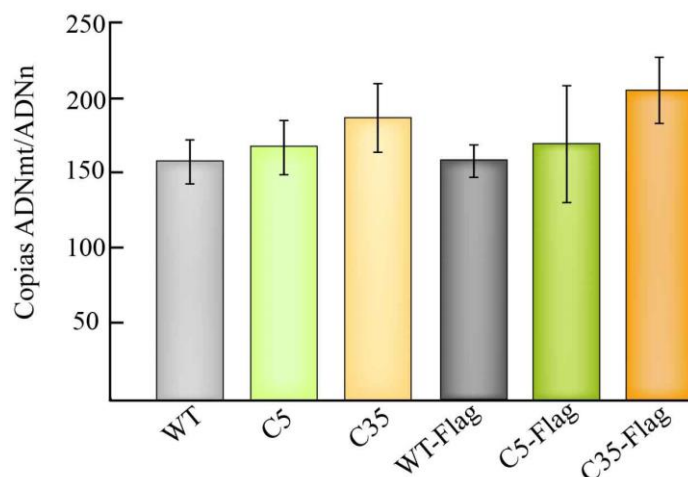


**Figura 39. Cuantificación mediante *Western blot* de los niveles de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. (A)** Se separaron 50  $\mu$ g de extractos proteicos procedentes de lisados celulares mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se analizaron los niveles de las subunidades ATP5A1 del complejo V, SDHB del complejo II, UQCRC2 del complejo III, NDUFB8 y ND1 del complejo I y COX1 y COX2 del complejo IV. Como control de carga se utilizó la proteína citosólica  $\alpha$ -tubulina. **(B)** Densitometría de las señales de cuatro experimentos independientes. Los valores se normalizaron respecto al control de carga. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE del análisis de cada línea relativizada frente a la línea control (WT). El grado de significación estadística se muestra como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  (prueba *t de student*) en relación a la línea control.

Los resultados mostraron que la ausencia de C6orf203 provoca una caída significativa de las subunidades codificadas en el ADNmt así como de la subunidad del complejo I NDUFB8. Pudimos observar también una ligera disminución en los niveles de la subunidad del complejo III UQCRC2, aunque no es estadísticamente significativa debido a la gran variabilidad en su señal. Los niveles del resto de proteínas analizadas no se encontraban afectados.

### 2.4.3.8. Cuantificación del número de copias del ADNmt

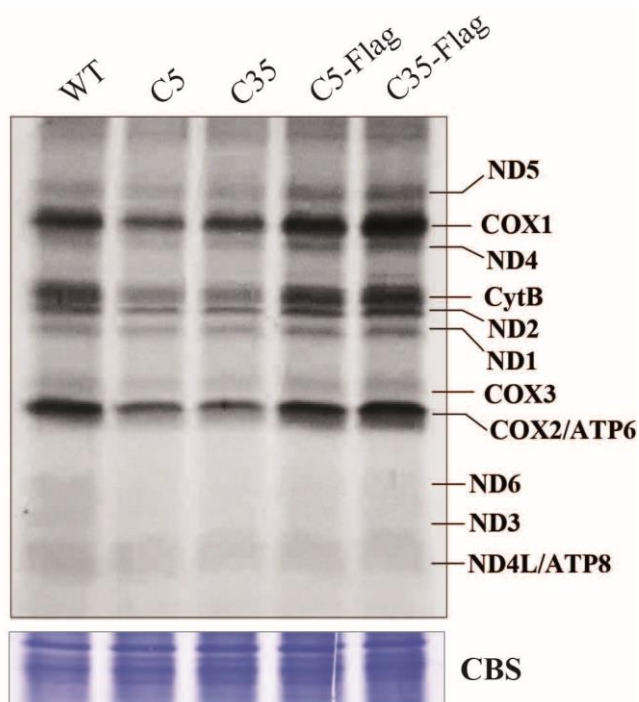
Teniendo en cuenta los resultados observados nos planteamos si esta disminución en los niveles estacionarios de las proteínas codificadas en el ADNmt podría ser consecuencia de una menor cantidad en el número de copias del ADNmt y que, por tanto, estuviese provocando una menor síntesis de dichas proteínas. Por ello, analizamos el número de copias de ADNmt mediante PCR cuantitativa absoluta en la que se analizaron los niveles del gen que codifica el ARNr mitocondrial 12S frente a los niveles del gen nuclear que codifica la ARNasaP utilizando sondas TaqMan específicas para ambos genes (Figura 40). Los resultados no mostraron diferencias en el número de copias de ADNmt en los clones *C6orf203* KO con respecto al control. Tampoco se observaron diferencias en los clones KO que sobreexpresan C6orf203-Flag, indicando que ni el fenotipo de los clones *C6orf203* KO ni el rescate de los mismos estaba mediado por el número de copias de ADNmt.



**Figura 40. Análisis del número de copias del ADNmt.** Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se determinó el número de copias de ADNmt utilizando sondas específicas para el ARNr 12S mitocondrial y relativizado frente a la cantidad de ADNn, utilizando sondas específicas para la ARNasaP. Se muestran las medias  $\pm$ DE. . **WT:** línea HEK293T control. **C5:** clon 5 *C6orf203* KO. **C35:** clon 35 *C6orf203* KO. **C5-Flag:** clon 5 *C6orf203* KO sobreexpresando C6orf203-Flag. **C35-Flag:** clon 35 *C6orf203* KO sobreexpresando C6orf203-Flag.

2.4.3.9. Análisis de la síntesis de proteínas mitocondriales *de novo*

Una vez confirmado que el fenotipo observado en las células deficientes de *C6orf203* no era consecuencia de una depleción en el ADNmt que estuviese dando lugar a una disminución de los niveles de ARNm-mt, quisimos determinar si *C6orf203* podría estar implicada en la traducción de las subunidades de los complejos de la CR codificadas en el ADNmt. Para ello, como se detalla en Materiales y Métodos y en el capítulo anterior de esta tesis doctoral, se llevó a cabo el marcaje de los productos de la traducción mitocondrial *de novo* en células vivas. Las células HEK293T silvestre, los clones 5 y 35 *C6orf203* KO y sus respectivos rescates se incubaron con metionina marcada con el radioisótopo  $^{35}\text{S}$  durante 90 minutos en presencia del agente bloqueante de la traducción citoplasmática emetina. Las proteínas mitocondriales recién sintetizadas se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 17,5% y la señal se detectó mediante autorradiografía directa del mismo (Figura 41). Los resultados revelaron un defecto global en la síntesis de las proteínas mitocondriales que llega a estar disminuida hasta un 40% en los clones *C6orf203* KO respecto a la línea control y sus rescates.



**Figura 41. Biosíntesis de proteínas mitocondriales *de novo*.** La síntesis de proteínas citosólicas se inhibió con 100 µg/ml de emetina. Las proteínas mitocondriales se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina en un pulso de 90 minutos como se describe en materiales y métodos. Se separaron 50 µg de las proteínas marcadas de la línea silvestre (WT), de los clones 5 y 35 *C6orf203* KO (C5 y C35) y sus correspondientes rescates (C5-Flag y C35-Flag) mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17,5%. Se muestra una autorradiografía directa de los geles representativa. Como control de carga se realizó la tinción del gel con azul de *Coomassie* (CBS).

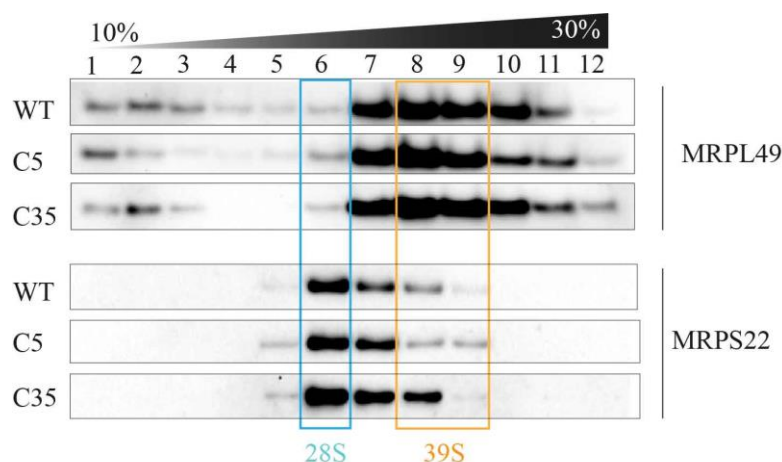
### 2.4.3.10. Evaluación de los niveles de los transcritos mitocondriales

A continuación quisimos comprobar si el déficit en la traducción mitocondrial podría deberse a un defecto en la síntesis de los transcritos mitocondriales al no encontrarse C6orf203. Tras analizar los niveles de los transcritos mitocondriales mediante RT-qPCR no pudimos observar diferencias significativas entre la línea control y los clones KO y sus respectivos rescates (datos no mostrados). Sería interesante analizar el procesamiento de los mismos para poder concluir que C6orf203 no está participando a este nivel. En la actualidad se están desarrollando experimentos de *Northern blot*, técnica mediante la cual podremos observar los diferentes transcritos mitocondriales procesados y no procesados.

### 2.4.3.11. Análisis del ensamblaje de los ribosomas mitocondriales

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis doctoral, la síntesis de proteínas en el interior de las mitocondrias se lleva a cabo en los ribosomas mitocondriales (55S), los cuales están constituidos por las subunidades menor 28S (mt-SSU) y mayor 39S (mt-LSU).

Tras haber observado la disminución en la tasa traduccional de las 13 proteínas codificadas en el ADNmt en aquellos clones deficientes de C6orf203, nos planteamos si este fallo en la maquinaria de la traducción mitocondrial podría deberse a un defecto en la biogénesis de los mitorribosomas. Con objeto de analizar el perfil de sedimentación de los ribosomas mitocondriales realizamos gradientes continuos de sacarosa del 10% al 30% (p/v). En estos gradientes se separaron mediante ultracentrifugación 800 µg de proteína procedente de extractos enriquecidos en mitocondrias tanto de la línea control como de los clones 5 y 35 *C6orf203* KO. Posteriormente, se dividieron en 12 fracciones que fueron analizadas mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* utilizando los anticuerpos MRPL49 y MRPS22 para detectar las subunidades mayor y menor de los mitorribosomas, respectivamente (Figura 42). Los resultados mostraron que la biogénesis de los ribosomas mitocondriales no se encontraba afectada pese a la ausencia de C6orf203, pudiendo concluir que el origen de la disminución en la síntesis de las proteínas mitocondriales *de novo* en los clones KO no es un defecto en el ensamblaje de los mitorribosomas. Sin embargo, no podemos descartar que la depleción de C6orf203 esté originando un defecto en la función de los mismos.



**Figura 42. Análisis del perfil de sedimentación de la subunidad mayor y menor de los ribosomas mitocondriales.** Se separaron 800  $\mu$ g de proteínas mitocondriales de la línea control (WT) y los clones 5 y 35 *C6orf203* KO (C5 y C35) en gradientes continuos de sacarosa del 10 al 30% (p/v). A continuación se recogieron 12 fracciones (1-12) que fueron precipitadas con TCA. Estas fracciones se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Se muestra *Western blot* representativo en el que se utilizaron anticuerpos específicos para reconocer la mt-LSU (MRPL49) y la mt-SSU (MRPS22).

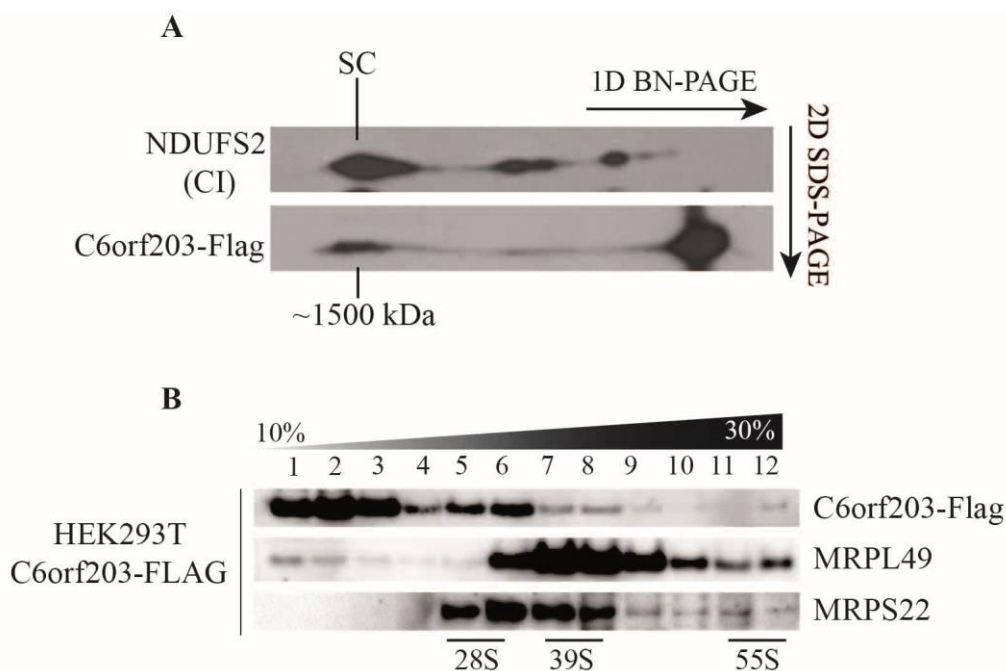
#### 2.4.4. Búsqueda de proteínas que interaccionan con C6orf203

Llegar a conocer las interacciones específicas de una proteína con función desconocida con otras de función conocida puede revelar la participación de la primera en rutas ya descritas, ahondando en el mecanismo molecular de la proteína de estudio. Por este motivo, con objeto de profundizar en el estudio de la función de C6orf203, nuestras siguientes aproximaciones se centraron en la búsqueda de posibles interactores de esta proteína.

##### - *Análisis del peso molecular de C6orf203 en condiciones nativas*

Como primera aproximación, llevamos a cabo experimentos de BN-PAGE para analizar el peso molecular que presenta C6orf203 en condiciones nativas. Para ello, utilizamos la línea celular HEK293T que sobreexpresa C6orf203-Flag. Sin embargo, mediante esta técnica no pudimos detectar la proteína C6orf203 en las condiciones utilizadas, probablemente debido a que el epítipo de la proteína que reconoce el anticuerpo no sea accesible en su conformación nativa. Por este motivo, a continuación llevamos a cabo electroforesis en segunda dimensión, 2D-BN/SDS-PAGE, técnica que permite separar en primer lugar los complejos proteicos en condiciones nativas en una primera dimensión (1D-BN-PAGE) y en segundo lugar éstos separarlos en una segunda dimensión en condiciones desnaturizantes (Figura 43A). Mediante esta técnica, pudimos observar que C6orf203-Flag se encuentra mayoritariamente formando complejos de bajo peso molecular, pero se detecta una señal constante de la proteína que se extiende hacia complejos de mayor peso molecular llegando a alcanzar los 1500 kDa, donde vuelve a verse incrementada. Mediante gradientes continuos de sacarosa, desarrollados del mismo modo que el explicado en el apartado 2.4.3.11, también confirmamos la presencia de C6orf203-Flag en complejos de alto peso molecular,

estando presente incluso en las fracciones correspondientes a los ribosomas mitocondriales completamente ensamblados (55S) o monosomas (Figura 43B).



**Figura 43. Análisis del peso molecular de C6orf203 en condiciones nativas. (A)** Análisis de C6orf203-Flag en geles 2D-BN/SDS-PAGE. Tras la separación de 80 µg de extracto mitocondrial de la línea celular que sobreexpresa C6orf203-Flag mediante 1D BN-PAGE en geles del 4 al 15% de poliacrilamida, se llevó a cabo una electroforesis en una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes (2D-BN/SDS-PAGE). La distribución de C6orf203-Flag se analizó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico que reconoce la proteína C6orf203. Se analizó también NDUFS2, subunidad del CI de la CR, como referencia de los pesos moleculares de los complejos. Se especifica la posición del supercomplejo I+III<sub>2</sub>+IV (SC) con un peso molecular aproximado de 1500 kDa. **(B)** Análisis de la distribución de C6orf203-Flag junto con proteínas del mitorribosoma en geles continuos de sacarosa. Se separaron 800 µg de proteínas procedentes de lisados mitocondriales de la línea celular HEK293T que sobreexpresa C6orf203-Flag en un gradiente continuo de sacarosa del 10% al 30% (p/v). Se recogieron 12 fracciones (1-12) y se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para C6orf203. Se detallan las fracciones correspondientes que contienen el monosoma (55S) y la subunidad menor (28S) y mayor (39S) del mitorribosoma, los cuales fueron detectados con los anticuerpos específicos MRPL49 y MRPS22, subunidades de mt-LSU y mt-SSU respectivamente.

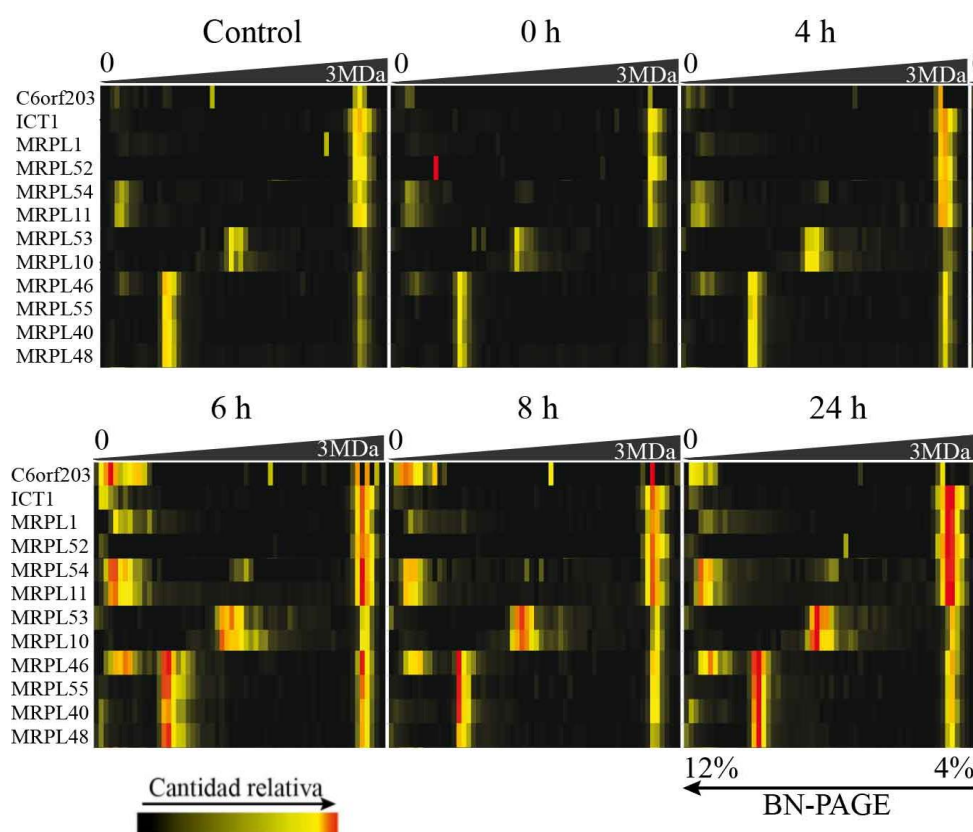
- *Análisis de la distribución de C6orf203 en condiciones nativas mediante “Complexome profiling”*

La combinación de la separación de los complejos mitocondriales mediante electroforesis en condiciones nativas (BN-PAGE) con su posterior análisis por espectrometría de masas, técnica denominada como “*Complexome profiling*”, se ha convertido en los últimos años en el método más utilizado para el estudio de los distintos macrocomplejos que se forman en el interior de este orgánulo. Esta técnica permite agrupar los diferentes perfiles proteicos en grupos o *clusters* funcionales, pudiendo identificar proteínas que potencialmente interaccionan mediante la correlación de estos perfiles y tener claves de en qué procesos podrían estar ejerciendo su función<sup>160, 218</sup>.



Aplicando esta técnica se han podido describir las distintas etapas en el ensamblaje del complejo I de la CR y su integración en los supercomplejos<sup>199</sup>. En este estudio, para sincronizar el ensamblaje del CI, trataron las células con el inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol durante 5 días a 50  $\mu\text{g/ml}$ , tiempo suficiente para observar una desaparición completa del CI totalmente ensamblado. Con el objetivo de analizar los intermediarios de ensamblaje que se producen durante la formación del CI, llevaron a cabo *Complexome profiling* de las células control 143B (línea celular derivada de osteosarcoma humano) y las células crecidas 0, 4, 6, 8, y 24 horas tras reiniciar la traducción mitocondrial al retirar el inhibidor.

Gracias a la colaboración con el Dr. Leo G. J Nijtmans pudimos obtener los datos que revelaron el comportamiento de C6orf203 bajo estas condiciones experimentales. El perfil de migración de C6orf203, al igual que para el resto de proteínas, fue agrupado jerárquicamente utilizando la herramienta Cluster 3.0<sup>219</sup>, de tal manera que los perfiles de migración similares se agruparon en diferentes grupos funcionales (Figura 44).



**Figura 44.** Perfil de migración en condiciones nativas de C6orf203 y proteínas pertenecientes a la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial tras la realización de BN-PAGE y posterior análisis mediante espectrometría de masas (*Complexome profiling*). Se muestran los perfiles de migración de la proteína C6orf203 y proteínas de la subunidad mayor del mitorribosoma (MRPLs). Estos perfiles se crearon manualmente y se les asignó un código de color normalizando las cantidades relativas con respecto a la situación control. Se muestran las células control 143B crecidas en medio DMEM completo y las células crecidas 0, 4, 6, 8, y 24 horas tras reiniciar la traducción mitocondrial al retirar el inhibidor cloranfenicol. Se muestra parte del grupo funcional donde se agrupó a C6orf203 tras su análisis mediante el algoritmo Cluster 3.0.

Tras el análisis de los perfiles, el algoritmo utilizado agrupó a C6orf203 junto con otras proteínas de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial, apareciendo en las fracciones correspondientes a dicha subunidad ensamblada, lo que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 3000 kDa. Además, pudimos observar que a las 6 horas de la retirada del cloranfenicol incrementa rápidamente la cantidad de la proteína C6orf203 recién sintetizada, aumentando considerablemente tanto los complejos de bajo peso molecular como la cantidad de proteína presente en los complejos multiproteicos correspondientes a la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial ensamblada. Estos datos corroboran que, al menos parte de C6orf203, se encuentra formando parte de complejos de alto peso molecular, muy probablemente relacionados con los ribosomas mitocondriales, apoyando los resultados que indican una posible implicación de C6orf203 en la traducción mitocondrial.

### - Inmunoprecipitación de C6orf203-Flag

Con el fin de profundizar sobre las bases molecular que subyacen en la función de C6orf203 nuestro siguiente objetivo fue determinar las proteínas con las que realmente se encuentra interaccionando C6orf203. Para ello llevamos a cabo una inmunoprecipitación de la proteína C6orf203-Flag a partir de mitocondrias aisladas de la línea que sobreexpresa esta proteína. Como control negativo partimos de las mitocondrias aisladas de la línea HEK293T silvestre. Las mitocondrias se trataron con 0,5% de laurylmaltósido y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de esta proteína con anticuerpos anti-Flag. Tras comprobar mediante *Western blot* que C6orf203-Flag se había unido correctamente al anticuerpo anti-Flag confirmando que se encontraba presente en la última fase de elución de la inmunoprecipitación, analizamos qué proteína se encontraban presentes en este eluido mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del *Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders*, gracias a la colaboración con el Dr. Leo G.J. Nijtmans.

Este análisis solo ha permitido identificar hasta el momento a MRPL48 y la subunidad del complejo V ATPB como potenciales interactores de C6orf203.

### - BioID

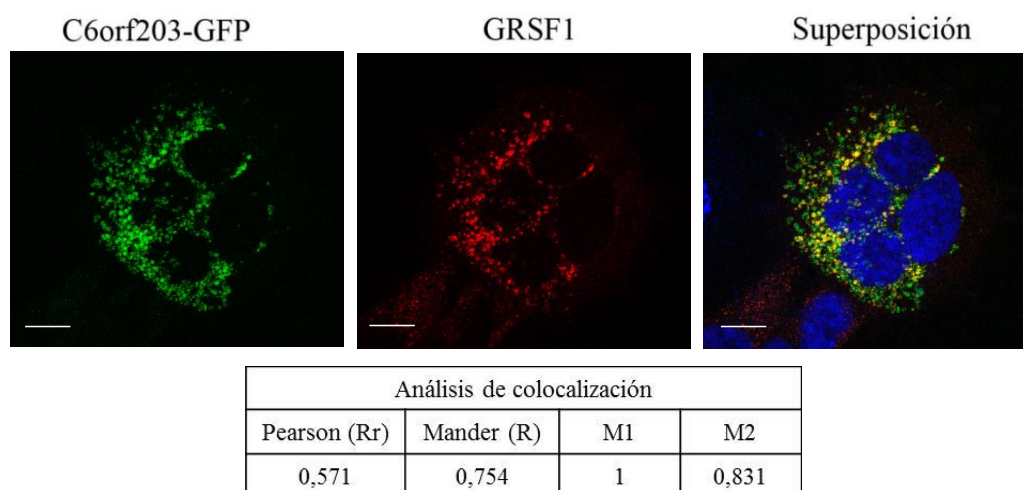
Como experimento complementario a la inmunoprecipitación empleamos la técnica denominada identificación de biotina dependiente de la proximidad, BioID (del inglés, *proximity-dependent biotin identification*) combinada con espectrometría de masas para identificar, de nuevo, proteínas asociadas físicamente o que formen complejos con C6orf203. Para ello, el ADNc de C6orf203 se clonó en el vector MCS-BioID2-HA. A continuación, la construcción de C6orf203 fusionado al dominio biotinil transferasa, BirA (C6orf203-BioID2-HA) se extrajo del plásmido y se clonó en el vector pIRESpuro2, para así conseguir una expresión estable en células HEK293T tras

su transfección. Tras añadir biotina al medio tal y como se describe en materiales y métodos la proteína C6orf203 fusionada a BirA provocará la biotinilación de proteínas próximas. Las proteínas biotiniladas fueron aisladas mediante una resina conjugada con estreptavidina y posteriormente fueron identificadas mediante espectrometría de masas. Sorprendentemente, tras el análisis pudimos observar que aparecía un número importante de proteínas nucleares implicadas en el procesamiento de ARN. Por ello, decidimos evaluar si C6orf203 podría estar teniendo una doble localización y también encontrarse en el núcleo. Experimentos preliminares han descartado esta posibilidad.

Asimismo, en este análisis pudimos encontrar de nuevo a las proteínas del complejo V, ATPA y ATPB así como a la proteína de la subunidad mayor del ribosoma MRPL48.

- *Interacción con gránulos ARN mitocondriales*

Dado nuestro interés en el dominio de unión a ARN conservado evolutivamente que presenta C6orf203 nos planteamos si esta proteína podría estar interaccionando con los gránulos de ARN mitocondriales. Para ello, volvimos a utilizar el vector de expresión que contenía el ADNc de C6orf203 fusionado a EGFP en su extremo carboxilo terminal. Realizamos una transfección transitoria de este vector en las células HEK293T y 24 horas más tarde realizamos una inmunocitoquímica con anticuerpos anti-GRSF1, proteína presente en los gránulos de ARN. A continuación, analizamos mediante microscopía confocal la colocalización de C6orf203-GFP con la proteína GRSF1 (Figura 45).



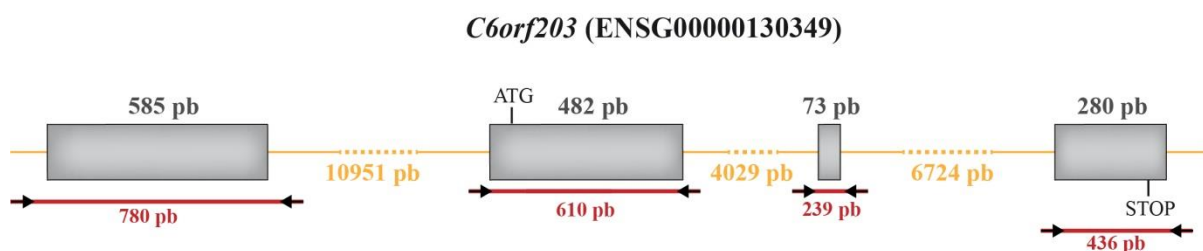
**Figura 45. Colocalización de C6orf203 con los gránulos de ARN mitocondriales en células HEK293T.** La línea celular humana HEK293T fue transfectada de manera transitoria con la proteína EGFP fusionada a la proteína C6orf203. GRSF1 se observó mediante la utilización de un anticuerpo específico. La tabla inferior muestra los resultados obtenidos del análisis mediante el plugin ICA (ImageJ) para conocer el índice de colocalización. Se muestran la correlación de Pearson y Mander. M1 hace referencia a la intensidad de señal en el canal rojo que colocaliza con el verde y M2 hace referencia a lo contrario.

Tras el análisis pudimos comprobar que GRSF1 aparece localizada en puntos discretos de la matriz, lo que correspondería con los gránulos de ARNmt. Por el contrario, C6orf203-GFP se encuentra de manera más dispersa a lo largo de la matriz mitocondrial aunque existe una colocalización parcial entre ambas señales. Pudimos concluir, por tanto, que la localización de C6orf203 en la matriz mitocondrial no se restringe únicamente a estos focos concretos donde se acumula el ARNmt, como sí lo hace GRSF1.

### 2.4.5. Búsqueda de mutaciones en el gen *C6orf203* en pacientes con déficit combinado del sistema OXPHOS

Aunque cada vez es mayor el número de mutaciones descritas en el ADN que derivan en una patología mitocondrial OXPHOS, como es el caso de la mutación en GATC descrita en esta tesis doctoral, en la actualidad solo el 20% del proteoma mitocondrial ha sido asociado a enfermedades humanas. Teniendo en cuenta además que alrededor del 20% de las proteínas mitocondriales no están caracterizadas funcionalmente, no es de extrañar que en un 50% de los pacientes diagnosticados con enfermedad mitocondrial se desconozca el gen afectado. Puesto que la ausencia de C6orf203 en la línea celular humana HEK293T provoca un déficit en la maquinaria de traducción mitocondrial, este gen es un excelente candidato a secuenciar en pacientes aún no diagnosticados que presenten una enfermedad mitocondrial causada por un déficit combinado del sistema OXPHOS.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para secuenciar tanto los exones del gen *C6orf203* como las fronteras exón-intrón del mismo (Figura 46) en una cohorte de 23 pacientes del grupo del Dr. Miguel Ángel Martín (Hospital 12 de Octubre, Madrid) que presentaban un déficit combinado de los complejos de la CR no diagnosticados. La secuenciación no reveló la presencia de mutaciones patogénicas en ninguno de ellos.



**Figura 46. Estrategia de secuenciación de *C6orf203* en pacientes con déficit combinado de los complejos de la CR no diagnosticados.** Las condiciones de PCR fueron las mismas para todos los amplicones (56°C como temperatura de anillamiento y 1 minuto de elongación). Se secuenciaron las dos cadenas del ADN de cada amplicón, que incluían las fronteras exón-intrón en todos los casos. Los exones se muestran en azul, los intrones en naranja con línea discontinua mostrando ausencia de escala, los amplicones en rojo. Las flechas negras muestran los oligonucleótidos utilizados.

## *Discusión*

---

El amplio número de procesos celulares en los que interviene la mitocondria hace que defectos en el funcionamiento de estos orgánulos y en concreto en el sistema OXPHOS provoque numerosas enfermedades. La propia naturaleza de la mitocondria, las funciones en las que participa y su genética, hacen que las manifestaciones de estas enfermedades sean clínicamente muy heterogéneas y de sintomatología muy diversa. Aunque esta gran heterogeneidad hace que el diagnóstico clínico de estas enfermedades sea muy complicado, en los últimos años nuestro conocimiento en cuanto a las bases moleculares de las enfermedades mitocondriales y su etiología genética ha avanzado considerablemente. De hecho, gracias a la aparición de las nuevas tecnologías de secuenciación, el correcto diagnóstico de las enfermedades mitocondriales originadas por mutaciones en el ADNn ha pasado de ser menor del 20% a superar el 60%<sup>111</sup>. Cada vez es mayor, por tanto, el número de mutaciones en genes conocidos asociados a patología mitocondrial aunque, en la actualidad, solo alrededor de 300 proteínas del proteoma mitocondrial de las aproximadamente 1200 que aparecen en la base de datos MitoCarta 2.0 han sido asociadas a enfermedades humanas<sup>118</sup>. Conocer el gen responsable de una patología permite en primer lugar realizar un diagnóstico adecuado, abriendo la posibilidad de proporcionar asesoramiento genético a las familias con un historial de enfermedad mitocondrial para fines reproductivos. En segundo lugar, conocer el defecto genético es el punto de partida para plantear aproximaciones terapéuticas. El análisis de los pacientes sigue siendo un método valioso para identificar y caracterizar nuevos genes mitocondriales asociados a patología, pero solo representa uno de los métodos dentro de una amplia variedad de técnicas que se utilizan en la actualidad.

Por otro lado, al hecho de que exista un 40% de los casos clínicos donde la causa genética de la enfermedad mitocondrial se desconoce, se suma que alrededor del 20% del proteoma mitocondrial aún no está caracterizado funcionalmente<sup>157</sup>. Además, pueden existir proteínas mitocondriales que todavía no están catalogadas como tales en las bases de datos, bien debido a que los sistemas de predicción son limitados, bien por la posible corta vida media de las mismas o bien porque la cantidad de proteína presente en el orgánulo sea muy reducida. Por este motivo, identificar las proteínas que constituyen el proteoma mitocondrial y caracterizarlas funcionalmente así como poder asociar sus alteraciones a una enfermedad mitocondrial representa unos de los mayores desafíos en el campo de la patología mitocondrial, lo que permitiría avanzar tanto en el conocimiento global de la función y/o disfunción de este orgánulo como en el diagnóstico de pacientes.

En estudios previos de nuestro laboratorio confirmamos que en *Drosophila melanogaster* una de las tres subunidades que constituyen la glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa mitocondrial, GatC, se encuentra codificada en un ARNm bicistrónico junto con el gen que codifica la subunidad

accesoria de la ADN polimerasa mitocondrial, *PolyB*<sup>108</sup>. Asimismo, identificamos y caracterizamos la proteína *Coa3*<sup>180</sup>, que también se encuentra codificada en un bicistrón junto al factor de traducción mitocondrial *mt-Tfb1*. Estas evidencias nos sugirieron que podría existir una tendencia a que genes que codifican proteínas mitocondriales se encuentren codificados en ARNm bicistrónicos en *Drosophila* y, por tanto, el análisis de estos bicistrones podría llegar a ser una herramienta adicional e inesperada para la identificación de nuevos genes mitocondriales. Este hallazgo se ve reforzado por diferentes estudios en los que se ha podido observar que existe más de un centenar de bicistrones en este organismo y que además éstos codifican preferentemente metiltransferasas y proteínas localizadas en la membrana interna mitocondrial<sup>184, 220</sup>.

En este trabajo de tesis doctoral hemos avanzado en ambas direcciones, tanto en la caracterización de un gen asociado por primera vez a patología mitocondrial humana, habiendo descrito la primera mutación patogénica en la proteína *GATC*, como en la identificación y caracterización de una nueva proteína mitocondrial implicada en la función OXPHOS, *C6orf203*, que en *Drosophila* se encuentra codificada en un bicistrón. Todo ello nos lleva a proponer una herramienta adicional para la identificación de nuevos genes mitocondriales asociados a patología.

### 1. Estudio molecular en fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en *GATC*

La traducción correcta y precisa del código genético a proteínas se apoya en una alta fidelidad de la aminoacilación de los ARNt. Este proceso está mediado por las aminoacil-ARNt sintetasas (ARS) las cuales catalizan la unión directa de los aminoácidos al extremo 3' de sus correspondientes ARNt tanto en el citosol como en la mitocondria. Sin embargo, en la naturaleza el Gln-ARNt<sup>Gln</sup> es sintetizado por dos vías diferentes. En el citosol eucariota y en algunas bacterias, la glutamina se une directamente a su correspondiente ARNt<sup>Gln</sup> gracias a la acción de la glutaminil-ARNt sintetasa (QARS). Sin embargo, en la mitocondria, cuyas ARS se denominan como ARS2, no existe QARS2 y el Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt se sintetiza mediante una vía indirecta que ocurre en tres etapas consecutivas. En primer lugar, el ARNt<sup>Gln</sup>-mt se carga con ácido glutámico por EARS2, formando Glu-ARNt<sup>Gln</sup>-mt. A continuación, la enzima heterotrimérica glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa, *GatCAB*, forma un intermediario activado,  $\gamma$ -fosforil-Glu-ARNt<sup>Gln</sup>, a expensas de ATP. Seguidamente, mediante una reacción de transamidación en la que utiliza el grupo amino procedente de la hidrólisis de la glutamina libre, transforma el Glu-ARNt<sup>Gln</sup>-mt en Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt, que será el que participe posteriormente en el sistema de traducción del orgánulo. En el complejo *GatCAB* de bacterias, *GatA* y *GatB* poseen la actividad glutaminasa y quinasa, respectivamente, mientras que *GatC* podría actuar como una proteína estabilizadora del complejo<sup>110</sup>.

Parece existir una tendencia a que las mutaciones en las aminoacil-ARNt sintetasas provoquen defectos en el sistema nervioso<sup>105</sup>, aunque también se han asociado a otro tipo de patologías como son: miopatías (YARS2<sup>221</sup>), insuficiencia renal (SARS2<sup>222</sup>) y cardiomiopatías (AARS2<sup>223</sup>, GARS<sup>224</sup>, KARS<sup>225</sup>). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral pudimos realizar el estudio molecular de fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel de un paciente que portaba una mutación en el gen *GATC* que, en este caso, cursaba con cardiomiopatía y acidosis láctica, falleciendo a los pocos meses de edad.

Mediante estudios de secuenciación masiva se pudo confirmar que el paciente era portador de una mutación, c.233T>G, en homocigosis en *GATC*, siendo ésta la primera vez que se observaba una mutación en este gen en humanos. Pudimos comprobar que la mutación afecta al aminoácido metionina que se encuentra en la posición 78, que cambia al aminoácido arginina (p.M78R). La arginina es un aminoácido de mayor tamaño, no posee azufre y a pH fisiológico está cargado positivamente, mientras que la metionina es un aminoácido neutro y no polar. Mediante el uso de la herramienta informática de predicción de estructuras secundarias Phyre2<sup>213</sup> pudimos observar que estas diferencias en la composición química de los aminoácidos podría provocar un cambio en su estructura secundaria, apareciendo una  $\alpha$ -hélice en esta región. Además, el análisis mediante la herramienta informática PolyPhen2<sup>209</sup> nos indicó que esta mutación es altamente patogénica. Por otro lado, al analizar su secuencia pudimos observar que la metionina en esta posición se encuentra conservada a lo largo de la evolución, sugiriendo que puede ser un aminoácido importante para la función de *GATC*.

Debido a la función esencial que tienen las ARS en la síntesis de proteínas, cabe esperar que las enfermedades originadas por mutaciones en los genes que las codifican no generen una pérdida completa de su función si no que, por el contrario, muestren una actividad remanente de las mismas, ya que una disfunción completa es letal en el embrión<sup>105, 226</sup>. Por tanto, parece razonable pensar que mutaciones en las proteínas que aminoacilan los ARNt que den lugar a individuos viables, al menos temporalmente, sean lo suficientemente dañinas para provocar un déficit importante en la actividad de la cadena respiratoria, pero lo suficientemente leves como para mantener una función parcial del enzima.

Con el objetivo de analizar la disfunción provocada por esta mutación llevamos a cabo una serie de estudios funcionales para evaluar cómo podría estar repercutiendo la mutación de una de las subunidades de la amidotransferasa *GatCAB* en la función mitocondrial que justificaran las alteraciones del paciente.

Una de las aproximaciones para evaluar el funcionamiento de la CR es la medición del consumo de oxígeno basal por la célula. La reducción del oxígeno a agua se produce en la etapa final de la



CR gracias a la acción del complejo IV. En caso de que exista una disfunción en la CR, el flujo de electrones a través de la misma no se produce con la misma eficacia y, por tanto, el consumo de oxígeno se ve disminuido. Como ya se ha comentado, GATC es una proteína implicada en la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales y, por ello, es razonable hipotetizar que un defecto funcional provoque un déficit combinado de la actividad de los complejos de la CR, alterando la función OXPHOS, como así se ha observado recientemente en pacientes portadores de una mutación en el gen *QRSL1*, que codifica la subunidad GATA del enzima GatCAB<sup>148</sup>. Así, nuestra primera aproximación fue evaluar el consumo de oxígeno en un oxígrafo de alta resolución en los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC en relación a la línea de fibroblastos control, NHDF. Pudimos observar una disminución moderada aunque significativa en el consumo de oxígeno basal de alrededor del 20%, así como una disminución en la capacidad de respiración máxima, para lo cual utilizamos FCCP, que produce un desacoplamiento entre la CR y la síntesis de ATP. El FCCP es un ionóforo capaz de transportar los protones a través de la membrana mitocondrial, lo que provoca que el gradiente de protones se disipe rápidamente aumentando bruscamente los niveles de los mismos en la matriz mitocondrial, lo que permite al complejo CIV utilizarlos al máximo de su capacidad catalítica, obteniendo, por tanto, la capacidad máxima respiratoria.

El mantenimiento del MIMP es esencial para diferentes funciones mitocondriales como son la síntesis de ATP, mitofagia, apoptosis, dinámica mitocondrial, etc. Nuestros datos muestran una disminución también moderada del MIMP, de aproximadamente el 14%, en los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC. Estos resultados concuerdan con la menor tasa respiratoria mitocondrial observada, en la que se estaría produciendo un descenso en el flujo de electrones a través de la CR que disminuye, por tanto, la cantidad de protones bombeados al espacio intermembrana. Cabe destacar que la máxima caída del MIMP que se puede observar en células carentes de ADNmt, y, por tanto, de CR, es del 35% (observación personal).

Sin embargo, sorprendentemente, no pudimos observar diferencias en la actividad *in vitro* de los complejos de la CR en los fibroblastos del paciente, aunque los estudios realizados en tejido muscular sí mostraron una menor actividad de los complejos I y IV (ver anexo). Asimismo, tampoco pudimos observar diferencias en la cantidad de los complejos del sistema OXPHOS completamente ensamblados en los fibroblastos del paciente. En este caso no se realizó este estudio en tejido muscular, no pudiendo descartar que en este tejido sí se encuentren afectados los niveles de los complejos.

La ausencia de manifestaciones fenotípicas severas en fibroblastos y su presencia en tejido muscular esquelético o cardíaco del mismo paciente es un hecho descrito ampliamente en la

literatura y se estima que solo en la mitad de los pacientes con una disfunción del sistema OXPHOS en estos tejidos muestran una deficiencia en sus fibroblastos derivados de piel<sup>227</sup>. Estos datos sugieren la menor dependencia de la mitocondria por parte de los fibroblastos, siendo células altamente glicolíticas y con menor metabolismo aerobio. Ello genera una gran desventaja a la hora de realizar estudios funcionales, ya que otros tipos celulares diferentes, salvo las células sanguíneas, son más difíciles de obtener.

Con el objetivo de comprobar el efecto de la mutación p.M78R en la proteína GATC a nivel molecular procedimos, en primer lugar, a analizar sus niveles estacionarios en los fibroblastos afectados con respecto al control. Pudimos observar que la mutación p.M78R provoca una disminución muy notable, de aproximadamente el 70%, en los niveles de esta proteína. Estos resultados sugieren una disminución en la estabilidad de GATC provocada bien por los posibles cambios estructurales que aumenten su inestabilidad o bien por generar una mayor dificultad para ensamblarse el complejo GatCAB a una proteína que ya sea inestable por sí misma. Nuestros resultados también mostraron que la caída de GATC en el paciente provoca una disminución en los niveles de GATA y GATB y que estos cambios que observábamos a nivel de proteína no estaban siendo producidos por un cambio en la expresión génica a nivel de ARNm ya que los niveles de los mensajeros no se veían afectados. Estos resultados también se pudieron observar en un trabajo previo desarrollado en nuestro laboratorio en el que se realizó la interferencia mediante ARNsi de la expresión de la proteína GatA en la línea celular de ratón MCA3B<sup>108</sup>. En este estudio se observó que al disminuir los niveles de GatA, también caían los niveles de las otras dos proteínas que conforman el complejo GatCAB: GatB y GatC. Además, estos resultados tienen un paralelismo con estudios realizados anteriormente mediante el análisis de la estructura cristalográfica de la enzima GatCAB de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*<sup>110</sup>, donde se especula que la proteína GatC podría estar actuando como una proteína estabilizadora del complejo. Por tanto, los datos sugieren que una disminución en GATC puede estar impidiendo el correcto ensamblaje de la amidotransferasa GatCAB, lo que conduce a la mayor degradación de las otras dos subunidades, GATA y GATB. Estos datos también se confirmaron en los fibroblastos derivados de un paciente portador de una mutación en el gen *GATA* en los que pudimos observar que tanto los niveles de GATB como de GATC se encontraban considerablemente disminuidos (ver anexo). En conjunto, estos resultados confirmarían que el ensamblaje del complejo GatCAB aumenta la estabilidad de las subunidades que lo conforman. Este tipo de situaciones no es inusual, y se puede ver por ejemplo en la proteína NDUFB8 del CI y UQCRC2 del CIII de la CR que, cuando se encuentra inhibida la traducción mitocondrial, al no poderse ensamblar el complejo por carecer de las subunidades mitocondriales, estas proteínas codificadas en el ADNn se degradan. Para

completar esta afirmación sería interesante analizar los niveles de GATA y GATC en células donde la proteína GATB se encuentre disminuida, así como analizar los niveles del complejo en condiciones nativas.

En estudios previos realizados con muestras de pacientes portadores de mutaciones en aminoacil-ARNt sintetetas como YARS2<sup>221</sup> y FARS2<sup>228</sup> se observó que defectos en la síntesis de los correspondientes ARNt-mt aminoacilados está asociado con una disminución de la traducción mitocondrial. Puesto que GATC participa en la síntesis de Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt es de esperar que una disminución en esta proteína produzca una afectación del proceso de biosíntesis de las proteínas mitocondriales. Para confirmarlo, los fibroblastos del paciente se incubaron con metionina marcada con el radioisótopo <sup>35</sup>S en presencia de emetina, un inhibidor de la traducción de las proteínas citosólicas. Nuestros resultados mostraron un grave defecto de la traducción mitocondrial en los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC. Un resultado esperable podría ser que aquellas proteínas con mayor contenido en glutamina se encontrasen mayormente afectadas tal y como por ejemplo se ha observado en células deficientes en YARS2, cuyas proteínas con mayor contenido en tirosina se sintetizaban con menor eficiencia que el resto<sup>229</sup>. Contrariamente, en otros estudios realizados en pacientes con una mutación en esta misma aminoacil-ARNt sintetasa se pudo observar que precisamente aquellas proteínas con menor contenido en tirosina eran las mayormente afectadas<sup>230</sup>. Cada una de las 13 proteínas codificadas en el ADNmt contiene glutamina, con la excepción de ND6, y siendo ND5 la proteína con mayor número de glutaminas en su secuencia, ya que contiene 20. En este caso no observamos diferencias en la síntesis de las diferentes proteínas mitocondriales en función de su contenido en glutamina, así como tampoco pudimos observar productos de la traducción incompletos como anteriormente se ha visto en otros estudios<sup>230</sup>. Lamentablemente no pudimos observar de una manera clara el efecto en la proteína ND6 debido a limitaciones experimentales.

A pesar de observar una disminución tan notable de la traducción mitocondrial, los niveles estacionarios de las proteínas codificadas en el ADNmt analizadas, así como otras proteínas OXPHOS codificadas en el ADNn pero cuya estabilidad depende del correcto ensamblaje del complejo al que pertenece como es NDUFB8, no mostraron diferencias. Este resultado es, en principio, sorprendente, ya que cabría esperar que los niveles basales de las proteínas mitocondriales se viesen también disminuidos debido a la fuerte afectación de la traducción mitocondrial. Sin embargo, es coherente con la ausencia de diferencias en la actividad de los complejos de la CR y en los niveles de los complejos ensamblados. Efectos similares ya se han observado anteriormente. Un ejemplo es el caso de SLIRP, una proteína que participa en la estabilidad de los ARNmt y su correcta unión a los mitorribosomas. En este estudio, utilizando

fibroblastos embrionarios de ratón y tejido muscular de ratones *knockout* de *SLIRP* se observó una reducción en la biosíntesis de las proteínas mitocondriales *de novo* pero, sin embargo, los niveles estacionarios de las subunidades de los complejos de la CR no se encontraban afectados<sup>231</sup>. Los autores sugieren que una posible interpretación a este fenómeno podría ser consecuencia de un mecanismo compensatorio que condujera a un aumento de la estabilidad de dichas proteínas. Otros resultados similares también fueron observados en el proyecto previamente mencionado desarrollado en nuestro laboratorio en el que se realizó la interferencia de la expresión de la proteína GatA de ratón. En este estudio también, pese a encontrarse la síntesis *de novo* de proteínas mitocondriales gravemente afectada, se pudieron observar los mismos niveles estacionarios de la proteína COX1 que en la línea control así como un aumento en la estabilidad de los complejos totalmente ensamblados (datos no publicados).

Por ello, nuestros resultados nos llevaron a analizar la estabilidad de las proteínas codificadas en el ADNmt. Para ello, se incubaron las células en presencia de cloranfenicol con el objetivo de inhibir la traducción mitocondrial y se recogieron a distintos tiempos hasta los 120 minutos de inhibición. En la ventana de tiempo analizada pudimos comprobar que las subunidades COX1 y COX2 codificadas en el ADNmt y NDUFB8 codificada en el ADNn, eran claramente más estables en los fibroblastos del paciente en comparación con la línea control. Estos datos, por tanto, sugerían que los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC podrían haber sufrido un proceso de adaptación con el objetivo de aumentar la estabilidad de dichas proteínas y, así, compensar el defecto en la biosíntesis de las proteínas mitocondriales.

A continuación, quisimos evaluar la cinética de recuperación de las subunidades codificadas en el ADNmt tras su depleción mediante el tratamiento con cloranfenicol. Para ello, se trataron las células con este antibiótico durante cinco días y, posteriormente, se retiró y se analizó la recuperación de los niveles de proteínas a diferentes tiempos. De nuevo, no observamos diferencias entre los fibroblastos afectados y la línea control.

Por otro lado, pudimos observar que la síntesis *de novo* de las proteínas mitocondriales en los fibroblastos del paciente no se veía apenas afectada si habían sido crecidos en cloranfenicol durante cinco días. Estos datos sugieren que, cuando la traducción mitocondrial se bloquea de manera transitoria, los precursores de la traducción mitocondrial se acumulan, incluyendo el Gln-ARNt<sup>Gln</sup>-mt, que en los fibroblastos afectados se habrá aminoacilado gracias a la actividad remanente del enzima GatCAB. Esto permite que, tras retirar el inhibidor de la traducción mitocondrial, la biosíntesis de proteínas mitocondriales en los fibroblastos afectados se produzca de manera eficiente durante las primeras horas en las que existe disponibilidad de Gln-ARNt<sup>Gln</sup>. Sin embargo, a medida que continúa la traducción de las proteínas mitocondriales, la tasa de aminoacilación del

ARNt<sup>Gln</sup>-mt con glutamina no puede mantener las demandas celulares y, por tanto, la eficiencia en la traducción se ve disminuida, como se puede observar en el marcaje a las 10 horas de la retirada del cloranfenicol. Estos datos, unidos a la evidencias del aumento de la estabilidad de las proteínas mitocondriales en los fibroblastos afectados, podrían explicar por qué no vimos diferencias en la cinética de recuperación de las proteínas mitocondriales tras el tratamiento con cloranfenicol.

Los resultados obtenidos en relación a la estabilidad de las proteínas mitocondriales en los fibroblastos afectados resultan muy interesantes, ya que podría ser de gran relevancia analizar los mecanismos subyacentes a la regulación de la estabilidad de las subunidades del sistema OXPHOS (incluyendo el intercambio o renovación de las mismas) que se producen gracias a la señalización retrógrada mitocondrial y la respuesta nuclear. Además, sería interesante evaluar si este efecto compensatorio está relacionado exclusivamente con la falta de las proteínas del complejo GatCAB o si, por el contrario, se trata de un mecanismo de respuesta más general como consecuencia del defecto de la biosíntesis de las proteínas mitocondriales.

Dado que la glutamina es un cofactor de la amidotransferasa GatCAB, es razonable hipotetizar que altos niveles de glutamina podrían estar aliviando una manifestación más severa de la actividad remanente del enzima en los fibroblastos afectados, mientras que a concentraciones menores de glutamina magnificaría la dificultad del complejo GatCAB mutante de aminoacilar el ARNt<sup>Gln</sup>-mt correctamente. Este efecto queda de manifiesto al observar que, aunque no apreciamos diferencias en la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup>-mt en las muestras del ARN del paciente cuando las células se incubaron en medio suplementado con glutamina, sí pudimos ver un grave defecto en la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup>-mt al crecer durante tres días los fibroblastos afectados en medio carente de este aminoácido en comparación con la línea control. Estos resultados demuestran que el fenotipo observado en los fibroblastos del paciente se hace más notorio bajo condiciones exigentes de la aminoacilación del ARNt<sup>Gln</sup>-mt, lo que abre la posibilidad a que un suplemento de este aminoácido se pudiese emplear como una posible aproximación terapéutica. De hecho, esta posibilidad se podría extender a cualquier patología provocada por defectos en la función de las ARS2, aunque en la actualidad no existe ningún estudio al respecto.

En las enfermedades mitocondriales se observan habitualmente distintas estrategias compensatorias para mitigar los efectos de las mutaciones que dan lugar a la patología. Entre estas estrategias se encuentran el aumento de la masa mitocondrial<sup>232</sup> o su disminución mediante mitofagia. Así como un aumento de la actividad del CII<sup>233</sup> o un aumento del número de copias del ADNmt<sup>234</sup>. En este sentido, pese haber confirmado previamente tras medir la actividad de la citrato sintasa que el nivel de masa mitocondrial en los fibroblastos del paciente no variaba en relación al control, quisimos comprobar si en los fibroblastos afectados se estaba produciendo un aumento en

el número de copias del ADNmt como efecto compensatorio. Los resultados mostraron que los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC contenían aproximadamente un 50% más de ADNmt, lo que indicaría de nuevo la presencia de una señalización retrógrada procedente de la mitocondria que provoca una respuesta compensatoria por parte del núcleo. El hecho de que un aumento en el número de copias del ADNmt no permita la recuperación de la biosíntesis de proteínas mitocondriales *de novo* en los fibroblastos del paciente muestra que debe haber otro mecanismo afectando a algún proceso entre la replicación del ADNmt y la traducción de los ARNm-mt, probablemente a nivel de la transcripción, procesamiento o estabilidad de los transcritos mitocondriales.

En resumen, en este trabajo hemos identificado a GATC como un nuevo gen asociado a patología mitocondrial humana. Hemos podido concluir que una disminución en GATA o GATC provoca a su vez una caída en los niveles del resto de las proteínas que conforman la amidotransferasa GatCAB y, por tanto, la formación de los niveles adecuados del complejo. Además, hemos comprobado que la disminución en la actividad GatCAB provoca un grave defecto en la traducción de las proteínas codificadas en el ADNmt. Estos datos corroboran la funcionalidad de la vía de transamidación en la mitocondria de humanos. El estudio detallado del fenotipo de los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R en GATC nos ha permitido comprobar que, ante el defecto en su biosíntesis, las proteínas mitocondriales aumentan su estabilidad en un intento de minimizar la afectación del sistema OXPHOS, observando una leve reducción del consumo de oxígeno y del potencial de membrana mitocondrial. Además, en los fibroblastos afectados la actividad remanente de GatCAB se vio favorecida cuando el medio contenía altos niveles de glutamina. Por último, dado que, como ya se ha comentado GatC se encuentra codificada en un ARNm bicistrónico en *Drosophila*, podemos concluir que el análisis de los bicistrones en este organismo puede servir como una herramienta adicional para identificar nuevos genes implicados en la función OXPHOS y, por tanto, potenciales candidatos a ser responsables de patologías humanas.

## 2. Identificación de C6orf203, una proteína implicada en la función OXPHOS

Con el objetivo de identificar nuevas proteínas implicadas en la función OXPHOS, el punto de partida de la segunda parte de la presente tesis doctoral se centró en la hipótesis de que podría existir una tendencia a que genes que codifican proteínas mitocondriales se encontrasen en ARNm bicistronicos en *Drosophila*. Tras realizar un primer análisis de 70 de los más de 200 genes que se estima que se encuentran en bicistrones en *Drosophila*<sup>183, 220</sup> decidimos centrar nuestra atención en la proteína CG4884 y continuar con su ortólogo humano C6orf203.

La proteína CG4884 en *Drosophila* se encuentra codificada en un ARNm bicistrónico junto con el gen que codifica la proteína CG42487, constituida por 309 aminoácidos. En procariontes se ha observado que la organización de varios genes en un mismo ARNm estaría favoreciendo una estequiometría similar de las proteínas codificadas por los mismos, así como una regulación coordinada de su expresión. Además, frecuentemente las proteínas codificadas por estos bicitrones participan en los mismos procesos o rutas metabólicas<sup>235</sup>. Sin embargo, la función de CG42487 se desconoce y no presenta ortólogos conocidos, salvo en dípteros, careciendo todos ellos de una función conocida. Por este motivo, en un principio no pudimos tener ninguna clave de la posible ruta donde podría estar participando CG4884. Tras realizar los estudios *in silico* y observar que esta proteína tenía alta probabilidad de formar parte del proteoma mitocondrial, continuamos nuestros estudios con su ortólogo humano C6orf203.

La proteína C6orf203 aparece en la base de datos del proteoma mitocondrial MitoCarta tanto de humano como de ratón y además posee un dominio conservado que pertenece a la superfamilia YlmH. La proteína YlmH solo se encuentra presente en bacterias participando en la división celular<sup>211</sup> y se caracteriza por poseer un dominio de unión a ARN tipo S4. Este dominio se encuentra en la proteína ribosomal S4 tanto procarionte como eucariota, así como en una serie de metiltransferasas procariontes y en pseudouridina sintetasas de levadura<sup>236</sup>. En humanos está presente en la tirosil-ARNt sintetasa mitocondrial (YARS2) reforzando la interacción entre el ARNt y la sintetasa<sup>237</sup>. Este dominio, por tanto, se ha observado en proteínas de unión a ARN implicadas de alguna u otra manera en el sistema de traducción.

Nuestro primer objetivo se centró en confirmar la localización mitocondrial de C6orf203 tal y como le asignaban las bases de datos. Para ello, en primer lugar utilizamos las líneas celulares HEK293T y HeLa que sobreexpresaban de manera transitoria la proteína C6orf203 fusionada a la proteína EGFP y así pudimos confirmar que la proteína mostraba una colocalización perfecta con la red mitocondrial de ambas líneas. El fraccionamiento de las mitocondrias corroboró este resultado y, además, pudimos concluir que es una proteína soluble localizada en la matriz mitocondrial.

La mayoría de las proteínas mitocondriales codificadas en el ADNn se sintetizan como precursores en los ribosomas citosólicos. Aproximadamente el 70% de estos precursores con destino a la matriz mitocondrial poseen en su extremo amino-terminal una presecuencia que dirige a estas proteínas hacia la maquinaria de importación de proteínas de la mitocondria, promoviendo su translocación a través de las dos membranas. Cuando las proteínas alcanzan la matriz mitocondrial, la presecuencia se proteoliza para finalmente dar lugar a la proteína madura que ejercerá su función en el interior del orgánulo<sup>238</sup>. La herramienta de predicción Mitoprot, le asigna a

C6orf203 una presecuencia mitocondrial de 85 aminoácidos en su extremo amino-terminal. Al analizar el peso molecular de C6orf203 en condiciones desnaturalizantes gracias a la utilización de un anticuerpo que reconoce específicamente esta proteína pudimos comprobar que C6orf203 presenta un peso molecular de 19 kDa en lugar de los 28 kDa que le asignan las bases de datos. Estos datos sugieren que C6orf203 presenta una presecuencia de destino mitocondrial de aproximadamente 85 aminoácidos (que corresponden a los 9 kDa de diferencia que observamos) que es procesada al importarse a la mitocondria para dar lugar a la proteína madura.

Durante el inicio del estudio de C6orf203 pudimos comprobar que existen dos pseudogenes de *C6orf203* localizados en el cromosoma 6 y en el cromosoma 21 que aparecen en las siguientes bases de datos: <http://pseudogene.org><sup>239</sup>, <http://gencodegenes.org/psidr/><sup>240</sup>, <http://bioinfo.mochsl.org.br/rcpedia/><sup>241</sup>. Ambos pseudogenes se clasifican como pseudogenes procesados que han resultado de un proceso de retrotranscripción del ARNm del gen parental que codifica una proteína funcional y posteriormente se insertaron en otra región del genoma en las células de la línea germinal<sup>242, 243</sup>. Se piensa que esta retrotranscripción es llevada a cabo por el retrotransposón autónomo más activo que existe en los genomas de mamíferos, el elemento L1 o LINE1<sup>244, 245</sup>. En la mayoría de las ocasiones estos pseudogenes no poseen regiones reguladoras y, al carecer de un promotor, no suelen ser funcionales. Asimismo, suelen adquirir mutaciones que cambian la pauta de lectura (como es el caso del pseudogen de *C6orf203* localizado en el cromosoma 21) o insertar codones de parada (siendo el caso del pseudogen de *C6orf203* localizado en el cromosoma 6). Sin embargo, también se ha observado que estos pseudogenes procesados pueden dar lugar a transcritos no codificantes, eventualmente regulando la expresión del gen parental<sup>246</sup>. El hecho de que el pseudogen de *C6orf203* localizado en el cromosoma 21 se encuentre en un intrón del gen *TLAM1*, podría sugerir una transcripción común<sup>247</sup>. Sin embargo, las bases de datos de pseudogenes previamente mencionadas indican que ninguno de los dos pseudogenes se transcribe, aunque no podemos descartar que jueguen algún papel en la línea celular HEK293T que hemos utilizado.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización funcional de C6orf203, llevamos a cabo la delección del gen mediante el sistema de edición genómico CRISPR/Cas9, utilizando una variante de la endonucleasa Cas9 que porta una mutación en su dominio RuvC (D10A) y actúa como *nickasa* (Cas9n). Utilizamos la Cas9n debido a que se ha descrito que mediante este sistema se disminuyen considerablemente las modificaciones en genes fuera de la diana<sup>172</sup>. Los ARNg se diseñaron específicamente para deleccionar el inicio del dominio de unión a ARN, ya que es la región que presenta mayor conservación evolutiva y muy probablemente es el dominio funcional de la proteína. La transfección de los plásmidos que contenían los ARNg junto con la Cas9n generó diferentes inserciones y delecciones en los diferentes clones aislados. Tras este análisis observamos



la aparición de más de dos amplicones de PCR por clon, pudiéndose explicar debido al hecho de que la línea celular HEK293T se ha descrito como hipotriploide<sup>215</sup>. A continuación, confirmamos que los cambios que observamos a nivel de ADN producían una afectación en la proteína, obteniendo clones deficientes de *C6orf203* (*knockout* o KO). Paralelamente, corroboramos que los pseudogenes no estaban afectados en los clones en los que íbamos a realizar los estudios funcionales.

Dado que nuestro objetivo es identificar nuevas proteínas implicadas en la función OXPHOS, nuestra primera aproximación para evaluar dicha función en los clones deficientes de *C6orf203* fue analizar su crecimiento en presencia de galactosa como fuente de carbono, ya que solo las células con una CR fisiológicamente funcional tienen la capacidad de crecer en estas condiciones<sup>248</sup>. Pudimos observar que los clones *C6orf203* KO no proliferan cuando se les suministra galactosa como única fuente de carbono, sugiriendo que el déficit de *C6orf203* provoca una disfunción en el sistema OXPHOS y, por tanto, en la producción de ATP. La ausencia de *C6orf203* provoca además un defecto menos severo en el crecimiento en presencia de glucosa, lo cual que se ha observado en numerosas ocasiones en las que el sistema OXPHOS se encuentra afectado<sup>249</sup>.

Con el objetivo de continuar el análisis de la función mitocondrial en los clones *C6orf203* KO procedimos a medir el consumo de oxígeno basal y la respiración máxima en un grupo mayor de clones deficientes de *C6orf203* y comprobamos que tanto la respiración basal como máxima se encontraban disminuidas aproximadamente un 30%, sugiriendo de nuevo el defecto en el funcionamiento de la CR. Es a partir de este momento cuando nos planteamos realizar todos los experimentos utilizando los clones 5 y 35. Nuestra primera aproximación fue confirmar la implicación de *C6orf203* en el fenotipo observado mediante el rescate del mismo con una versión de la proteína salvaje fusionada al epítipo Flag. Pudimos observar que los defectos tanto en el crecimiento en medio suplementado con galactosa como en el consumo de oxígeno son rescatados totalmente por la sobreexpresión de *C6orf203*-Flag, lo que nos indica que es la ausencia de la proteína *C6orf203* en los clones *C6orf203* KO la responsable del fenotipo observado y que la versión de la proteína fusionada a Flag es funcional.

A continuación, analizamos si la afectación de la CR que presentaban las células *C6orf203* KO era consecuencia de una disminución de la actividad de alguno de los complejos que la componen. Los resultados mostraron una caída significativa de la actividad del complejo I (~70%), del complejo III (~50%) y del complejo IV (~50%), mientras que la actividad del complejo II, cuyas todas subunidades se encuentran codificadas en el ADNn, no se vio afectada.

Esta disminución en la actividad de todos los complejos de la CR podría ser consecuencia bien de una menor cantidad de los mismos o bien de un defecto funcional. Los experimentos de BN-

PAGE mostraron la caída de los niveles de todos los complejos a excepción del CII. Asimismo, pudimos observar una acumulación de los subcomplejos del CV en ausencia de C6orf203. El CV está formado por un dominio catalítico (F1) situado hacia la matriz mitocondrial y un dominio embebido en la MIM (F0). Las únicas subunidades del CV codificadas en el ADNmt son las proteínas a y A6L, codificadas por los genes *ATP6* y *ATP8*, respectivamente, las cuales son fundamentales en la unión de ambos dominios<sup>250</sup>. Defectos de expresión de estas proteínas provocan defectos de ensamblaje del CV y acumulación de subcomplejos del CV (correspondientes al dominio F1 fundamentalmente)<sup>217</sup> que se observan frecuentemente en patologías que afectan a la eficiencia de la traducción mitocondrial<sup>216, 217</sup>. Nuestros datos sugerirían, por tanto, una alteración de este tipo.

La disminución observada en los niveles de los complejos de la CR ensamblados podría estar causada por una reducción en los niveles estacionarios de las subunidades que los componen, como así sugieren los resultados del análisis del CV. Mediante *Western blot* pudimos concluir que el descenso en la cantidad de los complejos, que da lugar a una disminución de la actividad de los mismos, es consecuencia de una reducción en los niveles de las subunidades que los conforman.

En un estudio reciente, mediante experimentos de inmunoprecipitación, se analizaron las interacciones de 50 proteínas presentes en MitoCarta que carecían de una caracterización funcional previa<sup>157</sup>. Entre las proteínas analizadas se encuentra C6orf203. Los resultados mostraron que interacciona con gran cantidad de proteínas de la subunidad mayor del mitorribosoma (MRPLs). Asimismo, en un estudio independiente se observó que ICT1, actualmente descrita como una proteína que se encuentra formando parte de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial, interacciona con C6orf203<sup>98</sup>. Estos datos son coherentes con la aparición de C6orf203 en complejos de alto peso molecular en condiciones nativas. Además, los resultados de *Complexome profiling*, desarrollado en el laboratorio del Dr. Leo G. J Nijtmans<sup>199</sup>, desvelaron que C6orf203 se encuentra formando parte del mismo grupo funcional que otras MRPLs. Del mismo modo, en otro estudio en el que desarrollaron un *Complexome profiling* de mayor resolución, cs-BN-MS (*Cryo-slicing Blue Native-Mass Spectrometry*), a partir de mitocondrias aisladas de cerebro de rata<sup>40</sup>, agruparon a C6orf203 en el mismo grupo funcional en el que aparecían MRPL46 y MRPL48, aunque no se observó en complejos de alto peso molecular. Todos estos datos sugieren que C6orf203 se puede encontrar formando parte tanto de complejos de bajo peso molecular como interaccionando con estructuras de gran tamaño. Estas estructuras corresponden muy probablemente a los mitorribosomas, componentes de la maquinaria de traducción mitocondrial.

Estas evidencias nos llevaron a plantearnos si la disminución en los niveles estacionarios de las proteínas mitocondriales en los clones *C6orf203* KO podía ser consecuencia de un fallo en su

síntesis *de novo*. Tras realizar experimentos de marcaje con metionina marcada con  $^{35}\text{S}$  pudimos observar que la ausencia de C6orf203 provoca una disminución global de la traducción mitocondrial de hasta un 40%, pese a no haber encontrado diferencias en el número de copias de ADNmt. Adicionalmente, mediante el estudio de *Complexome profiling* previamente mencionado observamos que, tras crecer las células con el inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol, a las seis horas de su retirada se ve incrementada significativamente la cantidad de la proteína C6orf203 recién sintetizada, sugiriendo, de nuevo, la participación de C6orf203 en la expresión del ADNmt, así como la posible regulación de su expresión en función de los requerimientos celulares.

Todas estas evidencias nos sugirieron que C6orf203 podría estar participando en el ensamblaje de los mitorribosomas, proceso poco caracterizado actualmente y en el que se estima que intervienen gran cantidad de proteínas aún no caracterizadas, dada la gran diferencia que existe con los numerosos factores de ensamblaje de los ribosomas citosólicos<sup>93</sup>. Sin embargo, la ausencia de C6orf203 no mostró diferencias en este proceso, pudiendo descartar que la proteína participe a este nivel. Estos datos serían coherentes con los resultados observados al analizar la biosíntesis de las proteínas mitocondriales *de novo*, ya que si realmente hubiese un fallo severo en el ensamblaje de los mitorribosomas esperaríamos observar una reducción de la misma mucho más marcada.

Tras confirmar, por tanto, que el fenotipo molecular observado era consecuencia de una reducción en la traducción mitocondrial y que ésta no estaba provocada por la disminución en los niveles de ADNmt ni en el ensamblaje de los mitorribosomas, quisimos evaluar el estado de los transcritos mitocondriales, teniendo en cuenta además el dominio de unión a ARN presente en esta proteína. Mediante RT-qPCR analizamos los niveles de los ARN-mt y tampoco pudimos observar diferencias significativas entre la línea control y los clones *C6orf203* KO.

Un trabajo reciente, en el que estudian proteínas mitocondriales no caracterizadas con dominios de unión a ARN, evalúa el procesamiento de los transcritos mitocondriales y demuestra que la interferencia de C6orf203 provoca cambios, aunque leves, en el procesamiento de algunos de los ARNm-mt<sup>251</sup>. Por ello, en primer lugar quisimos confirmar si C6orf203 se encontraba formando parte de los gránulos de ARN, región mitocondrial con muy alta actividad de procesamiento de ARNs-mt.

Cada vez son más los estudios enfocados a estudiar la composición de estas estructuras discretas de la matriz mitocondrial donde tiene lugar el procesamiento post-transcripcional de los ARNm-mt y los primeros pasos del ensamblaje de los mitorribosomas. En estas regiones se localizan proteínas implicadas tanto en el procesamiento de los ARN-mt como es FASTK<sup>75</sup> como proteínas que, además de intervenir en el procesamiento, participan en el ensamblaje de los mitorribosomas como son: FASTKD2, FASTKD5<sup>74</sup> y GRSF1. La proteína GRSF1 se ha descrito como una de las

proteínas más importantes en la regulación de estos gránulos<sup>76</sup> y , por ello, se utiliza frecuentemente como marcador de los gránulos de ARN mitocondriales. Nuestros datos demuestran que, si bien C6orf203 colocaliza con la proteína GRSF1, también se encuentra en otras regiones de la matriz mitocondrial. Por tanto, podemos concluir que la localización de C6orf203 no se restringe únicamente a los gránulos de ARN mitocondriales, aunque no podemos descartar que pueda estar ejerciendo alguna función en los mismos. Con el objetivo de continuar nuestros estudios en esta línea y evaluar el procesamiento de los ARNm-mt, en la actualidad estamos realizando experimentos de *Northern blot* y así poder descartar o confirmar la participación de C6orf203 a este nivel.

## *Conclusiones*

---

1. La mutación en homocigosis c.233T>G (p.M78R) en el gen *GATC*, que codifica la subunidad C de la enzima glutamil-ARNt<sup>Gln</sup> amidotransferasa, provoca cardiopatía y acidosis láctica incompatibles con la vida en el paciente portador. Los familiares portadores de la misma mutación en heterocigosis son asintomáticos.
2. La mutación c.233T>G (p.M78R) en el gen *GATC* provoca una disminución en los niveles estacionarios de la subunidad GATC en los fibroblastos procedentes del paciente sin alteración del nivel estacionario de su ARNm.
3. La subunidad GATC es esencial para la integridad del trímero GatCAB, ya que su disminución en los fibroblastos portadores de la mutación p.M78R provoca la caída de los niveles del resto de las subunidades que lo conforman, GATA y GATB que, por tanto, han de ser inestables en ausencia de incorporación al complejo. Esta caída cursa sin cambios en los niveles estacionarios de los respectivos ARNm.
4. La disminución en los niveles de GatCAB en los fibroblastos del paciente provoca una afectación de la síntesis de las proteínas codificadas en el ADNmt, corroborando la importancia de la vía de la transamidación en la mitocondria humana para la traducción mitocondrial. La actividad remanente de la enzima GatCAB se vio favorecida cuando el medio contenía altos niveles de glutamina.
5. La reducción en la capacidad de síntesis de las proteínas mitocondriales en los fibroblastos del paciente no tiene consecuencias apreciables en los niveles estacionarios de las mismas, probablemente debido al aumento de su estabilidad, lo que podría ser consecuencia de un mecanismo compensatorio aún desconocido.
6. El análisis de genes codificados en ARNm bicistrónicos en *Drosophila* ha dado lugar a la identificación del gen *CG4884*, al igual que permitió identificar *GATC*. El ortólogo humano de *CG4884*, *C6orf203*, codifica una proteína de aproximadamente 19kDa localizada en la matriz mitocondrial.

## Conclusiones

---

7. *C6orf203* se encuentra formando parte de complejos de alto peso molecular de más de 1000 kDa en condiciones nativas. Estos complejos corresponden con muy alta probabilidad con los ribosomas mitocondriales, así como a otros factores implicados en la traducción mitocondrial.
  
8. Mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 se ha generado la línea celular HEK293T *knockout* para el gen *C6orf203*. Esta línea presenta un defecto metabólico de base mitocondrial reflejado en su incapacidad para crecer utilizando galactosa como única fuente de carbono y en la disminución en su consumo de oxígeno.
  
9. El defecto en la función mitocondrial de las líneas *C6orf203* KO se sustenta en último término en una disminución en la capacidad de síntesis de proteínas codificadas en el ADNmt, lo que provoca una disminución en los niveles de las subunidades OXPHOS, la disminución equivalente de la cantidad de complejos OXPHOS ensamblados y finalmente la disminución en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. La disfunción de la traducción mitocondrial no es consecuencia de un defecto en el ensamblaje de los ribosomas mitocondriales ni originada por una disminución en el número de copias del ADNmt.
  
10. La secuenciación de los exones de *C6orf203* del ADN procedente de una cohorte de 23 pacientes que presentan un defecto combinado de la actividad de los complejos de la CR no ha revelado la presencia de mutaciones patogénicas en ninguno de ellos.

## *Bibliografía*

---



1. Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M.(1996). VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels*, **4**, 169–202.
2. Endo T, Yamano K.(2010). Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 706–14.
3. Neupert W.(2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: A myriad of open questions. *J Mol Biol*, **427**, 1135–58.
4. Demishtein-Zohary K, Azem A.(2017). The TIM23 mitochondrial protein import complex: function and dysfunction. *Cell Tissue Res*, **367**, 33–41.
5. Hennon SW, Soman R, Zhu L, Dalbey RE.(2015). YidC/Alb3/Oxa1 family of insertases. *J Biol Chem*, **290**, 14866–74.
6. Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L.(2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*, **41**, 261–73.
7. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G V., Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, Strooper B De, Scorrano L.(2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*, **126**, 177–89.
8. Pfanner N, Laan M van der, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, et al.(2014). Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol*, **204**, 1083–6.
9. Picard M, Shirihai OS, Gentil BJ, Burelle Y.(2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **304**, R393-406.
10. Al-Mehdi A-B, Pastukh VM, Swiger BM, Reed DJ, Patel MR, Bardwell GC, Pastukh V V., Alexeyev MF, Gillespie MN.(2012). Perinuclear Mitochondrial Clustering Creates an Oxidant-Rich Nuclear Domain Required for Hypoxia-Induced Transcription. *Sci Signal*, **5**, ra47-ra47.
11. Anesti V, Scorrano L.(2006). The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*, **1757**, 692–9.
12. Bartolák-Suki E, Imsirovic J, Nishibori Y, Krishnan R, Suki B.(2017). Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. *Int J Mol Sci*, **18**, 7–11.
13. Liu Y, Zhu X.(2017). Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener*, **6**, 21.
14. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P.(2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, **69**, 62–72.
15. Chandel NS.(2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metab*, **22**, 204–6.
16. Quirós PM, Mottis A, Auwerx J.(2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **17**, 213–26.

17. Pagliarini DJ, Rutter J.(2013). Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev*, **27**, 2615–27.
18. Tait SWG, Green DR.(2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 621–32.
19. Stefani D De, Rizzuto R.(2014). Molecular control of mitochondrial calcium uptake. *Biochem Biophys Res Commun*, **449**, 373–6.
20. Turrens JF.(2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, **552**, 335–44.
21. Ernster L, Schatz G.(1981). Mitochondria: A Historical Review. **91**, 227–55.
22. Saraste M.(1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, **283**, 1488–93.
23. Wallace DC, Fan W.(2010). Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. **10**, 12–31.
24. Alcázar-fabra M, Navas P, Brea-calvo G.(2016). Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim Biophys Acta*, **1857**, 1073–8.
25. Watmough NJ, Frerman FE.(2010). The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*, **1797**, 1910–6.
26. Mitchell P.(1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol*, **62**, 327–67.
27. Jonckheere AI, Smeitink J a M, Rodenburg RJT.(2012). Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*, **35**, 211–25.
28. Muller FL, Liu Y, Remmen H Van.(2004). Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem*, **279**, 49064–73.
29. Murphy MP.(2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, **417**, 1–13.
30. D’Autréaux B, Toledano MB.(2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 813–24.
31. Schägger H, Pfeiffer K.(2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, **276**, 37861–7.
32. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA.(2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell*, **32**, 529–39.
33. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quiros PM, Calvo E, Rodriguez-Hernandez MA, Navas P, Cruz R, Carracedo A, Lopez-Otin C, Perez-Martos A, Fernandez-Silva P, Fernandez-Vizarra E, Enriquez JA.(2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science (80- )*, **340**, 1567–70.
34. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML.(2013). Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. *Antioxid Redox Signal*, **19**, 1469–80.

35. Moreno-Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín M a., Arenas J, Barrientos A, Ugalde C.(2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab*, **15**, 324–35.
36. Schagger H.(2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, **19**, 1777–83.
37. Dudkina N V., Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun H-P.(2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 3225–9.
38. Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J.(2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, **281**, 15370–5.
39. Dudkina N V., Kudryashev M, Stahlberg H, Boekema EJ.(2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci*, **108**, 15196–200.
40. Müller CS, Bildl W, Haupt A, Ellenrieder L, Becker T, Hunte C, Fakler B, Schulte U.(2016). Cryo-slicing Blue Native-Mass Spectrometry (csBN-MS), a Novel Technology for High Resolution Complexome Profiling. *Mol Cell Proteomics*, **15**, 669–81.
41. Pérez-Pérez R, Lobo-Jarne T, Milenkovic D, Mourier A, Bratic A, García-Bartolomé A, Fernández-Vizarra E, Cadenas S, Delmiro A, García-Consuegra I, Arenas J, Martín MA, Larsson NG, Ugalde C.(2016). COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III2+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation. *Cell Rep*, **16**, 2387–98.
42. Kovářová N, Mráček T, Nůsková H, Holzerová E, Vrbacký M, Pecina P, Hejzlarová K, Křůčková K, Rohlena J, Neuzil J, Houštek J.(2013). High Molecular Weight Forms of Mammalian Respiratory Chain Complex II. *PLoS One*, **8**, 1–13.
43. Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JJ.(2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 12356–8.
44. Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-gómez JD, Kühlbrandt W.(2012). Structure of the yeast F1F0 -ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *PNAS*, **109**, 13602–7.
45. Margulis L.(1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21–38.
46. Nass MM, Nass S.(1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol*, **19**, 593–611.
47. Gray MW, Burger G, Lang BF.(1999). Mitochondrial Evolution. *Science (80- )*, **283**, 1476–81.
48. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MH de, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG.(1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457–65.
49. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N.(1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial

- DNA. *Nat Genet*, **23**, 147–147.
50. Bogenhagen D, Clayton DA.(1978). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Kinetics of synthesis and turnover of the initiation sequence. *J Mol Biol*, **119**, 49–68.
  51. Ghezzi D, Zeviani M.(2012). Assembly Factors of Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes: Physiology and Pathophysiology. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Adv Exp Med Biol*, **748**, 65–106.
  52. Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson N-G.(2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, **85**, 133–60.
  53. Lee C, Yen K, Cohen P.(2013). Humanin: A harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab*, **24**, 222–8.
  54. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim SJ, Mehta H, Hevener AL, Cabo R De, Cohen P.(2015). The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab*, **21**, 443–54.
  55. Okada AK, Teranishi K, Lobo F, Isas JM, Xiao J, Yen K, Cohen P, Langen R.(2017). The Mitochondrial-Derived Peptides, HumaninS14G and Small Humanin-like Peptide 2, Exhibit Chaperone-like Activity. *Sci Rep*, **7**, 7802.
  56. Kukat C, Wurm CA, Spahr H, Falkenberg M, Larsson N-G, Jakobs S.(2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci*, **108**, 13534–9.
  57. Bogenhagen DF.(2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*, **1819**, 914–20.
  58. Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S.(2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem*, **283**, 3665–75.
  59. Brown TA, Tkachuk AN, Shtengel G, Kopek BG, Bogenhagen DF, Hess HF, Clayton DA.(2011). Superresolution Fluorescence Imaging of Mitochondrial Nucleoids Reveals Their Spatial Range, Limits, and Membrane Interaction. *Mol Cell Biol*, **31**, 4994–5010.
  60. Stewart JB, Chinnery PF.(2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*, **16**, 530–42.
  61. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G.(2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*, **63**, 582–90.
  62. Schwartz M, Vissing J.(2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*, **347**, 576–80.
  63. Ciesielski GL, Oliveira MT, Kaguni LS.(2016). Animal Mitochondrial DNA Replication. *Enzymes*, **39**, 255–92.
  64. Pinz KG, Bogenhagen DF.(2006). The influence of the DNA polymerase  $\gamma$  accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 121–8.
  65. Krasich R, Copeland WC.(2017). DNA polymerases in the mitochondria: A critical review of the evidence. *Front Biosci*, **22**, 692–709.

66. García-Gómez S, Reyes A, Martínez-Jiménez M, Chocrón ES, Mourón S, Terrados G, Powell C, Salido E, Méndez J, Holt I, Blanco L.(2013). PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells. *Mol Cell*, **52**, 541–53.
67. Bailey LJ, Doherty AJ.(2017). Mitochondrial DNA replication : a PrimPol perspective. *Biochem Soc Trans*, **45**, 513–29.
68. Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, Falkenberg M.(2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J*, **23**, 2423–9.
69. Korhonen JA, Gaspari M, Falkenberg M.(2003). TWINKLE has 5'→3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, **278**, 48627–32.
70. Kaguni LS.(2004). DNA Polymerase  $\gamma$ , The Mitochondrial Replicase. *Annu Rev Biochem*, **73**, 293–320.
71. Minczuk M, He J, Duch AM, Ettema TJ, Chlebowski A, Dzionek K, Nijtmans LGJ, Huynen MA, Holt IJ.(2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Res*, **39**, 4284–99.
72. Hällberg BM, Larsson NG.(2014). Making proteins in the powerhouse. *Cell Metab*, **20**, 226–40.
73. Jourdain AAA, Koppen M, Wydro M, Rodley CDD, Lightowers RNN, Chrzanowska-Lightowers ZMM, Martinou J-CC.(2013). GRSF1 regulates RNA processing in mitochondrial RNA granules. *Cell Metab*, **17**, 399–410.
74. Antonicka H, Shoubridge EA.(2015). Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Rep*, **10**, 920–32.
75. Jourdain AAA, Koppen M, Rodley CDD, Maundrell K, Gueguen N, Reynier P, Guaras AMM, Enriquez JAA, Anderson P, Simarro M, Martinou J-CC.(2015). A Mitochondria-Specific Isoform of FASTK Is Present In Mitochondrial RNA Granules and Regulates Gene Expression and Function. *Cell Rep*, **10**, 1110–21.
76. Antonicka H, Sasarman F, Nishimura T, Paupe V, Shoubridge EA.(2013). The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell Metab*, **17**, 386–98.
77. Seidel-Rogol BL, McCulloch V, Shadel GS.(2003). Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat Genet*, **33**, 23–4.
78. Metodiev MD, Spähr H, Loguercio Polosa P, Meharg C, Becker C, Altmueller J, Habermann B, Larsson NG, Ruzzenente B.(2014). NSUN4 Is a Dual Function Mitochondrial Protein Required for Both Methylation of 12S rRNA and Coordination of Mitoribosomal Assembly. *PLoS Genet*, **10**, 1–11.
79. Lee KW, Bogenhagen DF.(2014). Assignment of 2'-O-methyltransferases to modification sites on the mammalian mitochondrial large subunit 16 S ribosomal RNA (rRNA). *J Biol Chem*, **289**, 24936–42.
80. Rorbach J, Boesch P, Gammage PA, Nicholls TJJ, Pearce SF, Patel D, Hauser A, Perocchi F, Minczuk M.(2014). MRM2 and MRM3 are involved in biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol Biol Cell*, **25**, 2542–55.

81. Pearce SF, Rebelo-Guiomar P, D'Souza AR, Powell CA, Haute L Van, Minczuk M.(2017). Regulation of Mammalian Mitochondrial Gene Expression: Recent Advances. *Trends Biochem Sci*, **42**, 625–39.
82. Nagaike T, Suzuki T, Katoh T, Ueda T.(2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J Biol Chem*, **280**, 19721–7.
83. Bogenhagen DF, Martin DW, Koller A.(2014). Initial steps in RNA processing and ribosome assembly occur at mitochondrial DNA nucleoids. *Cell Metab*, **19**, 618–29.
84. Rackham O, Busch JD, Matic S, Siira SJ, Kuznetsova I, Atanassov I, Ermer JA, Shearwood AMJ, Richman TR, Stewart JB, Mourier A, Milenkovic D, Larsson NG, Filipovska A.(2016). Hierarchical RNA Processing Is Required for Mitochondrial Ribosome Assembly. *Cell Rep*, **16**, 1874–90.
85. Zubay G.(1973). In Vitro Synthesis of Protein in Microbial Systems. *Annu Rev Genet*, **7**, 267–87.
86. Pelham HRB, Jackson RJ.(1976). An efficient mRNA - dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247–56.
87. Neupert W.(2016). Mitochondrial Gene Expression: A Playground of Evolutionary Tinkering. *Annu Rev Biochem*, **85**, 65–76.
88. Montoya J, Ojala D, Attardi G.(1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, **290**, 465–70.
89. Grohmann K, Amairic F, Crews S, Attardi G.(1978). Failure to detect “cap” structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, **5**, 637–51.
90. Brown A, Amunts A, Bai X -c., Sugimoto Y, Edwards PC, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V.(2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science (80- )*, **346**, 718–22.
91. Pfeffer S, Woellhaf MW, Herrmann JM, Förster F.(2015). Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat Commun*, **6**, 6019.
92. Ott M, Amunts A, Brown A.(2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem*, **85**, 77–101.
93. Mai N, Chrzanowska-Lightowlers ZM a, Lightowlers RN.(2016). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res*, **367**, 5–20.
94. Akabane S, Ueda T, Nierhaus KH, Takeuchi N.(2014). Ribosome Rescue and Translation Termination at Non-Standard Stop Codons by ICT1 in Mammalian Mitochondria. *PLoS Genet*, **10**, 1–14.
95. Temperley R, Richter R, Dennerlein S, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM.(2010). Hungry Codons Promote Frameshifting in Human Mitochondrial Ribosomes. *Science (80- )*, **327**, 301–301.
96. Greber BJ, Boehringer D, Leitner A, Bieri P, Voigts-Hoffmann F, Erzberger JP, Leibundgut

- M, Aebersold R, Ban N.(2013). Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, **505**, 515–9.
97. Brown A, Amunts A, Bai X, Sugimoto Y, Edwards PC, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V, O'Brien TW, Skladal D, Halliday J, Thorburn DR, Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Salem AF, Tsirigos A, Lamb R, Sneddon S, et al.(2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science*, **346**, 718–22.
98. Richter R, Rorbach J, Pajak A, Smith PM, Wessels HJ, Huynen MA, Smeitink JA, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM.(2010). A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J*, **29**, 1116–25.
99. Feaga H a., Quickel MD, Hankey-Giblin P a., Keiler KC.(2016). Human Cells Require Non-stop Ribosome Rescue Activity in Mitochondria. *PLoS Genet*, **12**, 1–13.
100. Ibba M, Söll D.(2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, **69**, 617–50.
101. Sheppard K, Akochy PM, Salazar JC, Söll D.(2007). The Helicobacter pylori amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNAAsn and Glu-tRNA Gln. *J Biol Chem*, **282**, 11866–73.
102. Tumbula DL, Becker HD, Chang W, Söll D.(2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature*, **407**, 106–10.
103. Frechin M, Senger B, Braye M, Kern D, Martin RP, Becker HD.(2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA<sup>Gln</sup> generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev*, **23**, 1119–30.
104. Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M.(2005). Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: Characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*, **44**, 4805–16.
105. Sissler M, González-Serrano LE, Westhof E.(2017). Recent Advances in Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases and Disease. *Trends Mol Med*, **23**, 693–708.
106. Tolkunova E, Park H, Xia J, King MP, Davidson E.(2000). The Human Lysyl-tRNA Synthetase Gene Encodes Both the Cytoplasmic and Mitochondrial Enzymes by Means of an Unusual Alternative Splicing of the Primary Transcript. *J Biol Chem*, **275**, 35063–9.
107. Chihara T, Luginbuhl D, Luo L.(2007). Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nat Neurosci*, **10**, 828–37.
108. Echevarría L, Clemente P, Hernández-Sierra R, Gallardo ME, Fernández-Moreno MA, Garesse R.(2014). Glutamyl-tRNA Gln amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo. *Biochem J*, **460**, 91–101.
109. Sheppard K, Söll D.(2008). On the Evolution of the tRNA-Dependent Amidotransferases, GatCAB and GatDE. *J Mol Biol*, **377**, 831–44.
110. Nakamura A, Yao M, Chinnaronk S, Sakai N, Tanaka I.(2006). Ammonia Channel Couples Glutaminase with Transamidase Reactions in GatCAB. *Science (80- )*, **312**, 1954–8.
111. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A,

- Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM.(2016). Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*, **2**, 16080.
112. Yan MH, Wang X, Zhu X.(2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, **62**, 90–101.
113. Valcarcel-Jimenez L, Gaude E, Torrano V, Frezza C, Carracedo A.(2017). Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends Endocrinol Metab*, **28**, 748–57.
114. Chow J, Rahman J, Achermann JC, Dattani MT, Rahman S.(2016). Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nat Rev Endocrinol*, **13**, 92–104.
115. Herrera-Cruz MS, Simmen T.(2017). Cancer: Untethering Mitochondria from the Endoplasmic Reticulum? *Front Oncol*, **7**, 9–13.
116. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, Xie HM, Dimitra C, Sarmady M, Procaccio V, Wallace DC.(2013). mtDNA Variation and Analysis Using MITOMAP and MITOMASTER. **44**, 1–49.
117. Sallevelt SCEH, Die-Smulders CEM de, Hendrickx ATM, Hellebrekers DMEI, Coo IFM de, Alston CL, Knowles C, Taylor RW, McFarland R, Smeets HJM.(2017). De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *J Med Genet*, **54**, 73–83.
118. Craven L, Alston CL, Taylor RW, Turnbull DM.(2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **18**, 257–75.
119. Taylor RW, Turnbull DM.(2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, **6**, 389–402.
120. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW.(2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*, **1797**, 113–28.
121. Wallace DC.(2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, **51**, 440–50.
122. Larsson N-G.(2010). Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annu Rev Biochem*, **79**, 683–706.
123. Garone C, Souza ARD, Dallabona C, Lodi T, Rebelo-guiomar P, Rorbach J, Donati MA, Procopio E, Montomoli M, Guerrini R, Zeviani M, Calvo SE, Mootha VK, Dimauro S, Ferrero I, Minczuk M.(2017). Defective mitochondrial rRNA methyltransferase MRM2 causes MELAS -like clinical syndrome. **0**, 1–10.
124. Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, et al.(2017). Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies. *Am J Hum Genet*, **101**, 525–38.
125. Baertling F, Al-Murshedi F, Sánchez-Caballero L, Al-Senaidi K, Joshi NP, Venselaar H, Brand MAM van den, Nijtmans LGJ, Rodenburg RJT.(2017). Mutation in mitochondrial complex IV subunit COX5A causes pulmonary arterial hypertension, lactic acidemia, and failure to thrive. *Hum Mutat*, **38**, 692–703.



126. Peng Y, Shinde DN, Valencia AC, Mo J-S, Rosenfeld J, Truitt Cho M, Chamberlin A, Li Z, Liu J, Gui B, Brockhage R, Basinger A, Alvarez-Leon B, Heydemann P, Magoulas PL, Lewis AM, Scaglia F, Gril S, Chong SC, et al.(2017). Biallelic mutations in the ferredoxin reductase gene cause novel mitochondriopathy with optic atrophy. *Hum Mol Genet*, **26**, 4937–50.
127. Renkema GH, Visser G, Baertling F, Wintjes LT, Wolters VM, Montfrans J van, Kort GAP de, Nikkels PGJ, Hasselt PM van, Crabben SN van der, Rodenburg RJT.(2017). Mutated PET117 causes complex IV deficiency and is associated with neurodevelopmental regression and medulla oblongata lesions. *Hum Genet*, **136**, 759–69.
128. Ostergaard E, Weraarpachai W, Ravn K, Born AP, Jønson L, Duno M, Wibrand F, Shoubridge EA, Vissing J.(2015). Mutations in COA3 cause isolated complex IV deficiency associated with neuropathy, exercise intolerance, obesity, and short stature. *J Med Genet*, **52**, 203–7.
129. Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM.(2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science (80- )*, **349**, 1494–9.
130. Baertling F, Sánchez-Caballero L, Brand MA van den, Fung C-W, Chan SH, Wong VC-N, Hellebrekers DME, Coo IFM De, Smeitink JA, Rodenburg RJ, Nijtmans LG.(2018). NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect. *Clin Genet*, **93**, 111–8.
131. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A.(1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*, **11**, 144–9.
132. Haut S, Brivet M, Touati G, Rustin P, Lebon S, Garcia-Cazorla A, Saudubray JM, Boutron A, Legrand A, Slama A.(2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet*, **113**, 118–22.
133. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, D'Adamo P, Gasparini P, Zeviani M.(2008). Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *Am J Hum Genet*, **82**, 1281–9.
134. Jonckheere AI, Renkema GH, Bras M, Heuvel LP van den, Hoischen A, Gilissen C, Nabuurs SB, Huynen MA, Vries MC de, Smeitink JAM, Rodenburg RJT.(2013). A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy. *Brain*, **136**, 1544–54.
135. Fassone E, Taanman J-W, Hargreaves IP, Sebire NJ, Cleary MA, Burch M, Rahman S.(2011). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF1 cause fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, **48**, 691–7.
136. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H, D'Adamo P, Gasparini P, Strom TM, Prokisch H, Invernizzi F, Ferrero I, Zeviani M.(2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat Genet*, **41**, 654–6.
137. Morán M, Marín-Buera L, Gil-Borlado MC, Rivera H, Blázquez A, Seneca S, Vázquez-López M, Arenas J, Martín MA, Ugalde C.(2010). Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat*, **31**, 930–41.

138. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, Bie I De, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA.(1998). SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*, **20**, 337–43.
139. Čížková A, Stránecký V, Mayr JA, Tesařová M, Havlíčková V, Paul J, Ivánek R, Kuss AW, Hansíková H, Kaplanová V, Vrbacký M, Hartmannová H, Nosková L, Honzík T, Drahota Z, Magner M, Hejzlarová K, Sperl W, Zeman J, et al.(2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nat Genet*, **40**, 1288–90.
140. Stumpf JD, Saneto RP, Copeland WC.(2013). Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a011395.
141. DeBalsi KL, Hoff KE, Copeland WC.(2016). Role of the mitochondrial DNA replication machinery in mitochondrial DNA mutagenesis, aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, **33**, 89–104.
142. Suárez-Rivero J, Villanueva-Paz M, la Cruz-Ojeda P de, la Mata M de, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Lavera I de, Álvarez-Córdoba M, Luzón-Hidalgo R, Sánchez-Alcázar J.(2016). Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*, **5**, 1.
143. Kang Y, Fielden LF, Stojanovski D.(2017). Mitochondrial protein transport in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*,
144. Lu Y-W, Claypool SM.(2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet*, **6**, 3.
145. Stefely JA, Pagliarini DJ.(2017). Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci*, **42**, 824–43.
146. Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, Smertenko T, Alston CL, Neeve VC, Best A, Yarham JW, Kirschner J, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Baric I, Holinski-Feder E, Abicht A, Czermin B, et al.(2014). Use of Whole-Exome Sequencing to Determine the Genetic Basis of Multiple Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *Jama*, **312**, 68.
147. Suomalainen A, Battersby BJ.(2017). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*,
148. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Bornhauser NN, Banskaya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, et al.(2016). A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet*, **12**, 1–31.
149. Valente L, Shigi N, Suzuki T, Zeviani M.(2009). The R336Q mutation in human mitochondrial EFTu prevents the formation of an active mt-EFTu·GTP·aa-tRNA ternary complex. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, **1792**, 791–5.
150. Balasubramaniam S, Choy YS, Talib A, Norsiah MD, Heuvel LP van den, Rodenburg RJ.(2011). Infantile Progressive Hepatoencephalomyopathy with Combined OXPHOS Deficiency due to Mutations in the Mitochondrial Translation Elongation Factor Gene GFM1. *JIMD Rep*, **5**, 113–22.

151. Fernandez-Vizarra E, Berardinelli A, Valente L, Tiranti V, Zeviani M.(2007). Nonsense mutation in pseudouridylate synthase 1 (PUS1) in two brothers affected by myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia (MLASA). *J Med Genet*, **44**, 173–80.
152. Haack TB, Kopajtich R, Freisinger P, Wieland T, Rorbach J, Nicholls TJ, Baruffini E, Walther A, Danhauser K, Zimmermann FA, Husain RA, Schum J, Mundy H, Ferrero I, Strom TM, Meitinger T, Taylor RW, Minczuk M, Mayr JA, et al.(2013). ELAC2 mutations cause a mitochondrial RNA processing defect associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, **93**, 211–23.
153. Scheper GC, Klok T van der, Andel RJ van, Berkel CGM van, Sissler M, Smet J, Muravina TI, Serkov S V, Uziel G, Bugiani M, Schiffmann R, Krägeloh-Mann I, Smeitink JAM, Florentz C, Coster R Van, Pronk JC, Knaap MS van der.(2007). Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet*, **39**, 534–9.
154. Tynismaa H, Schon EA.(2014). Mixing and matching mitochondrial aminoacyl synthetases and their tRNAs: A new way to treat respiratory chain disorders? *EMBO Mol Med*, **6**, 155–7.
155. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Bonch A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK.(2008). A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell*, **134**, 112–23.
156. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK.(2016). MitoCarta2.0: An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*, **44**, D1251–7.
157. Floyd BJ, Wilkerson EM, Veling MT, Minogue CE, Xia C, Beebe ET, Wrobel RL, Cho H, Kremer LS, Alston CL, Gromek KA, Dolan BK, Ulbrich A, Stefely JA, Bohl SL, Werner KM, Jochem A, Westphall MS, Rensvold JW, et al.(2016). Mitochondrial Protein Interaction Mapping Identifies Regulators of Respiratory Chain Function. *Mol Cell*, **63**, 621–32.
158. Littink KW, Hollander AI den, Cremers FPM, Collin RWJ.(2012). The Power of Homozygosity Mapping: Discovery of New Genetic Defects in Patients with Retinal Dystrophy. In: *Advances in experimental medicine and biology*. Vol 723., 2012:345–51.
159. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, Lim SC, Lieber S, Tucker EJ, Laskowski A, Garone C, Liu S, Jaffe DB, Christodoulou J, Fletcher JM, Bruno DL.(2012). Molecular Diagnosis of infantile Mitochondrial disease with Targeted Next-Generation Sequencing. *Sci Transl Med*, **4**, 1–28.
160. Heide H, Bleier L, Steger M, Ackermann J, Dröse S, Schwamb B, Zörnig M, Reichert AS, Koch I, Wittig I, Brandt U.(2012). Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex i assembly complex. *Cell Metab*, **16**, 538–49.
161. Bayona-Bafaluy MP, Sánchez-Cabo F, Fernández-Silva P, Pérez-Martos A, Enríquez JA.(2011). A genome-wide shRNA screen for new OxPhos related genes. *Mitochondrion*, **11**, 467–75.
162. Arroyo JD, Jourdain AA, Calvo SE, Ballarano CA, Doench JG, Root DE, Mootha VK.(2016). A Genome-wide CRISPR Death Screen Identifies Genes Essential for Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab*, **24**, 875–85.
163. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr

- SA, Mootha VK.(2006). Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet*, **38**, 576–82.
164. Szklarczyk R, Wanschers BF, Cuypers TD, Esseling JJ, Riemersma M, Brand MA van den, Gloerich J, Lasonder E, Heuvel LP van den, Nijtmans LG, Huynen MA.(2012). Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome c oxidase. *Genome Biol*, **13**, R12.
165. Zhang F, Wen Y, Guo X.(2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, **23**, R40-6.
166. Pennisi E.(2013). The CRISPR Craze. *Science (80- )*, **341**, 833–6.
167. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E.(2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, **60**, 174–82.
168. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C.(2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, **155**, 733–40.
169. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna J a.(2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, **482**, 331–8.
170. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, Oost J van der, Koonin E V.(2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, **9**, 467–77.
171. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J a., Charpentier E.(2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80- )*, **337**, 816–21.
172. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott D a., Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F.(2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**, 1380–9.
173. Chiang T-WW, Sage C le, Larrieu D, Demir M, Jackson SP, Jinek M, Garneau JE, Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna J a., Horvath P, Barrangou R, Ran F a., Mali P, Sander JD, Joung JK, Mali P, Esvelt KM, Church GM, et al.(2016). CRISPR-Cas9D10A nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci Rep*, **6**, 24356.
174. Lefai E, Calleja M, Ruiz de Mena I, Lagina AT, Kaguni LS, Garesse R.(2000). Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, **264**, 37–46.
175. Lefai E, Fernandez-Moreno M a, Alahari a, Kaguni LS, Garesse R.(2000). Differential regulation of the catalytic and accessory subunit genes of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, **275**, 33123–33.
176. Fernández-Moreno, Miguel A. Hernández R, Adán C, Roberti M, Bruni F, Loguercio Polosa P, Cantatore P, Matsushima Y, Kaguni LS, Garesse R.(2013). *Drosophila* nuclear factor DREF regulates the expression of the mitochondrial DNA helicase and mitochondrial transcription factor B2 but not the mitochondrial translation factor B1. **1829**, 1136–46.

177. Adán C, Matsushima Y, Hernández-Sierra R, Marco-Ferrerres R, Fernández-Moreno MA, González-Vioque E, Calleja M, Aragón JJ, Kaguni LS, Garesse R.(2008). Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila melanogaster* development. *J Biol Chem*, **283**, 12333–42.
178. Matsushima Y, Adán C, Garesse R, Kaguni LS.(2005). *Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells. *J Biol Chem*, **280**, 16815–20.
179. Peralta S, Clemente P, Sánchez-Martínez A, Calleja M, Hernández-Sierra R, Matsushima Y, Adán C, Ugalde C, Fernández-Moreno MÁ, Kaguni LS, Garesse R.(2012). Coiled coil domain-containing protein 56 (CCDC56) is a novel mitochondrial protein essential for cytochrome c oxidase function. *J Biol Chem*, **287**, 24174–85.
180. Clemente P, Peralta S, Cruz-Bermudez A, Echevarría L, Fontanesi F, Barrientos A, Fernandez-Moreno MA, Garesse R.(2013). hCOA3 stabilizes cytochrome c oxidase 1 (COX1) and promotes cytochrome c oxidase assembly in human mitochondria. *J Biol Chem*, **288**, 8321–31.
181. Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, Kaufman TC, Kellis M, Gelbart W, Iyer VN, Pollard DA, Sackton TB, Larracuente AM, Singh ND, Abad JP, Abt DN, Adryan B, Aguade M, Akashi H, et al.(2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, **450**, 203–18.
182. Lefai E, Fernandez-Moreno MA, Kaguni LS, Garesse R.(2000). The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications. *Insect Mol Biol*, **9**, 315–22.
183. Ladoukakis E, Pereira V, Magny EG, Eyre-Walker A, Couso J.(2011). Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila*. *Genome Biol*, **12**, R118.
184. Hayden CA, Bosco G.(2008). Comparative genomic analysis of novel conserved peptide upstream open reading frames in *Drosophila melanogaster* and other dipteran species. *BMC Genomics*, **9**, 61.
185. Sambrook J, Russell DW.(2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
186. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, KC B, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux KJ.(2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell*, **27**, 1188–96.
187. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA.(2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. *Science (80- )*, **339**, 819–23.
188. Hall TA.(1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, **41**, 95–8.
189. Bratic A, Clemente P, Calvo-Garrido J, Maffezzini C, Felser A, Wibom R, Wedell A, Freyer C, Wredenber A.(2016). Mitochondrial Polyadenylation Is a One-Step Process Required for mRNA Integrity and tRNA Maturation. *PLoS Genet*, **12**, 1–21.
190. Vanlander A V., Menten B, Smet J, Meirleir L De, Sante T, Paepe B De, Seneca S, Pearce SF, Powell CA, Vergult S, Michotte A, Latter E De, Vantomme L, Minczuk M, Coster R Van.(2015). Two siblings with homozygous pathogenic splice-site variant in mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase (NARS2). *Hum Mutat*, **36**, 222–31.

191. Hofhaus, G., Shakeley, R. M., and Attardi G.(1996). Use of polarography to detect respiration defects in Cell Cultures. *Methods Enzymol*, **264**, 476–83.
192. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard, Harris A.(2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, **50**, 98–115.
193. Andreu AL, Martinez R, Marti R, García-Arumí E.(2009). Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion*, **9**, 242–6.
194. Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Camaret BM de, Slama A, Lunardi J, Mazat JP, Lombès A.(2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*, **9**, 331–9.
195. Fernández-Vizarra E, Fernández-Silva P, Enríquez JA.(2006). Isolation of mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Cell Biol Four-Volume Set*, **2**, 69–77.
196. Calvaruso MA, Smeitink J, Nijtmans L.(2008). Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods*, **46**, 281–7.
197. Chomyn A.(1996). In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol*, **264**, 197–211.
198. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B.(2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, **196**, 801–10.
199. Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U, Nijtmans L.(2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab*, **25**, 128–39.
200. Claros MG, Vincens P.(1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **241**, 779–86.
201. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Heijne G von.(2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**, 1005–16.
202. Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S.(2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, **18**, 298–305.
203. Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C.(2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**, 1581–90.
204. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, et al.(2017). A subcellular map of the human proteome. *Science (80- )*, **356**, eaal3321.
205. Castro E de, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N.(2006). ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*, **34**, 362–5.
206. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang

- Z, Yamashita RA, Zhang D, et al.(2017). CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*, **45**, D200–3.
207. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang HY, Dosztanyi Z, El-Gebali S, Fraser M, Gough J, Haft D, Holliday GL, Huang H, Huang X, Letunic I, Lopez R, Lu S, Marchler-Bauer A, et al.(2017). InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res*, **45**, D190–9.
208. Heigwer F, Kerr G, Boutros M.(2014). E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*, **11**, 122–3.
209. Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A, Sunyaev S.(2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, **7**, 248–9.
210. Nagao A, Suzuki T, Katoh T, Sakaguchi Y, Suzuki T.(2009). Biogenesis of glutaminyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16209–14.
211. Miyagishima SY, Wolk PP, Osteryoung KW.(2005). Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Mol Microbiol*, **56**, 126–43.
212. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT.(2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404–5.
213. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE.(2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, **10**, 845–58.
214. Bylund L, Kytölä S, Lui W-O, Larsson C, Weber G.(2004). Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenet Genome Res*, **106**, 28–32.
215. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Roy N Van, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Peer Y Van De, Tavernier J, Callewaert N.(2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, **5**.
216. Coster R Van, Smet J, George E, Meirleir L De, Seneca S, Hove J Van, Sebire G, Verhelst H, Bleecker J De, Vlem B Van, Verloo P, Leroy J.(2001). Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis: A Powerful Tool in Diagnosis of Oxidative Phosphorylation Defects. *Pediatr Res*, **50**, 658–65.
217. Smet J, Seneca S, Paepe B De, Meulemans A, Verhelst H, Leroy J, Meirleir L De, Lissens W, Coster R Van.(2009). Subcomplexes of mitochondrial complex V reveal mutations in mitochondrial DNA. *Electrophoresis*, **30**, 3565–72.
218. Wessels HJCT, Vogel RO, Heuvel L Van Den, Smeitink JA, Rodenburg RJ, Nijtmans LG, Farhoud MH.(2009). LC-MS/MS as an alternative for SDS-PAGE in blue native analysis of protein complexes. *Proteomics*, **9**, 4221–8.
219. Hoon MJL de, Imoto S, Nolan J, Miyano S.(2004). Open source clustering software. *Bioinformatics*, **20**, 1453–4.
220. Lin MF, Carlson JW, Crosby MA, Matthews BB, Yu C, Park S, Wan KH, Schroeder AJ, Gramates LS, Pierre SE St., Roark M, Wiley KL, Kulathina RJ, Zhang P, Myrick K V., Antone J V., Celniker SE, Gelbart WM, Kellis M.(2007). Revisiting the protein-coding gene

- catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. *Genome Res*, **17**, 1823–36.
221. Sasarman F, Nishimura T, Thiffault I, Shoubridge EA.(2012). A novel mutation in YARS2 causes myopathy with lactic acidosis and sideroblastic anemia. *Hum Mutat*, **33**, 1201–6.
222. Belostotsky R, Ben-Shalom E, Rinat C, Becker-Cohen R, Feinstein S, Zeligson S, Segel R, Elpeleg O, Nassar S, Frishberg Y.(2011). Mutations in the mitochondrial Seryl-tRNA synthetase cause hyperuricemia, pulmonary hypertension, renal failure in infancy and alkalosis, HUPRA syndrome. *Am J Hum Genet*, **88**, 193–200.
223. Götz A, Tyynismaa H, Euro L, Ellonen P, Hyötyläinen T, Ojala T, Hämäläinen RH, Tommiska J, Raivio T, Oresic M, Karikoski R, Tammela O, Simola KOJ, Paetau A, Tyni T, Suomalainen A.(2011). Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, **88**, 635–42.
224. McMillan HJ, Schwartzenuber J, Smith A, Lee S, Chakraborty P, Bulman DE, Beaulieu CL, Majewski J, Boycott KM, Geraghty MT.(2014). Compound heterozygous mutations in glycyl-tRNA synthetase are a proposed cause of systemic mitochondrial disease. *BMC Med Genet*, **15**, 1–6.
225. Verrigni D, Diodato D, Nottia M Di, Torraco A, Bellacchio E, Rizza T, Tozzi G, Verardo M, Piemonte F, Tasca G, D'Amico A, Bertini E, Carozzo R.(2017). Novel mutations in KARS cause hypertrophic cardiomyopathy and combined mitochondrial respiratory chain defect. *Clin Genet*, **91**, 918–23.
226. Hilander T, Zhou X-L, Konovalova S, Zhang F-P, Euro L, Chilov D, Poutanen M, Chihade J, Wang E-D, Tyynismaa H.(2017). Editing activity for eliminating mischarged tRNAs is essential in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **46**, 849–60.
227. Thorburn DR, Chow CW, Kirby DM.(2004). Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion*, **4**, 363–75.
228. Vantroys E, Larson A, Friederich M, Knight K, Swanson MA, Powell CA, Smet J, Vergult S, Paepe B De, Seneca S, Roeyers H, Menten B, Minczuk M, Vanlander A, Hove J Van, Coster R Van.(2017). New insights into the phenotype of FARS2 deficiency. *Mol Genet Metab*, **122**, 172–81.
229. Jiang P, Jin X, Peng Y, Wang M, Liu H, Liu X, Zhang Z, Ji Y, Zhang J, Liang M, Zhao F, Sun YH, Zhang M, Zhou X, Chen Y, Mo JQ, Huang T, Qu J, Guan MX.(2016). The exome sequencing identified the mutation in YARS2 encoding the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase as a nuclear modifier for the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*, **25**, 584–96.
230. Riley LG, Cooper S, Hickey P, Rudinger-Thirion J, McKenzie M, Compton A, Lim SC, Thorburn D, Ryan MT, Giegé R, Bahlo M, Christodoulou J.(2010). Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia - MLASA syndrome. *Am J Hum Genet*, **87**, 52–9.
231. Lagouge M, Mourier A, Lee HJ, Spähr H, Wai T, Kukut C, Silva Ramos E, Motori E, Busch JD, Siira S, German Mouse Clinic Consortium, Kremmer E, Filipovska A, Larsson N-G.(2015). SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation. *PLoS Genet*, **11**, e1005423.
232. Dimauro S, Schon EA.(2003). Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med*,



- 348, 2656–68.
233. Pello R, Martín M a., Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink J a., Arenas J, Ugalde C.(2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet*, **17**, 4001–11.
  234. Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, Wallace DC, Shadel GS, Mishmar D.(2009). Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet*, **5**.
  235. Blumenthal T.(2004). Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **3**, 199–211.
  236. Aravind L, Koonin E V.(1999). Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery. *J Mol Evol*, **48**, 291–302.
  237. Bonnefond L, Frugier M, Touzé E, Lorber B, Florentz C, Giegé R, Sauter C, Rudinger-Thirion J.(2007). Crystal Structure of Human Mitochondrial Tyrosyl-tRNA Synthetase Reveals Common and Idiosyncratic Features. *Structure*, **15**, 1505–16.
  238. Mossmann D, Meisinger C, Vögtle FN.(2012). Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*, **1819**, 1098–106.
  239. Karro JE, Yan Y, Zheng D, Zhang Z, Carriero N, Cayting P, Harrison P, Gerstein M.(2007). Pseudogene.org: A comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. *Nucleic Acids Res*, **35**, 55–60.
  240. Pei B, Sisu C, Frankish A, Howald C, Habegger L, Mu XJ, Harte R, Balasubramanian S, Tanzer A, Diekhans M, Reymond A, Hubbard TJ, Harrow J, Gerstein MB.(2012). The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biol*, **13**, R51.
  241. Navarro FCP, Galante P a F.(2013). RCPedia: a database of retrocopied genes. *Bioinformatics*, **29**, 1235–7.
  242. Vanin EF.(1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet*, **19**, 253–72.
  243. Maestre J, Tchénio T, Dhellin O, Heidmann T.(1995). mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *EMBO J*, **14**, 6333–8.
  244. Esnault C, Maestre J, Heidmann T.(2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*, **24**, 363–7.
  245. Ding W, Lin L, Chen B, Dai J.(2006). L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB Life*, **58**, 677–85.
  246. Li W, Yang W, Wang XJ.(2013). Pseudogenes: Pseudo or Real Functional Elements? *J Genet Genomics*, **40**, 171–7.
  247. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H.(2006). Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 3220–5.
  248. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC.(1992). Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: A screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol*, **48**, 122–6.

## Bibliografía

---

249. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, Glasauer A, Dufour E, Mutlu GM, Budigner GS, Chandel NS.(2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*, **3**, e02242.
250. Walker JE, Dickson VK.(2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*, **1757**, 286–96.
251. Wolf AR, Mootha VK.(2014). Functional Genomic Analysis of Human Mitochondrial RNA Processing. *CellReports*, **7**, 918–31.