



**Universidad Autónoma de Madrid**



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FUNCIONAL DE NUEVAS  
MUTACIONES EN LOS GENES *MT-ATP6* Y *MT-ATP8*.**

Tesis Doctoral

Pablo Serrano Lorenzo

Madrid 2021

**Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de Contratos de Formación en Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias / Instituto de Salud Carlos III asignados a Don Pablo Serrano Lorenzo con cargo a los proyectos de investigación FIS15-00025, PI15/00431 y PI18/01374.**

## Agradecimientos

Durante los años que llevo en el hospital son muchas las personas que he tenido la suerte de conocer. En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Miguel Ángel, la confianza que siempre ha mostrado en mí, ya desde que era residente. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran grupo de investigación y gran familia que es el laboratorio de Enfermedades Mitocondriales, donde he crecido desde el punto de vista profesional y científico, pero también como persona. Gracias también por preocuparte y estar tan atento siempre de todos nosotros. También agradecer a mi co-directora, María, por los buenos consejos y la ayuda que me has brindado todos estos años, así como las aportaciones, siempre enriquecedoras, en este trabajo. Por supuesto, también agradecer a Joaquín Arenas, el padre científico de todos nosotros, por tu cercanía y disposición siempre a ayudar.

Muchas gracias a todos los compañeros del laboratorio, por ser los mejores compañeros que se puede tener, y por hacer siempre del lugar de trabajo un sitio agradable y acogedor. Gracias a Pilar, Charo y Sara por la ayuda que siempre nos brindáis y por alimentar nuestras CRM con vuestros reactivos y desayunos. Gracias a Alberto por estar siempre dispuesto a resolver todo tipo de dudas. Gracias a Laura, por la inestimable ayuda que me brindaste en mis comienzos en el laboratorio y por enseñarme todo sobre los cíbridos y tantas otras cosas. También a Esther Gallardo, por ser la madre de esos cíbridos y por tu simpatía. Gracias a Aitor por introducirme en el mundo de la bioinformática y por tus magníficos monólogos. Gracias también a Ericka por ayudar siempre que hace falta y por esa NGS de última hora. A Guillermo, por tu ayuda con los experimentos, en los cultivos, por dejarme el ordenador siempre que lo necesito y aguantar mis turras. A Adrián, gracias por haber sido tan buen R mayor, por transmitir tanta confianza y por estar siempre ahí para cualquier cosa. A los que por desgracia ya no están en el laboratorio: Jorge, José e Irene, se os echa mucho de menos.

Gracias a Montse, Paqui, Ana y Vicky, por alegrarnos con vuestra presencia los desayunos, espero que dentro de poco los podamos volver a celebrar con normalidad.

Gracias a Juan Carlos y a Chelo por vuestra ayuda con las secuencias y la NGS y a Inés por tus consejos de proteómica. Gracias a Sari, por la alegría y buenas vibraciones que siempre transmites. A los chicos de María: Sara, Miguel y Vero, por vuestra ayuda con los WB, y por darme siempre con una sonrisa los anticuerpos, aunque os los pida mil veces. Gracias a Cristina Ugalde por tus consejos y ayuda con los Blue Native, y a tus chicos Teresa, Alberto, Ana, María, Sandra y en especial a Rafa, por enseñarme la técnica con tanta dedicación y paciencia. No me quiero olvidar de los chicos de Paco ni de los compañeros de ELA, Elena, Javi, Dani y Sandra,

gracias también por estar dispuestos a ayudar siempre que hace falta. Gracias Gaba por los buenos momentos que pasamos cuando compartimos laboratorio, en pleno “quilombo del covid”.

Gracias a toda la gente de Bioquímica, con los que compartí mis primeros años en el hospital como residente. A todos los adjuntos y residentes con los que coincidí y a los que conocí después cuando vienen a rotar a Mito. En especial a mi co-R Bea, por aguantarme toda la residencia (¡yo nunca renegué de ti!). A Pablo Villalba, por tu sentido del humor, eres genial y fue una pena no poder reeditar junto con Jorge el Club de la Ciencia en Mito. Irene, por estar siempre ahí, por ofrecerme tu ayuda siempre que la necesito y saber escuchar. ¡Ojalá que esos trayectos en metro que compartimos no acaben nunca!

A mis amigos de toda la vida, Salva y Fran, gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido y por aguantar mis improperios que, como sabéis, son bien merecidos ;)

A Javi, Alex, Daniel (¿o era David?), Yusef, Miguel, Marisa, Gabriel, Gorka gracias también por vuestra amistad, por esos inolvidables viajes a Japón y Oslo, y por aguantar mis “otras tesis”, ya sabéis, la de los tifones o la estatura de los medievales.

A mis compañeros de Químicas, Silvia, Adri, Mónica, Iker, Vichy, gracias también por todos los buenos momentos que hemos pasado y, espero, volveremos a pasar cuando se normalice todo.

Bueno, creo que no me olvido de nadie (me da pánico solo pensarlo) y ya puedo pasar a mi familia, ¿verdad? Que noooooo, dicen que lo mejor se suele dejar para el final y por eso llega ahora tu turno. Gracias Rocío (¡ay, mi Rocío!), todo lo dicho hasta ahora bien podría decírtelo a ti: la ayuda inestimable con experimentos, temas técnicos, científicos o filosóficos, el estar siempre ahí y tu granito de arena (o roca, en tu caso) para hacer del laboratorio un lugar agradable donde trabajar. Gracias especialmente por tu apoyo moral estos últimos días de locura. Buena parte de esta tesis es también tuya.

Por último, ahora sí, gracias a mi familia: tíos, tías, primos y primas, tanto los gallegos como los castellanos. Y muy especialmente a mi hermana, por apoyarme y aguantarme, a mi padre, por los buenos consejos que siempre nos das (la cita de la tesis va por ti), a mi madre, por inculcarme desde pequeño el amor por la ciencia y la biología (si estoy ahora escribiendo esto es por ti), gracias por el cariño que siempre nos has dado. ¡Os quiero a los tres!

«Dios mueve al jugador, y éste, la pieza.  
¿Qué Dios detrás de Dios la trama empieza?»

**Jorge Luis Borges**

A mis padres

A mi hermana

## **RESUMEN/ABSTRACT**

Las enfermedades mitocondriales son un conjunto heterogéneo de enfermedades raras causadas por mutaciones en genes (>350) que codifican proteínas involucradas en la estructura, biogénesis y mantenimiento de los complejos del sistema OXPHOS. Las deficiencias del complejo V (CV) son unas de las menos frecuentes y aún no se conocen completamente sus mecanismos fisiopatológicos. El objeto de esta tesis fue profundizar en el conocimiento clínico y genético de los defectos de CV, así como en los efectos moleculares y celulares provocados por mutaciones en los dos genes del CV, *MT-ATP6* y *MT-ATP8*, localizados en el ADN mitocondrial (mtDNA).

Se estudió una cohorte de 67 pacientes con mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8*, en la que se identificaron 13 mutaciones distintas, siendo las mutaciones más frecuentes la m.8993T>G y la m.9176T>C en el gen *MT-ATP6*, que se encontraron en 42 individuos (63%). El análisis de la relación genotipo-fenotipo mostró dos hallazgos relevantes para el contexto clínico y genético-molecular: i) la mutación m.9176T>C presentó un menor efecto patogénico que otras variantes patogénicas descritas en el gen *MT-ATP6*, debido a que se encontró en mayor proporción en individuos asintomáticos que en pacientes sintomáticos; además, el nivel medio de heteroplasmia en el grupo de asintomáticos fue el más elevado respecto al resto de las variantes identificadas, y ii) se identificaron nuevos fenotipos clínicos asociados a mutaciones en el gen *MT-ATP8*.

Por otra parte, se desarrollaron modelos celulares de cíbridos transmitocondriales derivados de pacientes con el fin de caracterizar las consecuencias funcionales y estructurales sobre el CV inducidas por una selección de mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8*, previamente identificadas en la cohorte del objetivo anterior. En el estudio de mutaciones en el gen *MT-ATP8* se analizaron los efectos sobre la función, estructura, ensamblaje y oligomerización del CV de dos mutaciones, una *nonsense* (m.8391G>A; p.Trp9Ter) y otra de tipo *missense* (m.8424T>C; p.Leu20Pro) en este gen. Se observó una menor actividad enzimática ATPasa del CV, una menor estabilidad del monómero de CV provocada por una desestabilización de los componentes del tallo periférico, y una menor capacidad de formación de dímeros y otros oligómeros superiores del CV. La comparación de estos dos modelos celulares mostró que la presencia de la subunidad codificada por el gen *MT-ATP8* en el CV, aunque esté alterada estructuralmente por la presencia de una mutación, es capaz de estabilizar el tallo periférico en el monómero y confirmó la implicación de esta subunidad en la formación o estabilización de sus oligómeros. En el estudio de mutaciones en el gen *MT-ATP6* se evaluó la contribución fenotípica de la mutación frecuente m.9176T>C, utilizando para ello un portador de dos variantes, m.9176T>C y m.8959G>A y otro portador de la variante m.9176T>C aislada en el gen *MT-ATP6*. Los resultados de los parámetros de función mitocondrial analizados mostraron que la variante m.9176T>C no parece tener un marcado impacto funcional y estructural sobre el CV, un hallazgo consistente con la menor capacidad patogénica de esta mutación observada en el estudio de la cohorte de pacientes.



Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of rare diseases caused by mutations in the genes that encode proteins involved in the structure, biogenesis and maintenance of the OXPHOS system. Pathogenic mutations have been described in more than 350 genes encoded by nuclear DNA or mitochondrial DNA (mtDNA). OXPHOS diseases involving complex V (CV) deficiency are one of the less frequent, and the pathophysiological mechanisms are not yet fully understood. The purpose of this thesis was to expand the clinical and genetic knowledge of CV deficiencies, as well as the molecular and cellular effects caused by mutations in the two mitochondrial genes coding for the subunits of CV, *MT-ATP6* and *MT-ATP8*.

The first part of this thesis has focused on the study of a cohort of 67 patients with mutations in the *MT-ATP6* and *MT-ATP8* genes. Thirteen different mutations were identified, being the most frequent the m.8993T>G and the m.9176T>C in the *MT-ATP6* gene, which were found in 42 individuals (63%). Genotype-phenotype analysis showed two relevant findings in the clinical and genetic-molecular context: i) the m.9176T>C mutation displayed a lower pathogenic effect than other pathogenic variants described in the *MT-ATP6* gene, as it was found in higher proportion in the group of asymptomatic individuals compared to the group of symptomatic patients. In addition, the mean level of heteroplasmy in the asymptomatic group was the highest with respect to that found in all other variants identified in this group; and ii) the association of new clinical phenotypes with mutations in the *MT-ATP8* gene.

The second objective of this thesis has centred on the development of cell models of transmitochondrial cybrids from patients to characterize the functional and structural consequences in CV induced by selected mutations in the *MT-ATP6* and *MT-ATP8* genes, previously identified in the cohort. Two mutations in the *MT-ATP8* gene were analysed, a nonsense (m.8391G>A; p.Trp9Ter) and a missense (m.8424T> C; p.Leu20Pro), to study their effects on the function, structure, assembly and oligomerization of the CV. With regard to controls, a lower ATPase enzymatic activity of CV, a lower stability of the CV monomer caused by a destabilization of the peripheral stalk components, and a lower capacity of dimer and other oligomers formation were observed. The comparison of these two cell models showed that the presence of the subunit encoded by the *MT-ATP8* gene in the CV, although structurally altered by the presence of a mutation, is capable of stabilizing the peripheral stalk in the monomer and confirmed the involvement of this subunit in the formation or stabilization of its oligomers. Moreover, the phenotypic contribution of the frequent mutation m.9176T>C was evaluated, using cell models carrying either two variants, the m.9176T>C and the m.8959G>A, or only the m.9176T>C variant, both in the *MT-ATP6* gene. The results showed that the m.9176T> C variant does not seem to have a marked functional and structural impact on CV, a finding consistent with the milder pathogenic potential of this mutation observed in the cohort study.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN/ABSTRACT .....                                     | 1  |
| ÍNDICE .....   | 5  |
| ABREVIATURAS .....   | 11 |
| INTRODUCCIÓN .....   | 15 |
| 1. La mitocondria: origen, estructura y funciones .....    | 17 |
| 2. Genética mitocondrial .....                             | 18 |
| 3. Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....        | 20 |
| 3.1. Complejo I (EC1.6.5.3) .....                          | 21 |
| 3.2. Complejo II (EC1.3.5.1) .....                         | 21 |
| 3.3. Complejo III (EC1.10.2.2) .....                       | 22 |
| 3.4. Complejo IV (EC1.9.3.1).....                          | 22 |
| 3.5 ATP Sintasa o Complejo V (EC 3.6.14).....              | 22 |
| 3.5.1 Ensamblaje del CV.....                               | 25 |
| 3.5.2 Oligomerización del complejo V.....                  | 26 |
| 4. Organización en supercomplejos del sistema OXPHOS ..... | 27 |
| 5. Enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS.....     | 28 |
| 5.1. Clasificación de las enfermedades mitocondriales..... | 29 |
| 5.1.1. Deficiencias del complejo I .....                   | 29 |
| 5.1.2. Deficiencias del complejo II .....                  | 30 |
| 5.1.3. Deficiencia del complejo III .....                  | 30 |
| 5.1.4. Deficiencias del Complejo IV .....                  | 30 |
| 5.1.5. Deficiencias del complejo V.....                    | 31 |
| 6. Modelo celular de cíbridos transmitocondriales.....     | 33 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....                                | 35 |
| MATERIAL Y MÉTODOS .....                                   | 39 |
| 1. Pacientes.....  | 41 |
| 1.1 Pacientes .....  | 41 |
| 1.2 Líneas celulares.....                                  | 44 |
| 1.3 Reactivos, soluciones y medios de cultivo.....         | 45 |
| 1.4 Oligonucleótidos .....                                 | 48 |
| 1.5 Anticuerpos .....                                      | 48 |
| 1.6 Equipos .....  | 49 |
| 2. Métodos.....  | 49 |

|     |   |           |
|-----|---|-----------|
| 2.1 | Estudio de la cohorte de pacientes con mutaciones en el CV .....  | 49        |
| 2.2 | Aislamiento de ADN genómico a partir de músculo y sangre .....  | 50        |
| 2.3 | Amplificación y Secuenciación directa .....   | 50        |
| 2.4 | Secuenciación mtDNA completo por NGS.....   | 51        |
| 2.5 | Generación de cíbridos transmitocondriales .....  | 55        |
| 2.6 | Caracterización molecular de las líneas celulares .....   | 57        |
| 2.7 | Caracterización funcional de las líneas celulares .....   | 59        |
| 2.8 | Análisis estadístico .....  | 67        |
|     | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>70</b> |
| 1.  | Estudio de una cohorte de pacientes con mutaciones en los genes <i>MT-ATP6</i> y <i>MT-ATP8</i> del complejo V del sistema OXPHOS. .... | 71        |
| 1.1 | Características genóticas de los pacientes de la cohorte.....   | 72        |
| 1.2 | Características fenotípicas de los pacientes de la cohorte .....  | 74        |
| 2.  | Paciente 1: Caracterización genético-molecular.....   | 77        |
| 2.1 | Paciente 1: Estudio molecular y bioquímico de la variante m.8391G>A en cíbridos transmitocondriales .....                               | 77        |
| a)  | Estudio del número de copias de mtDNA .....   | 78        |
| b)  | Tasa de proliferación celular.....  | 78        |
| c)  | Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa .....   | 79        |
| d)  | Estudios Bioenergéticos .....   | 80        |
| e)  | Niveles de proteínas OXPHOS .....   | 82        |
| f)  | Estudio de Ensamblaje.....  | 84        |
| g)  | Análisis de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) .....  | 85        |
| h)  | Análisis del Potencial de Membrana .....  | 86        |
| i)  | Análisis de la ultraestructura mitocondrial.....  | 86        |
| 3.  | Paciente 2: Caracterización genético-molecular.....   | 88        |
| 3.1 | Paciente 2: Estudio molecular y bioquímico de la variante m.8424T>C en cíbridos transmitocondriales .....                               | 89        |
| a)  | Estudio del número de copias de mtDNA .....   | 90        |
| b)  | Tasa de proliferación celular.....  | 90        |
| c)  | Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa .....   | 91        |
| d)  | Estudios Bioenergéticos .....   | 92        |
| e)  | Niveles de proteínas OXPHOS .....   | 94        |
| f)  | Estudio de Ensamblaje.....  | 96        |
| g)  | Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....   | 98        |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| h)  | Análisis del Potencial de Membrana .....   | 98  |
| i)  | Análisis morfológico mitocondrial .....  | 99  |
| 4.  | Paciente 3: Caracterización genético-molecular.....  | 100 |
| 4.1 | Paciente 3: Estudio molecular y bioquímico de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A en cíbridos trasnmitocondriales .....      | 102 |
| a)  | Estudio del número de copias de mtDNA .....  | 102 |
| b)  | Tasa de proliferación celular.....   | 103 |
| c)  | Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa .....  | 103 |
| d)  | Estudios Bioenergéticos .....  | 105 |
| e)  | Niveles de proteínas OXPHOS .....  | 105 |
| f)  | Estudio de ensamblaje.....   | 108 |
| f)  | Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....   | 110 |
| g)  | Análisis del Potencial de Membrana .....   | 110 |
|     | DISCUSIÓN.....   | 111 |
| 1.  | Estudio cohorte de pacientes con mutaciones en los genes del ADN mitocondrial que codifican subunidades del complejo V ..... | 113 |
| 2.  | Caracterización bioquímica, molecular y funcional de la variante m.8391G>A en el gen <i>MT-ATP8</i> .....                    | 115 |
| 3.  | Caracterización bioquímica, molecular y funcional de la variante m.8424T>C en el gen <i>MT-ATP8</i> .....                    | 119 |
| 4.  | Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A en el gen <i>MT-ATP6</i> .....      | 121 |
|     | CONCLUSIONES .....   | 125 |
|     | BIBLIOGRAFÍA.....  | 129 |

## ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| ADP               | Adenosin disfosfato   |
| ATP               | Adenosin trifosfato   |
| BNE               | Electroforesis azul nativa  |
| CI                | Complejo I o NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidorreductasa   |
| CII               | Complejo II o succinato:ubiquinona oxidorreductasa  |
| CIII              | Complejo III o ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa  |
| CIV               | Complejo IV o citocromo c oxidasa   |
| CoQ               | Coenzima Q <sub>10</sub> , oxidado o ubiquinona   |
| CoQH <sub>2</sub> | Coenzima Q <sub>10</sub> , reducido o ubiquinol   |
| CRM               | Cadena respiratoria mitocondrial  |
| CS                | Citrato sintasa   |
| CV                | Complejo V o ATP Sintasa  |
| DA-DCF            | Diacetato-diclorofluoresceina   |
| DMEM              | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>   |
| FCCP              | Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona   |
| HPO               | <i>Human Phenotype Ontology</i>   |
| KDa               | Kilodalton  |
| LHON              | Neuropatía óptica hereditaria de Leber  |
| L-PCR             | PCR larga   |
| MDa               | Megadalton  |
| MELAS             | Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a los accidentes cerebrovasculares |
| MME               | Membrana mitocondrial externa   |
| MMI               | Membrana mitocondrial interna   |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado  |

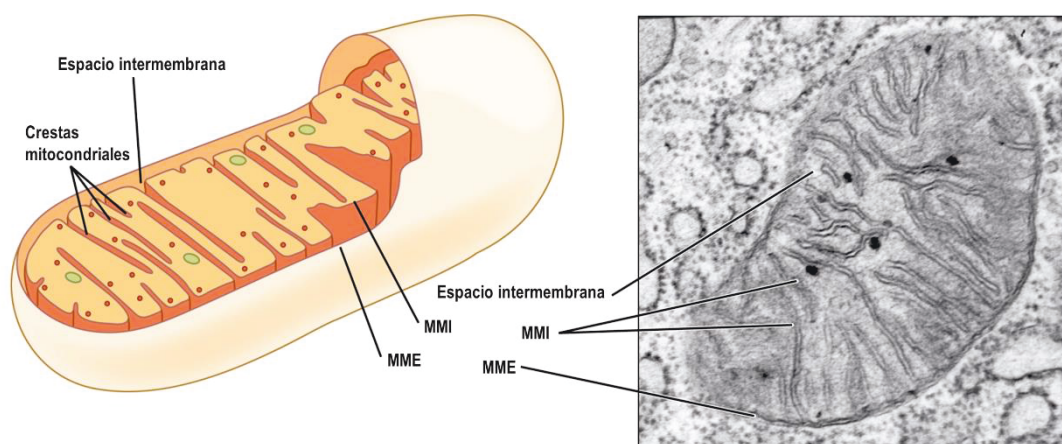
|  |   |
|--|---|
| NADH                                     | Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido                       |
| NARP                                     | Debilidad muscular neurogenética, ataxia y retinitis pigmentosa   |
| NGS                                      | Secuenciación masiva paralela o <i>Next-Generation Sequencing</i> |
| OCR                                      | Tasa de consumo de oxígeno  |
| OXPHOS                                   | Fosforilación oxidativa   |
| pb                                       | Pares de bases  |
| PBS                                      | Tampón fosfato salino   |
| PCR                                      | Reacción en cadena de la polimerasa                               |
| PEG                                      | Polietilenglicol  |
| qPCR                                     | PCR cuantitativa  |
| ROS                                      | Especies reactivas de oxígeno                                     |
| SC                                       | Supercomplejos  |
| SC I+III <sub>2</sub> +IV <sub>1-2</sub> | Respirasoma   |
| SDS-PAGE                                 | Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS                     |
| TBS                                      | Tampón tris salino  |
| TM                                       | Temperatura de fusión   |
| TMRM                                     | Tetra-metil rodamina etil éster                                   |
| WB                                       | <i>Western Blot</i>   |
| WT                                       | Fenotipo o genotipo silvestre (del inglés “ <i>wild-type</i> ”)   |



# INTRODUCCIÓN

## 1. La mitocondria: origen, estructura y funciones

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares presentes en la mayoría de células eucariotas. Según la teoría endosimbiótica las mitocondrias surgieron hace más de dos mil millones de años a partir de la absorción de una  $\alpha$ -proteobacteria por un precursor de la célula eucariota moderna<sup>1,2</sup>, por lo que se ha postulado que el origen de las mitocondrias y el de la célula eucariota podría formar parte del mismo evento<sup>3,4</sup>. Estructuralmente, las mitocondrias poseen dos membranas, la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI) la cual se curva formando invaginaciones conocidas como crestas mitocondriales<sup>5</sup>. La MME y la MMI delimitan dos compartimentos, el espacio entre las dos membranas llamado espacio intermembrana y la matriz mitocondrial delimitado por la MMI<sup>6</sup>. La MME interviene en el intercambio de metabolitos y proteínas entre la mitocondria y el resto de la célula eucariota<sup>7</sup>, mientras que en la MMI, concretamente en las crestas mitocondriales, es donde se localiza el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)<sup>8</sup>, que es responsable de la mayor parte de la producción de ATP celular<sup>9</sup>. En la matriz mitocondrial está ubicado el ADN mitocondrial (mtDNA), siendo el único orgánulo celular que posee su propio material genético, vinculado a su origen bacteriano<sup>10</sup>. En la matriz mitocondrial además tienen lugar rutas metabólicas como el ciclo de Krebs o la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos<sup>11</sup> y otros procesos relacionados con la replicación, reparación, y transcripción del mtDNA<sup>12</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estructura de la mitocondria. En la parte izquierda se representa un esquema con las partes principales de la estructura mitocondrial. En la parte derecha se muestra una imagen de una mitocondria realizada con microscopía electrónica. **MMI**: membrana mitocondrial interna; **MME**: membrana mitocondrial externa. *Figura adaptada de Textbook OpenStax Anatomy and Physiology. Imagen utilizada bajo licencia Creative Commons BY 4.0.*

Las mitocondrias no se encuentran como orgánulos aislados dentro de la célula, sino que se comportan de forma dinámica, fusionándose y dividiéndose según las necesidades celulares<sup>13</sup>.

La principal función de las mitocondrias es la producción de energía en forma de ATP a través del sistema OXPHOS, motivo por el cual se las conoce como la “central energética de la célula”. Sin embargo, ésta no es su única función, puesto que participa en otros procesos bioquímicos y celulares tales como el metabolismo de aminoácidos, ciclo de la urea, biosíntesis del grupo hemo, homeostasis del calcio, regulación de la apoptosis celular, metabolismo de nucleótidos, y transporte de metabolitos<sup>14-16</sup>.

## 2. Genética mitocondrial

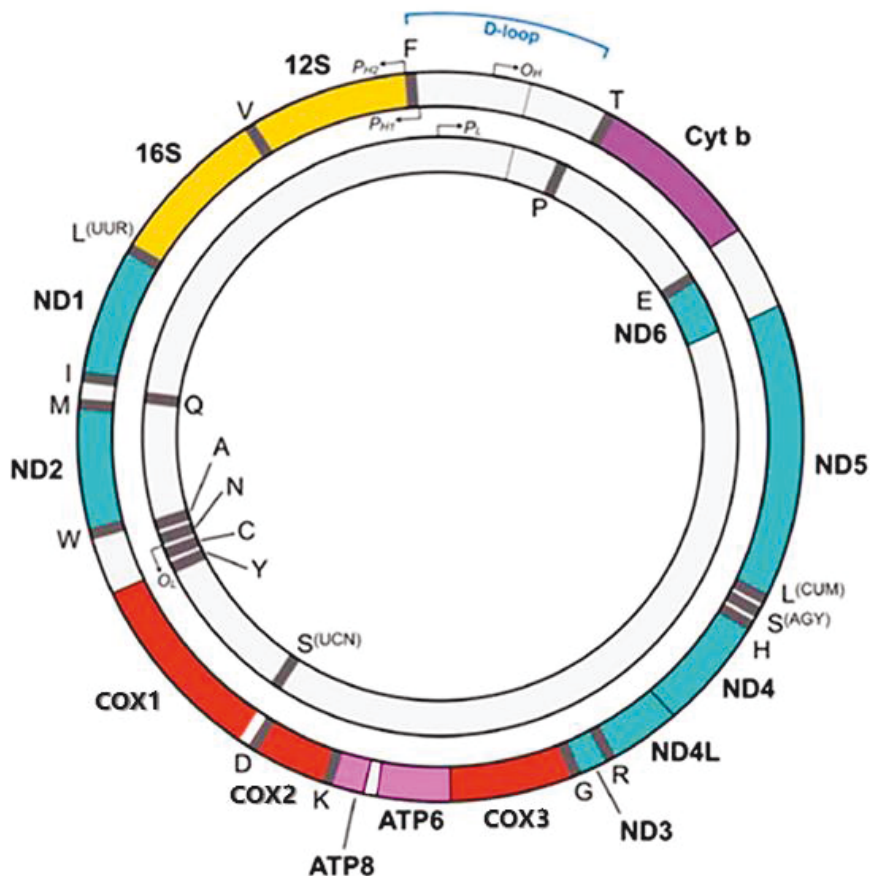
Como se ha mencionado, las mitocondrias contienen su propio material genético, el mtDNA, que, a diferencia del ADN nuclear (nDNA), se hereda en la especie humana de forma materna y está presente en múltiples copias por célula (puede existir desde 100 copias de mtDNA a varios miles dependiendo de las necesidades energéticas de cada tejido)<sup>10,17</sup>. El mtDNA humano es una molécula de ADN bicatenario y circular de 16.569 pb que se replica de forma autónoma, en la cual no se producen fenómenos de *splicing* (dado que los genes que contiene no poseen intrones), ni recombinación homóloga<sup>18</sup>. Codifica 37 genes, de los cuales 2 son ARNs ribosómicos (rRNA), 22 ARNs de transferencia (tRNA) y 13 genes estructurales que codifican distintas subunidades de los complejos I, III, IV y V del sistema OXPHOS<sup>19</sup> (**Figura 2**). A pesar de tener su propio genoma la mayoría de procesos mitocondriales dependen del nDNA, donde se encuentran la mayoría de los más de 1000 genes que codifican las proteínas que conforman el proteoma mitocondrial<sup>20</sup>.

Su probable origen bacteriano y el hecho de que existan múltiples copias de mtDNA por célula hacen que la genética del mtDNA posea diversas particularidades que lo diferencian del nDNA<sup>21</sup>:

- El mtDNA tiene una tasa mutacional mucho mayor que la que presenta el nDNA debido a la ausencia de histonas, la existencia de un sistema de reparación de ADN menos eficiente que el sistema de reparación nuclear y a una mayor exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por parte del sistema OXPHOS<sup>22</sup>.
- El mtDNA es **poliplásmico**, es decir, está presente en un elevado número de copias por célula. Normalmente existe una única población de moléculas de mtDNA, en cuyo caso se dice que dicha molécula de mtDNA está presente en **homoplasmia**. Se dice que existe **heteroplasmia** si hay dos poblaciones distintas de moléculas de mtDNA, por ejemplo,

un grupo de moléculas “normales” o *wild type* (WT) y otro grupo portador de una variante patogénica.

- El fenómeno de heteroplasmia da lugar al “**efecto umbral fenotípico**”. Se trata del porcentaje de moléculas que presenta una variante genética patogénica (porcentaje de heteroplasmia) mínimo necesario para provocar la aparición de un fenotipo patológico; que en el caso de fenotipos clínicos conduciría a la aparición de signos y síntomas. El umbral necesario para la aparición de los síntomas es muy variable, y depende del tejido afectado y de la propia variante patogénica <sup>21</sup>.
- El mtDNA posee un código genético que difiere del código genético universal. Por ejemplo, en el genoma mitocondrial el codón UGA codifica el aminoácido triptófano en lugar de un codón de terminación<sup>23</sup>.

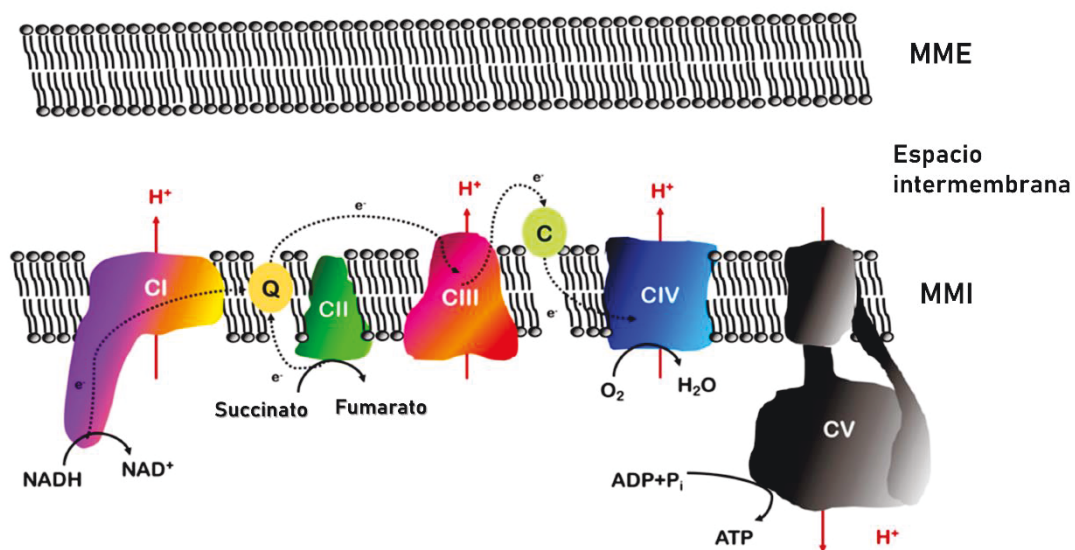


**Figura 2.** Representación esquemática del mtDNA. El mtDNA codifica 37 genes: 7 subunidades del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), una subunidad del complejo III (Cyt b), 3 subunidades del complejo IV (COX1, COX2 y COX3), 2 subunidades del complejo V (ATP6 y ATP8), 2 rRNA (12S y 16S) y 22 tRNAs (representados mediante el código de una letra del aminoácido al que se une). **D-loop:** región donde se sitúan los promotores de la transcripción de cada hebra del mtDNA. Adaptado de Protasoni *et al*<sup>24</sup>.

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

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) está formado por cinco complejos proteicos que son el **Complejo I** (CI) o NADH:ubiquinona oxidorreductasa, **Complejo II** (CII) o succinato:ubiquinona oxidorreductasa, **Complejo III** (CIII) o ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa, **Complejo IV** (CIV) o citocromo c oxidasa y **Complejo V** (CV) o ATP Sintasa, y por dos transportadores de electrones, que son la ubiquinona o Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) y el citocromo c. El sistema OXPHOS se encuentra integrado en la MMI, mayoritariamente en las crestas mitocondriales<sup>8</sup> y es la principal fuente de energía celular. Este sistema fue descrito por Krebs y Kornberg en base a su descubrimiento de que la fosforilación en sistemas aeróbicos dependía del consumo de oxígeno (de ahí el término de fosforilación oxidativa), y de que la oxidación de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, o ciclo de Krebs, está acoplado a la síntesis de ATP<sup>25</sup>. La hipótesis quimiosmótica, propuesta por Mitchell en 1961, postuló que la fuente primaria de energía para la síntesis de ATP provenía del gradiente electroquímico de protones a través de la MMI generado en la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)<sup>26</sup>.

La CRM está formada por 4 complejos, CI, CII, CIII y CIV. Mediante una serie de reacciones de oxidación-reducción los complejos de la CRM bombean protones desde la matriz al espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que es aprovechado para la síntesis de ATP por el CV, que devuelve el flujo de protones de nuevo a la matriz mitocondrial<sup>27</sup> (**Figura 3**).



**Figura 3.** Reacciones redox, flujo de electrones y de protones en el sistema OXPHOS. MMI: membrana mitocondrial interna; MME: membrana mitocondrial externa; Q: Coenzima Q<sub>10</sub>; C: citocromo c. Adaptado de Protasoni *et al*<sup>24</sup>.

### 3.1. Complejo I (EC1.6.5.3)

El CI es el complejo de mayor tamaño molecular del sistema OXPHOS ( $\approx$  1MDa) y está formado por un total de 45 subunidades en mamíferos, 7 de ellas codificadas en el mtDNA<sup>28</sup>. Además, para el ensamblaje del CI son necesarios al menos 14 factores de ensamblaje codificados en el nDNA<sup>29</sup>. El CI tiene una estructura en forma de L, con un brazo imbuido en la MMI y el otro brazo apuntando hacia la matriz mitocondrial (brazo periférico)<sup>30</sup>. Se puede dividir en tres módulos, tanto estructural como funcionalmente: el módulo N, situado en el brazo periférico donde se une y oxida el NADH; el módulo Q, también situado en el brazo periférico donde se lleva a cabo la transferencia de electrones a la CoQ<sub>10</sub>; y el módulo P, situado en el brazo de membrana, que se encarga del bombeo de protones al espacio intermembrana<sup>29,31</sup>.

Funcionalmente, el CI es uno de los puntos de entrada de electrones al sistema OXPHOS y uno de los principales generadores de la fuerza protón-motriz que utiliza el CV para la síntesis de ATP, bombeando cuatro protones a través de la MMI por cada molécula de NADH que oxida<sup>32</sup> y generando una molécula de CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> (ubiquinol) en el proceso. Las reacciones redox catalizadas por el CI generan ROS, siendo uno de los principales productores celulares de estos compuestos, los cuales a concentraciones fisiológicas poseen importantes funciones en la homeostasis y señalización celular<sup>33,34</sup>.

Los trastornos ocasionados por el déficit enzimático del CI son los más frecuentes del sistema OXPHOS y pueden estar causados tanto por mutaciones en subunidades estructurales (codificadas por el mtDNA o el nDNA) o factores de ensamblaje (codificados por el nDNA)<sup>35</sup>.

### 3.2. Complejo II (EC1.3.5.1)

El CII o succinato deshidrogenasa (SDH) juega un doble papel metabólico, al ser uno de los componentes del sistema OXPHOS, y también una de las enzimas del ciclo de Krebs<sup>36</sup>. Es el complejo de menor tamaño y está compuesto por cuatro subunidades, todas ellas codificadas por el nDNA. Las dos subunidades hidrofílicas, SDHA y SDHB, están orientadas hacia la matriz mitocondrial mientras que las subunidades SDHC y SDHD están situadas en la MMI y contienen dos sitios de unión a CoQ<sub>10</sub><sup>36,37</sup>.

Como parte del ciclo de Krebs ejerce su actividad succinato deshidrogenasa catalizando la oxidación de succinato a fumarato en la región enzimática orientada hacia la matriz mitocondrial. Esta oxidación de succinato está acoplada a la reacción de reducción de CoQ<sub>10</sub> a CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> en la MMI, participando en la transferencia de electrones llevada a cabo por la CRM<sup>37</sup>. El CII es el único complejo de la CRM que no participa en el bombeo de protones a través de la MMI.

### 3.3. Complejo III (EC1.10.2.2)

La estructura del CIII consiste en un dímero simétrico cuyos monómeros están compuestos por 10 subunidades distintas. Cada monómero contiene tres subunidades con centros activos redox: el citocromo b (la única subunidad del CIII codificada por el mtDNA) que contiene dos sitios de unión a CoQ<sub>10</sub> y dos grupos hemo *b*; el citocromo c, que contiene un grupo hemo *c*; y la proteína Rieske que contiene un centro [2Fe-2S]<sup>36,38</sup>.

Funcionalmente, el CIII constituye la parte central de la CRM, aceptando dos electrones de la CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> provenientes del CI y CII y donándolos al citocromo c, que será posteriormente oxidado por la citocromo c oxidasa o CIV<sup>36</sup>. Durante su actividad el CIII también contribuye al bombeo de protones a través de la MMI<sup>39</sup>.

### 3.4. Complejo IV (EC1.9.3.1)

El CIV es una enzima multimérica transmembrana localizada en la MMI<sup>40</sup>. En humanos está compuesta por 14 subunidades, de las cuales dos tienen actividad catalítica, las codificadas por los genes mitocondriales *MT-COI* y *MT-CO2*. La tercera subunidad codificada por el mtDNA, *MT-CO3*, no posee actividad catalítica de forma directa, pero es una subunidad necesaria para mantener los niveles de actividad del CIV al estabilizar a las 2 subunidades catalíticas<sup>36</sup>.

El CIV es la enzima final de la CRM, y se encarga de catalizar la oxidación del citocromo c por el O<sub>2</sub> que es reducido a H<sub>2</sub>O. La energía liberada en esta reacción se utiliza para translocar protones a través de la MMI, y por tanto contribuye, junto a los complejos I y III, a generar la fuerza protón-motriz utilizada para la síntesis de ATP<sup>41</sup>.

### 3.5 ATP Sintasa o Complejo V (EC 3.6.14)

La ATP sintasa (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>- ATP sintasa o CV) sintetiza ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico utilizando para ello la energía potencial en forma de gradiente de protones a través de la MMI generada por los complejos I, III y IV de la CRM<sup>42</sup>.

Estructuralmente se puede dividir en dos regiones, la fracción hidrofílica, conocida como porción F<sub>1</sub> que está orientada hacia la matriz mitocondrial y a su vez está constituida por el tallo central y el sitio catalítico de la enzima, y la fracción hidrofóbica o transmembrana, conocida como porción F<sub>0</sub>, que actúa como un canal de protones y está compuesta por un anillo transmembrana y el tallo periférico<sup>24,43</sup> (**Figura 4**). La actividad catalítica de la enzima se produce gracias a la rotación del anillo transmembrana que es impulsada por la fuerza electromotriz de los protones cuando fluyen desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial a través de la interfase entre la subunidad a y el anillo transmembrana. Para poder llevar a cabo la síntesis de ATP es necesario el acoplamiento de esta rotación con el tallo central del complejo F<sub>1</sub>, lo que genera cambios

conformacionales en el sitio catalítico de la enzima<sup>44</sup>. Además, también es necesario que el sitio catalítico mantenga cierta fijación gracias al tallo periférico, que actúa como un estator, previniendo la rotación no productiva del sitio catalítico<sup>45</sup>.

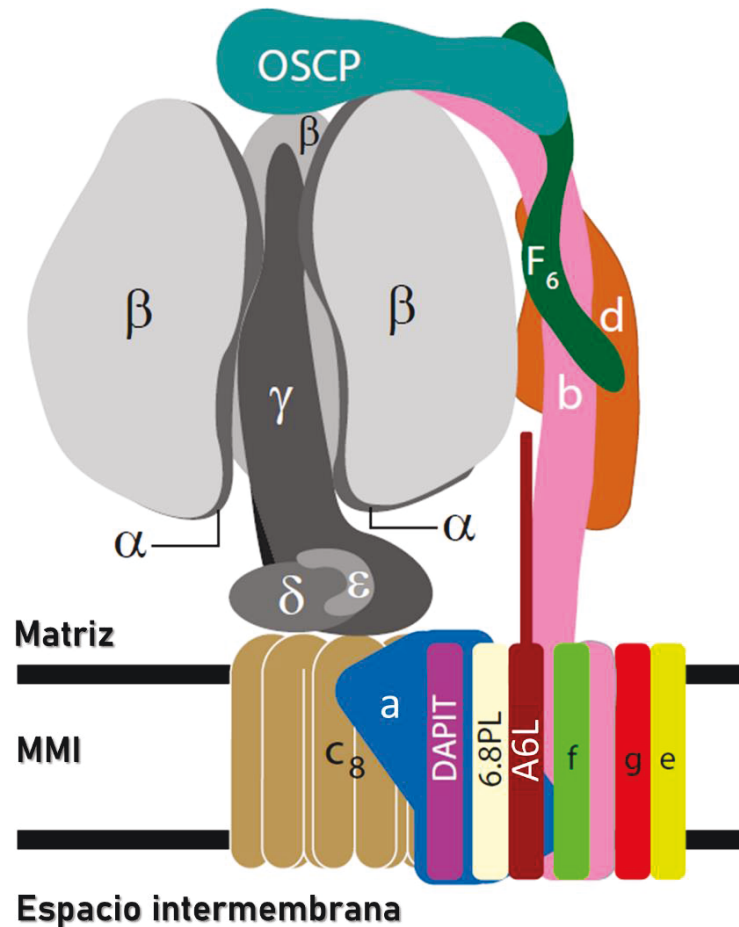
El CV está formado por 28 proteínas a partir de 17 subunidades distintas en diferentes estequiometrías dependiendo del número de cada subunidad presente en el monómero (**Tabla 1**; **Figura 4**). Únicamente dos de estas subunidades están codificadas por el mtDNA: la subunidad **a**, codificada por el gen *MT-ATP6* y la subunidad **A6L**, codificada por el gen *MT-ATP8*.

*Tabla 1. Lista de las distintas subunidades que componen la ATP Sintasa o CV.*

| Subunidad (*)        | Región CV                                  | Gen  | Estequiometría |
|----------------------|--|--|----------------|
| <b>α (ATP5A)</b>     | F <sub>1</sub> , Sitio catalítico          | <i>ATP5F1A</i>   | 3              |
| <b>β (ATP5B)</b>     |  | <i>ATP5F1B</i>   | 3              |
| <b>γ</b>             | F <sub>1</sub> , Tallo central             | <i>ATP5F1C</i>   | 1              |
| <b>ε</b>             |  | <i>ATP5F1E</i>   | 1              |
| <b>δ</b>             |  | <i>ATP5F1D</i>   | 1              |
| <b>b</b>             | F <sub>0</sub> , Tallo periférico          | <i>ATP5PB</i>  | 1              |
| <b>d (ATP5H)</b>     |  | <i>ATP5PD</i>  | 1              |
| <b>OSCP</b>          |  | <i>ATP5PO</i>  | 1              |
| <b>F<sub>6</sub></b> |  | <i>ATP5PF</i>  | 1              |
| <b>a</b>             | F <sub>0</sub> , Canal H <sup>+</sup>      | <i>MT-ATP6</i>   | 1              |
| <b>c</b>             |  | <i>ATP5MC1,</i><br><i>ATP5MC2,</i><br><i>ATP5MC3**</i> | 8              |
| <b>A6L</b>           | F <sub>0</sub> , Base del tallo periférico | <i>MT-ATP8</i>   | 1              |
| <b>f</b>             |  | <i>ATP5MF</i>  | 1              |
| <b>6.8 PL</b>        |  | <i>ATP5MPL</i>   | 1              |
| <b>DAPIT</b>         |  | <i>ATP5MK</i>  | 1              |
| <b>g</b>             |  | <i>ATP5MG</i>  | 1              |
| <b>e</b>             |  | <i>ATP5ME</i>  | 1              |

Se indica la región donde se ubican las distintas subunidades dentro del monómero, el gen que las codifica y la estequiometría que presentan en el monómero. \* Se indica entre paréntesis la nomenclatura antigua en algunas subunidades \*\* La subunidad c es codificada por tres genes distintos con secuencias de importación a la mitocondria diferentes pero la proteína madura final es idéntica en los tres casos.





**Figura 4.** Esquema estructural del complejo V. La porción F<sub>1</sub> consta del talco central (subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) y el sitio catalítico (subunidades  $\alpha_3\beta_3$ ). La porción F<sub>0</sub> consta del talco periférico (subunidades OSCP, F<sub>6</sub>, d, b), el canal de protones (anillo transmembrana de subunidades c<sub>8</sub> y subunidad a) y la base del talco periférico (subunidades A6L, DAPIT, 6.8PL, f, g, e). El paso de H<sup>+</sup> a través del canal de H<sup>+</sup> hace rotar el anillo de subunidades c<sub>8</sub>. El talco central transfiere esta rotación a la subunidad catalítica provocando cambios conformacionales que producen la síntesis de ATP. El talco periférico actúa como un estator impidiendo el exceso de rotación de la subunidad catalítica. Las subunidades de la base del talco periférico actúan dando soporte estructural al talco periférico y también participan en la formación de oligómeros. Adaptado de He *et al*<sup>46</sup>.

El CV también puede catalizar la reacción reversible (hidrólisis de ATP), mediante la actividad ATPasa, provocando la rotación del anillo en sentido opuesto y bombeando protones hacia el espacio intermembrana. Esta situación ocurre cuando el gradiente de protones disminuye por debajo de cierto umbral, por ejemplo, en condiciones anaerobias en las cuales la CRM no puede ejercer su actividad<sup>47</sup>.

El CV cuenta con una proteína reguladora, IF1 (ATPase Inhibitory Factor 1), codificada por el gen nuclear *ATP5IF1*. Esta proteína interacciona con el CV uniéndose en la interfase entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , bloqueando la rotación del sitio catalítico<sup>48</sup> e inhibiendo así su actividad. Se ha observado que la proteína IF1 se une al CV cuando el pH en la matriz mitocondrial baja de

6.7-6.5<sup>49</sup>, es decir cuando el gradiente de protones a través de la MMI disminuye y el CV ejerce actividad ATPasa, por lo que se ha propuesto que el papel fisiológico de IF1 es la prevención de la hidrólisis de ATP en las mitocondrias bajo condiciones anaeróbicas<sup>47</sup> y durante el proceso de ensamblaje del CV, cuando aún no tiene actividad ATP sintasa pero sí ATPasa<sup>50</sup>.

### 3.5.1 Ensamblaje del CV

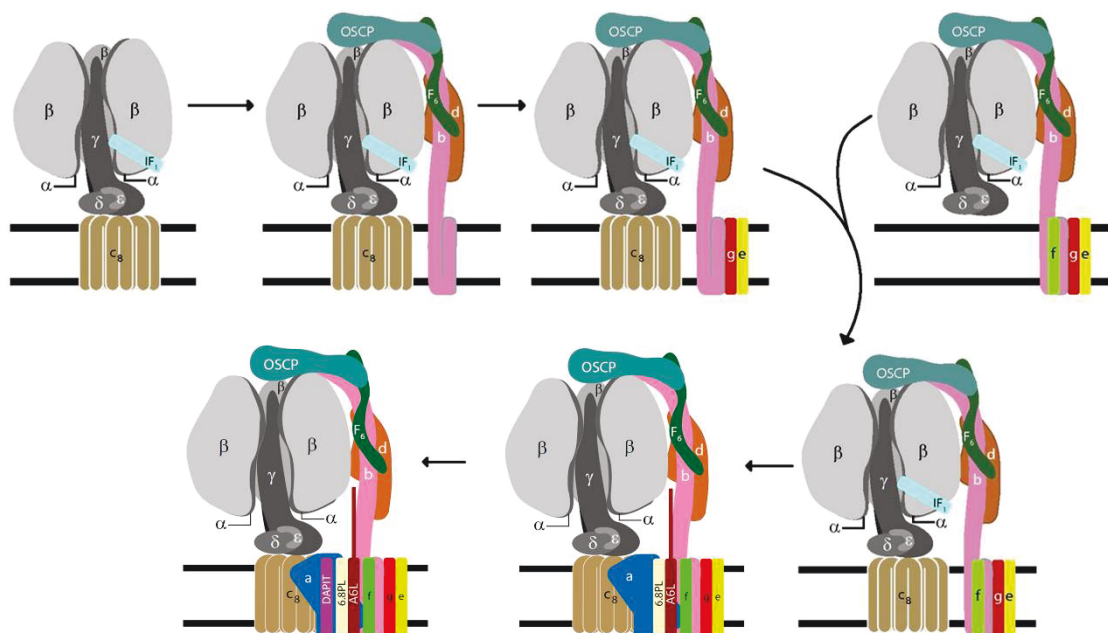
El ensamblaje del CV es un proceso complejo que depende de la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial<sup>51</sup>. Estudios realizados con levaduras y con células de origen humano carentes de mtDNA han revelado que el ensamblaje de la porción F<sub>1</sub>, el tallo periférico y el anillo transmembrana de subunidades c<sub>8</sub> ocurre por separado<sup>52</sup>. Según esta ruta la porción F<sub>1</sub> y el anillo c<sub>8</sub> se ensamblan independientemente y posteriormente se unen formando el intermediario F<sub>1</sub>-c, que a continuación se ensambla con el tallo periférico, siendo las subunidades codificadas por el mtDNA (subunidades a y A6L) las últimas en incorporarse al monómero, al menos en células humanas<sup>53</sup>. La irrupción de métodos de edición génica ha permitido la eliminación de subunidades del CV humano para analizar sus efectos en el ensamblaje de este complejo, mejorando el conocimiento de cómo se ensambla el canal de protones y la base del tallo periférico, que previamente no se conocía en profundidad<sup>46,50</sup>. Siguiendo esta estrategia se ha estudiado el ensamblaje de la porción F<sub>0</sub> del CV en modelos celulares mediante inactivación de genes que codifican distintas subunidades de la base del tallo periférico. He *et al.*<sup>46</sup> describieron que precursores del CV siguen dos rutas distintas para el ensamblaje del dominio de membrana de la enzima. En una de las rutas, un intermediario de ensamblaje compuesto por la porción F<sub>1</sub> y el anillo c<sub>8</sub> (F<sub>1</sub>-c) se asocia con el tallo periférico y las subunidades e y g. En la otra ruta, la porción F<sub>1</sub> se asocia primero con el tallo periférico y las subunidades e, g y f. Estas dos rutas se unen formando un intermediario de ensamblaje común que contiene la porción F<sub>1</sub>, el anillo c<sub>8</sub>, el tallo periférico y las subunidades e, g y f. En todos estos intermediarios de ensamblaje, la proteína reguladora IF1 se encuentra unida a la porción F<sub>1</sub> para prevenir la hidrólisis de ATP. Posteriormente, se integran las subunidades a y A6L, que se estabilizan mediante la incorporación de la subunidad 6.8PL, momento en el cual el canal de protones formado por la subunidad a y el anillo c<sub>8</sub> es funcional, por lo que se libera la proteína IF1 y comienza la síntesis de ATP. La última subunidad en incorporarse al monómero es DAPIT (**Figura 5**).

En el proceso de biogénesis del CV también intervienen una serie de factores de ensamblaje codificados por el nDNA que no forman parte del complejo enzimático final pero que intervienen en la síntesis, el transporte hacia la MMI y la oligomerización de los monómeros de CV. En humanos se han identificado hasta la fecha 6 factores de ensamblaje del CV que están codificados por los genes *ATPAF1*, *ATPAF2*, *ATP23*, *OXA1L*, *TMEM70* y *TMEM242*<sup>54-57</sup>. Las proteínas codificadas por los genes *ATPAF1* y *ATPAF2* participan en la formación de la porción F<sub>1</sub><sup>58,59</sup>,

*ATP23* parece tener una función de chaperona de la subunidad  $\alpha^5$ , *OXA1L* codifica una proteína localizada en la MMI que se encuentra involucrada en el ensamblaje de los complejos I, IV y V<sup>56</sup>, mientras que *TMEM70* y *TMEM242* codifican proteínas de membrana que participan en el ensamblaje del dominio de membrana y del anillo de subunidades c del CV<sup>46,57,60,61</sup>.

### 3.5.2 Oligomerización del complejo V

El CV de células procariotas existe únicamente en forma de monómero, sin embargo, en células eucariotas se asocia formando dímeros y oligómeros superiores (tetrameros, hexámeros y hasta octámeros)<sup>62,63</sup>. La dimerización del CV se establece mediante interacciones entre los tallos periféricos y las porciones F<sub>0</sub> de los monómeros<sup>64</sup>, formando un ángulo de entre 70° y 90° entre monómeros, pues parece que este ángulo tiene cierta flexibilidad<sup>62</sup>. Se han identificado varias subunidades que participan en la oligomerización del CV, como las subunidades e, g, f y DAPIT<sup>43,64</sup>. Además, debido al ángulo que forman los dímeros del CV éstos son capaces de doblar la MMI, siendo cruciales para dar forma a las crestas mitocondriales<sup>62,65</sup>.



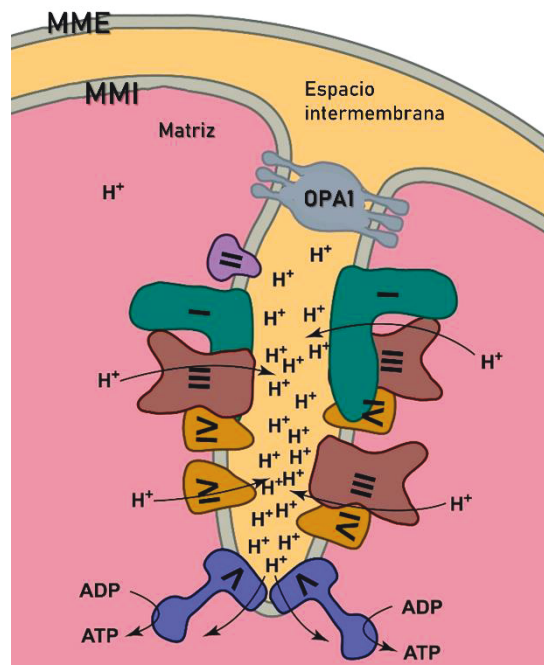
**Figura 5.** Rutas de ensamblaje del complejo V. El intermediario de ensamblaje que incluye la porción F<sub>1</sub>, el anillo c<sub>8</sub>, el tallo periférico, las subunidades e, g, f y, además, está unido a la proteína reguladora IF1 se puede formar mediante dos rutas distintas. A partir de este intermediario común los últimos pasos del ensamblaje consisten en la adición de las subunidades codificadas por el mtDNA (a y A6L) y la subunidad 6.8PPL, momento en el cual el canal de protones es funcional y la enzima es capaz de sintetizar ATP, por lo que se libera IF1. El último paso de la ruta es la incorporación de la subunidad DAPIT. Adaptado de He *et al*<sup>46</sup>.

Como se mencionó anteriormente el sistema OXPHOS se localiza principalmente en las crestas mitocondriales<sup>8</sup> con el CV ubicado en las puntas de las crestas y el resto de complejos OXPHOS situado en las regiones adyacentes<sup>66</sup>. Algunos autores han propuesto que esta disposición genera

una acumulación local de protones en el extremo de las crestas, que actuarían como un “sumidero” de protones, lo que supondría una optimización del proceso necesario para la síntesis de ATP por el CV (Figura 6), y proporcionaría un sentido funcional a las crestas mitocondriales<sup>66,67</sup>.

#### 4. Organización en supercomplejos del sistema OXPHOS

Al igual que el CV se asocia entre sí formando dímeros y otros oligómeros superiores, los complejos I, III y IV de la CRM también pueden asociarse en estructuras de orden superior conocidos como supercomplejos (SC), los cuales coexisten con los complejos individuales<sup>68,69</sup>. En los mamíferos, el SC predominante, conocido como respirasoma, tiene la estequiometría I+III<sub>2</sub>+IV con el CIV situado en el extremo distal del brazo de membrana del CI y adyacente al CIII<sub>2</sub><sup>70,71</sup>.



**Figura 6.** Disposición de los complejos OXPHOS en las crestas mitocondriales. Los complejos de la CRM se encuentran en la superficie plana de las crestas, mientras que el dímero de CV se encuentra en el ápice de las mismas. Esta disposición minimiza la fuga de protones a través de la superficie de las crestas y forma un “sumidero” de protones que permite un mejor aprovechamiento de la fuerza próton-motriz por parte del CV. Adaptado de Guo et al<sup>66</sup>.

El conocimiento de esta organización del sistema OXPHOS se desarrolló gracias a la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa azul (*Blue Native Electrophoresis*, BN-PAGE o BNE)<sup>72</sup> que es capaz de aislar complejos proteicos enzimáticamente activos, incluidos complejos de membrana, en condiciones nativas. Por lo tanto, la BNE permite la caracterización de complejos, subcomplejos, y supercomplejos del sistema OXPHOS con tamaños moleculares que oscilan entre 50 KDa y 10 MDa<sup>73</sup>.

Los SC se pueden dividir en diferentes grupos según los complejos que contengan. Los SC principales son los respirasomas, que pueden presentar diferentes estequiometrías del CIV (SC I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub>). Otros SC son el SC I+III<sub>2</sub> y el SC III<sub>2</sub>+IV. También se ha descrito el SC I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub>+IV<sub>2</sub> o megacomplejo<sup>68</sup>. El papel fisiológico de los SC es objeto de un intenso debate en el que se han propuesto diferentes hipótesis, tales como mejorar la capacidad catalítica respecto a los complejos aislados<sup>74,75</sup>, evitar agregaciones proteicas perjudiciales en la MMI<sup>76</sup>, favorecer el ensamblaje y estabilidad del CI<sup>77,78</sup> y prevenir la generación de ROS<sup>79</sup>.

## **5. Enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS**

Las enfermedades mitocondriales del sistema OXPHOS son un conjunto heterogéneo de enfermedades de base genética caracterizadas por defectos en el sistema OXPHOS y causadas por alteraciones en genes que codifican proteínas involucradas en dicho sistema, por ejemplo, proteínas estructurales o factores de ensamblaje de los diferentes complejos, o proteínas y enzimas que participan en la dinámica mitocondrial y el mantenimiento o traducción del mtDNA que afectan indirectamente al sistema OXPHOS<sup>80</sup>. Existen múltiples enfermedades mitocondriales, con presentaciones clínicas muy diferentes, cuyo comienzo de los síntomas pueden ocurrir en el período neonatal, la infancia o la edad adulta. Estos trastornos pueden afectar a un solo órgano pero la mayor parte de ellas son multisistémicas, siendo habitualmente los órganos más afectados aquellos que requieren una mayor demanda energética, como el cerebro o el músculo esquelético o cardíaco<sup>81</sup>.

Las enfermedades mitocondriales se consideran enfermedades raras (en Europa, aquellas que afectan a menos de 1 individuo por cada 2.000), debido a su baja prevalencia en la población<sup>82</sup>. Se ha estimado que la prevalencia de las enfermedades mitocondriales de inicio en la infancia (<16 años edad) es de entre 5 a 15 casos por 100.000 individuos<sup>83-87</sup>. El estudio más amplio de prevalencia en adultos pertenece a una cohorte de población mayoritariamente caucásica sin evidencias de consanguinidad<sup>88</sup>. Este estudio estimó que la prevalencia en adultos de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el mtDNA es de 9,6 casos por 100.000 individuos y la prevalencia de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el nDNA resultó de 2,9 casos por 100.000 individuos. Sin embargo, estas prevalencias dependen en gran medida de la región geográfica o población afectada, pues, por ejemplo, mutaciones fundadoras hacen que ciertas enfermedades mitocondriales sean más comunes en la población afectada<sup>83</sup>.

Se han descrito mutaciones en más de 350 genes, tanto codificados por el nDNA como por el mtDNA, asociados a patología mitocondrial, no existiendo, en general, una clara relación fenotipo-genotipo. Por lo tanto, es común que un mismo síndrome sea causado por mutaciones en diferentes genes (por ejemplo, el síndrome de Leigh se ha asociado a mutaciones en

aproximadamente 100 genes distintos) o bien que mutaciones en el mismo gen den lugar a fenotipos diferentes<sup>89</sup>. Clínicamente, los trastornos mitocondriales que afectan a un solo órgano, como por ejemplo la afectación ocular en la Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), ocurre en una proporción relativamente pequeña, pues la mayoría de los pacientes presentan afectación multisistémica. En este caso los individuos afectados pueden presentar un conjunto de fenotipos clínicos compatibles con alguno de los síndromes típicos mitocondriales, como Síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares), Síndrome de Leigh o NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa). Sin embargo, esta clasificación en síndromes tiene un valor diagnóstico limitado, ya que la mayoría de los pacientes presentan fenotipos complejos que no encajan en ninguna de estas categorías<sup>83</sup>. Todo esto, unido a un conocimiento incompleto de los mecanismos involucrados en las diferentes patologías, hace que el diagnóstico de estas enfermedades sea un proceso complejo<sup>81,89</sup>.

## 5.1. Clasificación de las enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales se pueden clasificar de múltiples maneras: tipo de herencia (pueden tener todos los tipos de herencia posibles: materna, autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X), genoma afectado (mtDNA o nDNA), o tipos de mutación en mtDNA (mutaciones puntuales o grandes reordenamientos). Dado que uno de los objetivos de la tesis estará centrado en el estudio de pacientes afectados por un complejo OXPHOS concreto se sigue este tipo de clasificación por complejo afectado.

### 5.1.1. Deficiencias del complejo I

Los déficits de CI pueden ser causados por mutaciones en el mtDNA y en el nDNA. Estos déficits son los más comúnmente identificados dentro de las enfermedades mitocondriales de inicio en la infancia, representando aproximadamente el 30% de todos los casos<sup>90,91</sup>. Se han identificado mutaciones en las siete subunidades del CI codificadas por el mtDNA (genes *MT-ND*)<sup>92</sup> y en 24 de las 37 subunidades codificadas por el nDNA<sup>36</sup>. Como ocurre en otros déficits mitocondriales, el déficit de CI se caracteriza por una marcada heterogeneidad clínica y genética. Mutaciones en las subunidades codificadas por el mtDNA son la principal causa de LHON<sup>93</sup>, asociándose también a MELAS, síndrome de Leigh y otras encefalopatías mitocondriales<sup>94</sup>, aunque como sucede en déficits de otros complejos, mutaciones en los genes *MT-ND* también pueden causar síndromes con diferentes fenotipos, grados de afectación y edad de inicio<sup>36,95</sup>.

Mutaciones en algunos de los genes nucleares que codifican subunidades del CI suelen cursar con encefalopatías graves, principalmente Síndrome de Leigh<sup>96</sup>, aunque también pueden dar lugar a otros fenotipos<sup>97</sup>. Otra causa de déficits del CI por mutaciones en el nDNA se debe a aquellas que

afectan a factores de ensamblaje y chaperonas del CI, entre las cuales se han descrito 11 genes asociados a patología<sup>98</sup>. Estos trastornos de ensamblaje, al igual que con los déficits originados por mutaciones en las subunidades estructurales codificadas en el núcleo, cursan principalmente con encefalopatías de inicio en la infancia, aunque también se han descrito otros fenotipos como cardiomiopatía y afectación hepática y renal<sup>99</sup>.

### 5.1.2. Deficiencias del complejo II

Se han descrito mutaciones en las 4 subunidades estructurales del CII, que como se mencionó previamente, todas ellas están codificadas por el nDNA. La subunidad codificada por el gen *SDHA* se ha asociado a Síndrome de Leigh, aunque los casos descritos son escasos<sup>100,101</sup>. También se han documentado casos asociados a encefalopatía y miopatía con mutaciones en los genes *SDHA*, *SDHB* y *SDHD*<sup>102,103</sup>. Sin embargo, la mayoría de mutaciones en estos genes conducen a tumores hereditarios, especialmente paragangliomas y feocromocitomas, puesto que estos genes también están involucrados en la supresión de tumores<sup>104</sup>. El gen *SDHAF1*, uno de los factores de ensamblaje del CII, también se ha asociado a déficit de CII y leucoencefalopatía<sup>105</sup>.

### 5.1.3. Deficiencia del complejo III

Como sucede en la mayoría de las mutaciones descritas en los diferentes complejos OXPHOS, las primeras mutaciones identificadas que afectaban al CIII se identificaron en la subunidad codificada por el mtDNA (*MT-CYB*). La mayoría de estas variantes se asocian a una expresión clínica de inicio tardío consistente en miopatía e intolerancia al ejercicio<sup>106,107</sup>. También se han descrito, aunque en muy pocos casos, mutaciones en los genes *UQCRCB* y *UQCRCQ* que codifican subunidades estructurales del CIII codificadas por el nDNA<sup>108,109</sup>. No obstante, la causa más frecuente de déficits en CIII de origen nuclear se debe a mutaciones en factores de ensamblaje de este complejo, y concretamente en el gen *BCS1L* en el que se han documentado 25 mutaciones diferentes<sup>110</sup> y cuyo espectro clínico es muy variado<sup>111-113</sup>.

### 5.1.4. Deficiencias del Complejo IV

Se han descrito mutaciones en las tres subunidades del CIV codificadas por el mtDNA (*MT-CO1*, *MT-CO2* y *MT-CO3*). Las presentaciones clínicas en estos casos son muy variadas<sup>114</sup>, y se han relacionado con la naturaleza de la mutación y el nivel de heteroplasmia de la misma<sup>115</sup>. Los déficits de CIV debidos a mutaciones en las subunidades codificadas por el nDNA son muy poco frecuentes, aunque recientemente debido al importante desarrollo de la secuenciación masiva o NGS, se han identificados variantes patogénicas en varias subunidades del CIV<sup>36</sup>. Posiblemente debido a que se conocen más factores de ensamblaje que subunidades estructurales del CIV, la mayoría de los casos descritos con déficits de CIV de origen nuclear son causados por mutaciones

en estos genes<sup>99</sup>, siendo el más representativo *SURFI*, que se ha asociado a síndrome de Leigh<sup>116</sup> entre otros fenotipos<sup>117</sup>.

### 5.1.5. Deficiencias del complejo V

Dentro de las enfermedades OXPHOS, las causadas por déficit del complejo V son las de menor prevalencia<sup>42,118,119</sup>. Al igual que en otras enfermedades OXPHOS la presentación clínica es muy heterogénea y pueden estar causadas por alteraciones tanto en el mtDNA como en el nDNA. Los déficits de CV mejor caracterizados son aquellos causados por mutaciones en los dos genes codificados por el mtDNA, *MT-ATP6* y *MT-ATP8*<sup>42</sup>, que codifican las subunidades a y A6L del CV, respectivamente.

Los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* se sintetizan a partir de una molécula de mRNA bicistrónica de forma que ambos genes comparten 46 nucleótidos. Por lo tanto, las variantes localizadas en esta región del mtDNA pueden afectar a la subunidad a, a la subunidad A6L, o a ambas subunidades simultáneamente. Se ha propuesto que la disposición bicistrónica de estos genes serviría para regular la traducción conjunta de ambas subunidades según la disponibilidad de la porción F<sub>1</sub> del CV y su posterior ensamblaje en el monómero<sup>120</sup>. La subunidad a participa en la formación del canal de protones del CV, que está situado en la interfase que forma con el anillo c<sub>8</sub> en la porción F<sub>0</sub> de la enzima y por lo tanto es fundamental para la actividad catalítica (**Figura 4**)<sup>121,122</sup>. La subunidad A6L está situada al lado de la subunidad a y parece tener un papel más estructural, participando en la estabilización del tallo periférico<sup>123,124</sup>.

El gen más frecuentemente afectado en el déficit de CV es *MT-ATP6*, en el cual se han descrito más de 200 casos y 35 mutaciones diferentes<sup>119,125-135</sup>. El espectro clínico en los pacientes con mutaciones en *MT-ATP6* es extremadamente variado, sin embargo los síndromes más frecuentemente hallados son el Síndrome de Leigh y Síndrome NARP<sup>42,119,125</sup>. Existen varias mutaciones frecuentes en el gen, estando más del 80% de los casos reportados asociados a una de las siguientes variantes: m.8993T>G, m.8993T>C, m.9185T>C y m.9176T>C<sup>125</sup>. No existe una clara correlación genotipo-fenotipo, excepto para el caso de la mutación m.8993T>G que parece causar una expresión clínica de mayor gravedad y de inicio más temprano que otras variantes en el gen *MT-ATP6*<sup>125,136</sup>. Se ha postulado que el residuo aminoacídico afectado por esta mutación tendría un papel importante en la traslocación de protones<sup>137</sup>.

Los déficits de CV causados por mutaciones en el gen *MT-ATP8* son mucho menos frecuentes. Al contrario de lo que sucede en la casuística relacionada con el gen *MT-ATP6*, en este caso no existen variantes frecuentes, ni un síndrome o fenotipo particular predominante<sup>42</sup>. En la **Tabla 2** se muestran los casos reportados con mutaciones en el gen *MT-ATP8* (se han excluido aquellas



variantes con una frecuencia  $\geq 0.5\%$  en la base de datos de variantes en mtDNA Mitomap/GeneBank<sup>138,139</sup>).

También se han descrito déficits de CV asociados a mutaciones en subunidades y factores de ensamblaje codificados en el nDNA, la mayoría de ellos identificados en los últimos años tras el desarrollo de la NGS, los cuales son mucho menos frecuentes que aquellos causados por mutaciones en el mtDNA<sup>140</sup> (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Mutaciones en el gen *MT-ATP8* reportadas en la bibliografía.

| Mutación              | Proteína   | Cuadro clínico   | Efectos funcionales   | Referencia   |
|-----------------------|------------|--|---|--|
| <b>m.8381A&gt;G</b>   | p.Thr6Ala  | Diabetes, hipoacusia   | NA  | Perucca <i>et al.</i> <sup>141</sup>                                   |
| <b>m.8403T&gt;C</b>   | p.Ile13Thr | Parálisis periódica,<br>Síndrome piramidal                   | ROS $\uparrow$ , $\Delta\Psi_m$ $\uparrow$  | Auré <i>et al.</i> <sup>142</sup>                                      |
| <b>m.8411A&gt;G</b>   | p.Met16Val | Retraso psicomotor, epilepsia,<br>leucodistrofia, hipoacusia | NA  | Mkaouar <i>et al.</i> <sup>143</sup>                                   |
| <b>m.8424T &gt; C</b> | p.Leu20Pro | Epilepsia mioclónica, atrofia<br>cerebelosa                  | $\downarrow$ [ATP],<br>$\downarrow$ Proliferación celular                         | Rucheton <i>et al.</i> <sup>144</sup>                                  |
| <b>m.8481C&gt;T</b>   | p.Pro39Leu | Tetralogía de Fallot   | NA  | Tansel <i>et al.</i> <sup>145</sup>                                    |
| <b>m.8528T&gt;C*</b>  | p.Trp55Arg | Cardiomiopatía hipertrófica                                  | $\downarrow$ [ATP], $\downarrow$ Expresión A6L,<br>$\downarrow$ Monómero CV (BNE) | Ware <i>et al.</i> <sup>146</sup><br>Imai <i>et al.</i> <sup>147</sup> |
| <b>m.8529G&gt;A*</b>  | p.Trp55Ter | Cardiomiopatía hipertrófica<br>apical y neuropatía           | $\downarrow$ Actividad CV,<br>$\downarrow$ Monómero CV (BNE)                      | Jonckheere <i>et al.</i> <sup>148</sup>                                |
| <b>m.8558C&gt;T*</b>  | p.Pro65Ser | Cardiomiopatía   | NA  | Tang <i>et al.</i> <sup>135</sup>                                      |
| <b>m.8561C&gt;G*</b>  | p.Pro66Ala | Ataxia, neuropatía periférica,<br>diabetes, hipoacusia       | $\downarrow$ [ATP],<br>$\downarrow$ Monómero CV (BNE)                             | Kytövuori <i>et al.</i> <sup>149</sup>                                 |
| <b>m.8561C&gt;T*</b>  | p.Pro66Ser | Retraso psicomotor, ataxia                                   | $\downarrow$ Monómero CV (BNE)  | Fragaki <i>et al.</i> <sup>150</sup>                                   |

ROS: Producción de especies reactivas de oxígeno.  $\Delta\Psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial. [ATP]: Producción de ATP. NA: No se realizaron ensayos funcionales. Las variantes marcadas con asterisco (\*) también afectan al gen *MT-ATP6*, el efecto en la proteína que aparece en la tabla es el que afecta a la proteína codificada por *MT-ATP8*.

**Tabla 3.** Mutaciones en subunidades o factores de ensamblaje del CV codificados por el nDNA.

| Gen            | Subunidad  | Cuadro clínico  | Referencia  |
|----------------|------------|---|---|
| <i>ATP5F1A</i> | $\alpha$   | Encefalopatía neonatal, <i>exitus</i>   | Jonckheere <i>et al.</i> <sup>140</sup>                                     |
| <i>ATP5F1E</i> | $\epsilon$ | Acidosis láctica, retraso psicomotor, cardiomiopatía hipertrófica y neuropatía periférica | Mayr <i>et al.</i> <sup>54</sup>  |
| <i>ATP5F1D</i> | $\delta$   | Encefalopatía neonatal, acidosis láctica  | Olahova <i>et al.</i> <sup>151</sup>  |
| <i>ATP5MK</i>  | DAPIT      | Síndrome de Leigh   | Barca <i>et al.</i> <sup>152</sup>  |
| <i>ATPAF2</i>  | F.E.       | Encefalopatía neonatal, acidosis láctica, <i>exitus</i>                                   | Meirleir <i>et al.</i> <sup>153</sup>                                       |
| <i>TMEM70</i>  | F.E.       | Encefalopatía neonatal, cardiomiopatía  | Cizkova <i>et al.</i> <sup>60</sup><br>Diodato <i>et al.</i> <sup>154</sup> |
| <i>OXA1L</i>   | F.E.       | Encefalopatía, retraso psicomotor   | Thompson <i>et al.</i> <sup>56</sup>  |

F.E.: Factor de ensamblaje del CV.

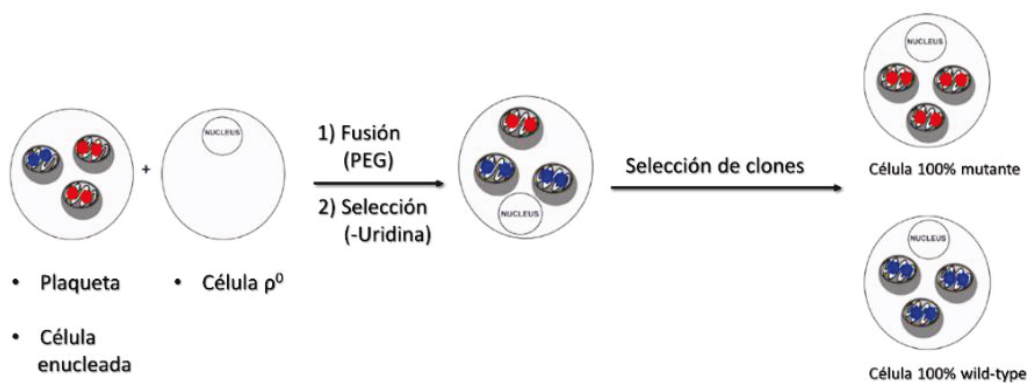
## 6. Modelo celular de cíbridos transmitocondriales

El estudio bioquímico y funcional de las consecuencias de mutaciones en el mtDNA se pueden realizar en tejido muscular o en modelos celulares de fibroblastos procedentes de biopsia muscular o de piel de los pacientes, respectivamente; sin embargo, el hecho de que presenten heteroplasmia en la mayoría de los casos, supone una limitación para obtener asociaciones fiables de la mutación con el efecto disfuncional evaluado en esos tejidos y células<sup>155</sup>. Por este motivo, el modelo celular más utilizado para el estudio de los trastornos causados por alteraciones en el mtDNA consiste en la utilización de cíbridos transmitocondriales o híbridos citoplasmáticos, que se describió por primera vez en 1989 por King y Attardi<sup>156</sup>. Este modelo, originado a partir de un tejido o estirpe celular de un paciente con la variante del mtDNA en estudio presente en heteroplasmia, permite obtener dos poblaciones celulares, una población sin la variante (WT) y otra población con la variante en homoplasmia (moléculas de mtDNA 100% mutantes). Otras ventajas de este modelo celular son, por un lado, mantener el mismo fondo nuclear en todas las células, lo que permite un mejor estudio de la influencia del mtDNA en el fenotipo celular, puesto que se mantiene constante la influencia que tiene el nDNA sobre la función mitocondrial<sup>157</sup>, y por otro lado, obtener una población isogénica (WT) con la población homoplásmica o heteroplásmica mutante, de forma que la única diferencia en las moléculas de mtDNA sería en principio la variante genética a estudio manteniendo el mismo fondo genético y el haplogrupo mitocondrial<sup>158</sup>, y por tanto, establecer asociaciones más robustas de la variante candidata con el efecto funcional analizado.

Este modelo celular se obtiene a partir de células desprovistas de mtDNA, denominadas células  $\rho^0$  (Rho 0), que son repobladas con mitocondrias portadoras de la variante que se quiere estudiar. Las células  $\rho^0$  se obtienen mediante el uso de un agente que elimine de forma selectiva el mtDNA, el más usado históricamente es el agente intercalante bromuro de etidio<sup>158</sup>. La línea celular habitualmente utilizada como  $\rho^0$  en estudios humanos procede de osteosarcoma humano, se denomina 143B y es auxotrófica para la uridina y piruvato<sup>156,159</sup>. Estas células, a pesar de no poseer mtDNA sí que retienen las mitocondrias, y aunque su CRM no es funcional, son capaces de proliferar y reciben proteínas mitocondriales codificadas por el nDNA<sup>158</sup>.

Como donante de mitocondrias, para repoblar las células  $\rho^0$  de mtDNA, se puede utilizar cualquier tipo de célula pero, dado que las células que actúan como donante mitocondrial han de estar exentas de nDNA, antes es necesario someterlas a un proceso de enucleación<sup>160</sup>. Por este motivo, las plaquetas son una excelente fuente de mitocondrias y mtDNA de los pacientes con variantes candidatas, pues éstas, al carecer de núcleo, el único material genético que contienen es mtDNA<sup>161</sup>. Y, además, son de fácil obtención mediante una extracción de sangre lo que no supone un procedimiento invasivo para el paciente.

El proceso de generación de los híbridos utilizados en esta tesis se detalla en el apartado “Material y Métodos”, pero de forma muy resumida consiste en la fusión, mediada por polietilenglicol (PEG), de las células  $\rho^0$  con las células donantes de mitocondrias. Una vez llevada a cabo la fusión se eliminan las células  $\rho^0$  no fusionadas manteniéndolas en un medio de cultivo sin uridina, aprovechando su dependencia por este sustrato, y obteniendo así los híbridos con un porcentaje de heteroplasmia similar al que presentaba las plaquetas donantes. Posteriormente, se realiza una selección clonal con el fin de obtener, por una parte, células que posean una heteroplasmia del 100% para la mutación a estudio y, por otra parte, células WT que servirán como control isogénico en los estudios funcionales posteriores (**Figura 7**).



**Figura 7.** Esquemas de la generación de híbridos transmitocondriales. PEG: polietilenglicol. Adaptado de Wilkins *et al.*<sup>158</sup>

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Las enfermedades mitocondriales debidas a un déficit de ATP sintasa mitocondrial o Complejo V del sistema OXPHOS se encuentran entre aquellas menos frecuentes dentro de las enfermedades mitocondriales OXPHOS, y aún no se conocen bien los defectos celulares y moleculares producidos por mutaciones en genes de subunidades del complejo V.

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es profundizar en el conocimiento clínico y genético de los defectos de complejo V, así como en los efectos moleculares y celulares provocados por mutaciones en los dos genes localizados en el mtDNA que codifican las subunidades del complejo V, *MT-ATP6* y *MT-ATP8*. Para abordar dicho objetivo se estudiará una cohorte de pacientes del Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid con enfermedad mitocondrial producida por déficit de Complejo V y mutaciones en sus subunidades mitocondriales durante el periodo comprendido entre los años 1994 a 2020, y se caracterizarán, en modelos celulares derivados de pacientes, las consecuencias funcionales y estructurales sobre el Complejo V causados por mutaciones seleccionadas de la cohorte en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8*.

Los objetivos específicos de este trabajo de tesis doctoral son:

1. Establecer una correlación del genotipo y fenotipo en los pacientes con diagnóstico molecular confirmado de déficit de Complejo V en el laboratorio de enfermedades mitocondriales del Hospital 12 de Octubre de Madrid, durante el periodo 1994-2020.
2. Analizar en un modelo celular de híbridos transmitocondriales los efectos sobre la función, estructura, ensamblaje y oligomerización del Complejo V de una mutación *sin sentido (nonsense)* en el gen *MT-ATP8*.
3. Analizar en un modelo celular de híbridos transmitocondriales los efectos sobre la función, estructura, ensamblaje y oligomerización del Complejo V de una mutación *de sentido equivocado (missense)* en el gen *MT-ATP8*.
4. Determinar las diferencias funcionales y estructurales en el Complejo V provocadas por una variante genética de tipo *nonsense* y una de tipo *missense* en el gen *MT-ATP8*.
5. Caracterizar las consecuencias funcionales y estructurales, así como la contribución al fenotipo celular y molecular de la mutación m.9176T>C del gen *MT-ATP6*, mediante el estudio de dos modelos celulares de híbridos transmitocondriales, uno portador de la mutación m.9176T>C y otro portador de dos mutaciones, m.9176T>C y m.8959G>A, en el gen *MT-ATP6*.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## **1. Pacientes**

### **1.1 Pacientes**

El material biológico procedente de pacientes fue obtenido o utilizado con el consentimiento informado de los mismos o, en su caso, por sus padres o tutores. La investigación llevada a cabo con este material fue autorizada por el Comité de Ética de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12) mediante su aprobación de los proyectos de investigación concedidos como investigador principal a Miguel A. Martín (Director de esta tesis doctoral) por el Instituto de Salud Carlos III (Acción Estratégica en Salud) PI12\_01683 y PI18/01374; La investigación se realizó respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los derechos humanos. La información tanto los datos de índole personal como los de carácter clínico y genético- se trató de acuerdo a la Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y al Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD), y de la Ley 14/2007 de 4 de julio de Investigación Biomédica.

A continuación, se exponen los datos clínicos de los pacientes y sus familiares a partir de los cuales se obtuvieron muestras para la elaboración de los modelos celulares. Los datos se obtuvieron a partir de los informes clínicos remitidos por los médicos peticionarios previa anonimización de los mismos.

#### **- Paciente 1**

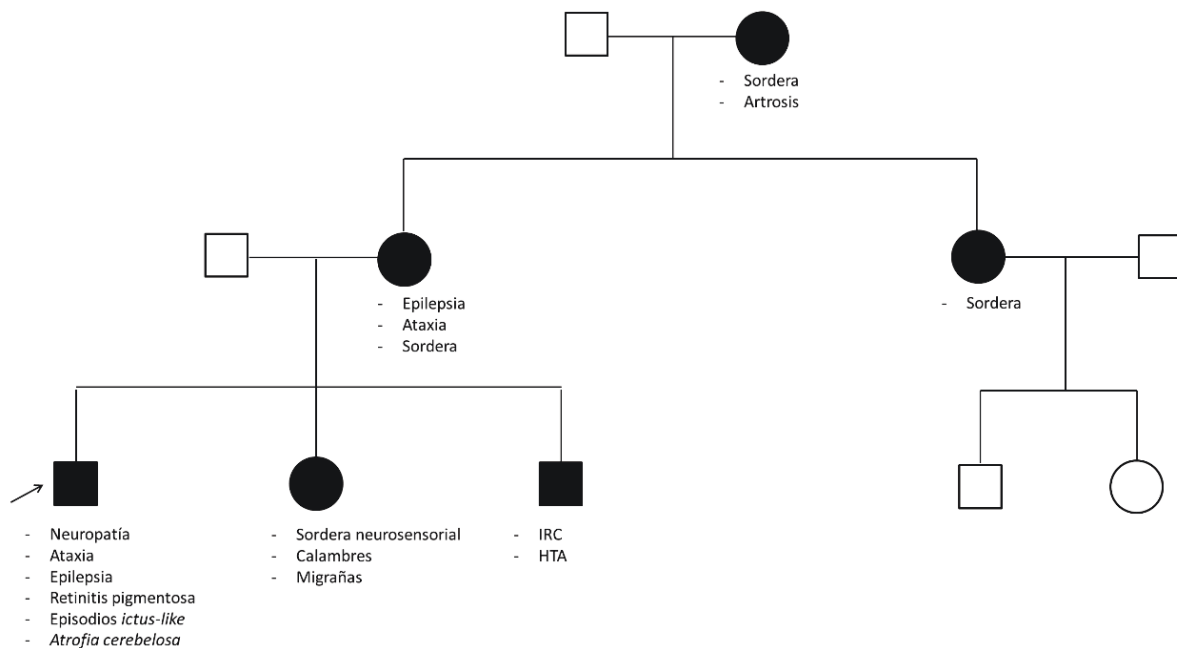
Mujer de 35 años diagnosticada de duplicidad ureteral en la infancia y estudiada durante su adolescencia por talla baja e hipoacusia bilateral severa. Como antecedentes también destacan el diagnóstico de retinitis pigmentosa, así como varios episodios de cefaleas de características vasculo-tensionales. Acudió a consulta por un episodio de cefalea descompensada en últimas semanas de características similares a episodios previos. En la exploración neurológica se halló una hiperreflexia generalizada. En las exploraciones complementarias destacó el hallazgo de una marcada atrofia cerebelosa en la RMN y de una polineuropatía sensitivo-motora de grado leve-moderado en el estudio electrofisiológico, mientras que la exploración oftalmológica confirmó el diagnóstico de retinitis pigmentaria. El análisis bioquímico en sangre periférica solo mostró una ligera elevación de colesterol y creatinina, con lactato normal. El análisis histopatológico de biopsia muscular de bíceps fue normal.

Debido a la concurrencia de datos clínicos compatibles con trastornos mitocondriales (NARP + hipoacusia y cefalea) se solicitaron estudios bioquímicos y moleculares para confirmar o descartar enfermedad mitocondrial. Se realizó diagnóstico genético en ADN procedente de tejido muscular mediante NGS encontrándose la variante m.8391G>A (p.Trp9Ter) con un 73% de heteroplasmia en el gen *MT-ATP8*.

- Paciente 2

Hombre de 43 años con sospecha de encefalopatía epiléptica de origen mitocondrial tipo MELAS remitido para cribado de Enfermedad Mitocondrial. Tuvo un primer ingreso por episodio de crisis epiléptica. El electroencefalograma mostró datos de encefalopatía difusa. En la campimetría visual se detectó la presencia de retinitis pigmentosa. Tuvo un ingreso posterior por pérdida de visión periférica, movimientos involuntarios en miembro inferior izquierdo y torpeza motora.

En cuanto a sus antecedentes familiares, la madre falleció a los 70 años de edad tras varios episodios de encefalitis. Previamente se había diagnosticado de ataxia y epilepsia. En la autopsia se informó de alteraciones estructurales en el cerebro compatibles con enfermedad mitocondrial. La paciente tenía dos hermanos, un hermano varón con insuficiencia renal crónica de causa desconocida y una hermana con migrañas, sordera y calambres musculares. La tía materna padecía sordera y tuvo dos hijos sanos. Por último, la abuela materna (98 años) sufría sordera y artrosis (**Figura 8**).



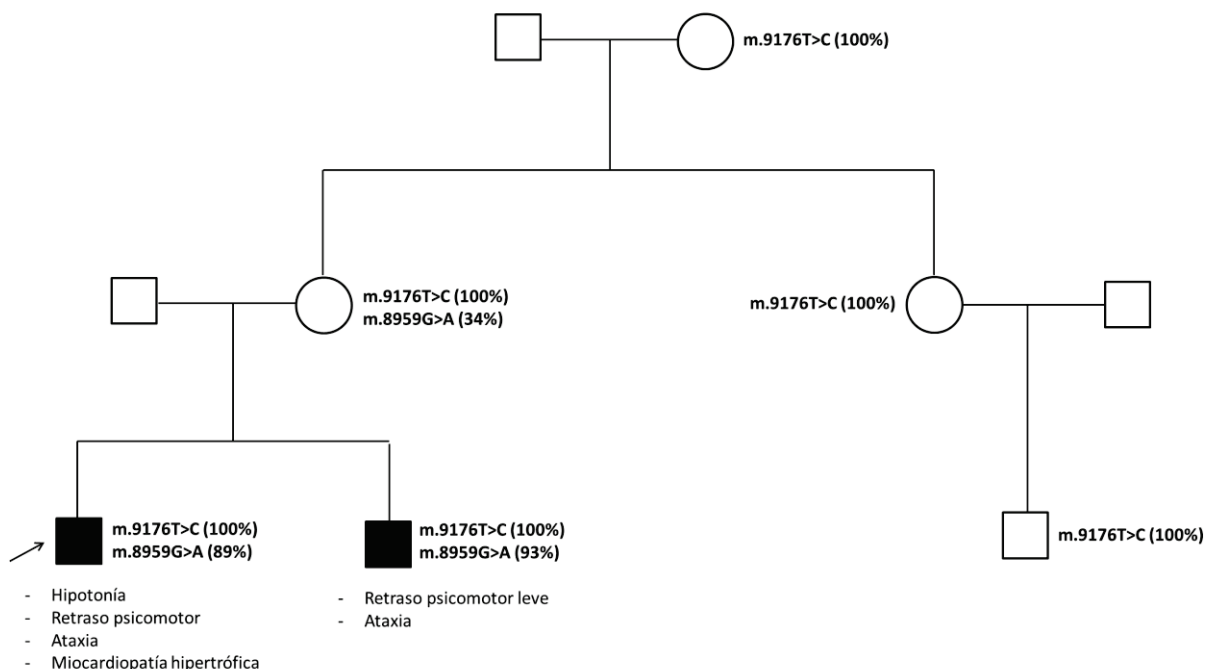
**Figura 8.** *Árbol familiar del Paciente 2 (caso índice).* IRC: Insuficiencia renal crónica. HTA: Hipertensión arterial.



Con los datos clínicos y los antecedentes familiares se sospechó de una posible Enfermedad Mitocondrial, por lo que se remitió a la Unidad de Enfermedades Mitocondriales de nuestro Hospital para cribado de Enfermedad Mitocondrial. En la exploración física destacó marcha atáxica con aumento de base de sustentación. En las exploraciones complementarias realizadas se observó una polineuropatía sensitivo motora en el electromiograma y múltiples lesiones en córtex de ambos hemisferios cerebrales compatibles con lesiones isquémicas por encefalopatía mitocondrial en la resonancia magnética cerebral. Con todos estos hallazgos se diagnosticó de encefalopatía epiléptica de origen mitocondrial tipo MELAS, con polineuropatía y retinitis pigmentosa. Ante la sospecha de enfermedad mitocondrial se realizó diagnóstico genético en muestras de ADN extraído de células uroepiteliales mediante NGS encontrándose la variante m.8424T>C (p.Leu20Pro) con una heteroplasmia del 94% en el gen *MT-ATP8*.

- Paciente 3

Niño que debuta a la edad de 9 meses con síntomas de hipotonía, retraso psicomotor y marcha atáxica desde el inicio de la deambulación. A los 6 años de edad persistían la ataxia y el retraso psicomotor, y presentaba un lenguaje escaso para la edad y una leve dismetría al manipular objetos. Posteriormente, desarrolló miocardiopatía hipertrófica. Como antecedente familiar de interés destaca un hermano con retraso psicomotor y ataxia. Los padres eran sanos y no consanguíneos. Abuela, tía y primo maternos también sanos (**Figura 9**).



**Figura 9.** *Árbol familiar del Paciente 3 (caso índice).* Se indican las variantes halladas y su grado de heteroplasmia en células sanguíneas en los miembros de la familia a los que se realizó el estudio de segregación.

Ante la sospecha de Enfermedad Mitocondrial, se solicitaron estudios bioquímicos y moleculares para confirmar o descartar esta sospecha. Se realizó diagnóstico genético en ADN procedente de tejido muscular mediante NGS encontrándose las variantes m.9176T>C en homoplasmia y m.8959G>A con un 92% de heteroplasmia.

## **1.2 Líneas celulares**

Con el objetivo de caracterizar funcional y estructuralmente las variantes en el mtDNA halladas en los pacientes descritos en el apartado anterior se establecieron una línea de cíbridos transmitocondriales mediante la técnica previamente descrita por Moraes *et al*<sup>160</sup>. para cada uno de ellos:

- Línea 1, se obtuvo a partir de plaquetas de la paciente 1, portadora de la variante m.8391G>A (p.Trp9Stop) en heteroplasmia en el gen *MT-ATP8*. Se obtuvieron 3 clones WT, dos clones con aproximadamente un 70% de heteroplasmia para la mutación y un clon homoplásmico para la mutación. Las medidas de heteroplasmia en los clones se midieron mediante secuenciación directa Sanger y PCR-RFLP (Métodos descritos en el apartado 2.6) y representan las medias obtenidas con ambos métodos.
- Línea 2, se obtuvo a partir de plaquetas del hermano varón del paciente 2, portador de la variante m.8424T>C (p.Leu20Pro) en un 42% de heteroplasmia en células sanguíneas en el gen *MT-ATP8*. Se obtuvieron 3 clones WT y 3 clones homoplásmico para la mutación. Las medidas de heteroplasmia en los clones se midieron mediante secuenciación directa Sanger.
- Línea 3, se obtuvo a partir de plaquetas de la madre del paciente 3, portadora de la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro) en homoplasmia y de la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys) con un 34% de heteroplasmia en células sanguíneas, ambas en el gen *MT-ATP6*. Se obtuvieron 3 clones homoplásmicos para la variante m.9176T>C y WT para la variante m.8959G>A y 3 clones homoplásmicos para ambas variantes. Adicionalmente, para una mejor interpretación y evaluación de los resultados, se utilizó como control adicional una línea de cíbridos WT de haplogrupo H mitocondrial (el mismo que el del paciente 3) dado que ninguno de los clones obtenidos en esta línea es completamente WT (poseen la variante m.9176T>C o las variantes m.9176T>C/ m.8959G>A).

### 1.3 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

En la presente tesis se utilizaron reactivos de grado analítico y aptos para biología molecular y cultivos celulares. A continuación, se recogen en la **Tabla 4** y **Tabla 5** los principales reactivos, soluciones y tampones utilizados.

*Tabla 4. Reactivos utilizados*

| Reactivo   | Casa comercial           | Uso   |
|--|--------------------------|---|
| 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP)                                  | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| 5-Bromouridina 10 mg/mL (BrdU)                                     | Sigma-Aldrich            | Cultivos celulares  |
| Ácido-5-5' ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)                        | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Adenosin 5'-trifosfato ATP (A2383-5G)                              | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad Complejo V                                 |
| Agua para biología molecular                                       | Merck                    | PCR/Secuenciación   |
| Albúmina de suero bovino (BSA)                                     | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Antimicina A   | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| BIOTAQ DNA Polimerasa (5 U/uL)                                     | BIOLINE                  | PCR   |
| Tampón de Sec. BigDye Terminator v1.1, v3.1 5X                     | Thermo Fisher Scientific | Secuenciación Sanger  |
| Citocromo C  | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Tampón de MgCl <sub>2</sub> 50 mM                                  | BIOLINE                  | PCR   |
| Tampón de reacción NH <sub>4</sub> 10X                             | BIOLINE                  | PCR   |
| Decilubiquinol   | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Decilubiquinona  | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Dimetilsulfóxido (DMSO)  | Sigma-Aldrich            | PCR/ Cultivos celulares                                     |
| Ditionita sódica   | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| DMEM suplementado con 4.5 g/L glucosa, piruvato y glutamina (DMEM) | Lonza                    | Cultivos celulares  |
| dNTPs (diluidos a 1mM)   | GE Healthcare Illustra   | PCR   |
| EDTA   | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| E-Gel SizeSelect 2% Agarose  | Invitrogen               | Secuenciación NGS mtDNA completo                            |
| Esferas magnéticas Agencourt AMPure                                | Beckman Coulter          | Purificación de productos en la generación de librerías NGS |
| Estándar de ADN GeneRuler 100 pb                                   | Thermo Fisher Scientific | PCR   |
| Ferricianuro potásico  | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad complejos de CRM                           |
| Fosfoenol piruvato (PEP)   | Sigma-Aldrich            | Medida Actividad Complejo V                                 |
| GelRed   | ProbioteK                | PCR   |
| Glucosa  | Sigma-Aldrich            | Medida parámetros bioenergéticos                            |

| Reactivo  | Casa comercial                  | Uso  |
|---|---------------------------------|--|
| Glutamina   | Sigma-Aldrich                   | Medida parámetros bioenergéticos           |
| HEPES   | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad Complejo V                |
| KCN   | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad complejos de CRM          |
| Kit de amplificación SequelPrep                       | Life Technologies               | Secuenciación NGS mtDNA completo           |
| Kit de purificación BigDye XTerminator                | Thermo Fisher Scientific        | Secuenciación Sanger                       |
| Kit de Purificación Illustra GFX PCR DNA and Gel Band | GE Healthcare Illustra          | PCR  |
| Kit de secuenciación de ciclos BigDye Terminador v3.1 | Thermo Fisher Scientific        | Secuenciación Sanger                       |
| Kit DNA 1000  | Agilent                         | Análisis fragmentos PCR-RFLP               |
| Kit ECL plus/prime Western Blotting Detection System  | GE Healthcare                   | SDS-PAGE/WB/BNE                            |
| Kit High Sensitivity DNA                              | Agilent                         | Cuantificación de librerías NGS            |
| Kit Ion Plus Fragment Library                         | Life Technologies               | Secuenciación NGS mtDNA completo           |
| Kit Ion Shear Plus Reagent                            | Life Technologies               | Secuenciación NGS mtDNA completo           |
| Kit NZY Tissue gDNA Isolation                         | NZYtech                         | Extracción ADN a partir de células         |
| Kit Pierce BCA Protein Assay                          | Thermo Fisher Scientific        | Cuantificación de proteínas                |
| Kit QIAamp DNA Blood Midi                             | QIAGEN                          | Extracción ADN de sangre                   |
| Kit QIAamp DNA Mini                                   | QIAGEN                          | Extracción ADN de tejido muscular          |
| Kit Seahorse XFp Cell Mito Stress Test                | Agilent                         | Medida parámetros bioenergéticos           |
| Kit Taqman RNaseP Control Reactions                   | Applied Biosystems              | qPCR                                       |
| Lactato Deshidrogenasa LDH 10 KU                      | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad Complejo V                |
| NADH  | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad complejos de CRM          |
| Oligomicina   | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad Complejo V                |
| Piruvato Kinasa 5KU                                   | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad Complejo V                |
| Piruvato sódico                                       | Sigma-Aldrich                   | Medida parámetros bioenergéticos           |
| Polietilenglicol (PEG)                                | Sigma-Aldrich                   | Generación híbridos                        |
| Puromicina 10 mg/ml                                   | Sigma-Aldrich                   | Cultivos celulares                         |
| Rotenona  | Sigma-Aldrich                   | Medida Actividad complejos de CRM          |
| Solución Penicilina/Estreptomicina 10K/10K            | Gibco, Thermo Fisher Scientific | Cultivos celulares                         |
| Suero Bovino Fetal (FBS)                              | Biowest                         | Cultivos celulares/ Obtención de plaquetas |
| Tampón fosfato salino (PBS)                           | GE Healthcare                   | Cultivos celulares                         |
| TaqMan Universal PCR Master Mix 2X                    | Applied Biosystems              | qPCR                                       |
| Trypsina 0,05% EDTA                                   | Gibco, Thermo Fisher Scientific | Cultivos celulares                         |

| Reactivo                | Casa comercial | Uso                                      |
|-------------------------|----------------|--|
| Tween 20                | Bio-Rad        | Medida Actividad complejos de CRM/BNE/WB |
| Uridina 50 mg/mL        | Sigma-Aldrich  | Cultivos celulares                       |
| XF Seahorse Base Medium | Agilent        | Medida parámetros bioenergéticos         |

Tabla 5. Soluciones y tampones

| Solución                   | Composición   | Uso   |
|----------------------------|---|---|
| 25mM ATP                   | 13.8 mg/mL en KHCO <sub>3</sub> 3%  | Medida Actividad Complejo V                   |
| Ánodo BNE                  | 50 mM Bis-Tris pH 7.0   | BNE   |
| Cátodo A                   | 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricina, 0.02% Serva Blue G-250   | BNE   |
| Cátodo B                   | 15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricina pH 7.0  | BNE   |
| Citrato Sódico             | Citrato Sódico 0.1M, NaCl 0.15M filtrado  | Obtención de plaquetas                        |
| Tampón de electroforesis   | 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS pH 8.3   | SDS-PAGE/WB                                   |
| Tampón de sacarosa         | 10 mM HEPES pH 7.6, 0.5 M sacarosa  | Obtención del pellet mitocondrial             |
| Tampón de transferencia    | 25mM Tris, 0.2M Glicina, 20% Metanol  | SDS-PAGE/WB/BNE                               |
| Medio congelación cíbridos | 80% Medio de cultivo rho 0, 20% DMSO  | Cultivos celulares                            |
| Medio de cultivo rho 0     | 90% DMEM, 10% FBS, 1% Penicilina, 1% Estreptomicina, 0.1% Puromicina, 0.1% Uridina  | Cultivos celulares                            |
| Medio DMEM bajo en glucosa | 90% DMEM sin glucosa, 10% FBS, 0.75 mg/mL galactosa, 0.25 mg/mL glucosa, 1% Penicilina, 1% Estreptomicina, 0.1% Puromicina, 0.1% Uridina                      | Ensayo proliferación celular                  |
| Medio selección cíbridos   | 90% DMEM, 10% FBS, 1% Penicilina, 1% Estreptomicina, 0.1% Puromicina, 1% BrdU   | Cultivos celulares                            |
| Buffer Mix                 | 1M Ácido aminocaproico, 75 mM Bis-Tris pH 7.0   | BNE   |
| Sample Buffer              | 750 mM Ácido aminocaproico, 50 mM Tricina, 0,5 mM EDTA, 0.02% Serva Blue G-250 pH 7.0   | BNE   |
| Solución A                 | NaCl 0.15M, Tris-HCL 15mM, pH 7.4   | Obtención de plaquetas                        |
| Solución B                 | 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 220 mM manitol, 70mM sacarosa, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, añadir en fresco antes de usar la solución B) | Obtención de pellet mitocondrial              |
| Solución congelación       | 70% Solución A, 20% FBS, 10% DMSO   | Obtención de plaquetas                        |
| Solución de bloqueo        | TRIS salino tamponado, 0.1% Tween-20, 5% leche desnatada en polvo   | SDS-PAGE/WB/BNE                               |
| Solución de lavado         | TBS 1x, 0.1% Tween-20   | SDS-PAGE/WB/BNE                               |
| Solución Krebs-Ringer      | 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM glucosa pH 7.4  | Medida del potencial de membrana mitocondrial |
| Tampón HEPES-Mg pH 8.0     | 2.46 mg/mL Sulfato de Mg heptahidratado en Tampón 100mM HEPES-KOH pH 8.0  | Medida Actividad Complejo V                   |

### 1.4 Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados se diseñaron con el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)<sup>162</sup> o OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>, Integrated DNA Technologies, IDT) y fueron sintetizados por la empresa IDT. El liofilizado se resuspendió en agua estéril Millipore (Merck) llevándolo a una concentración de 100 µM.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos.

| Gen            | Nombre      | Secuencia 5'-3'                  | Tm (°C) | Uso      |
|----------------|-------------|----------------------------------|---------|----------|
| <i>MT-ATP8</i> | Lys-ATP8 Fw | CGTCTTGCACTCATGAGCTGT            | 58      | PCR      |
| <i>MT-ATP8</i> | Lys-ATP8 Rv | GTAGGTGGTAGTTTGTGT               | 58      | PCR      |
| <i>MT-RNR1</i> | 12S Fw      | CCACGGGAAACAGCAGTGAT             | 60      | qPCR     |
| <i>MT-RNR1</i> | 12S Rv      | CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA        | 60      | qPCR     |
| -              | mt16426Fw   | CCGCACAAGAGTGCTACTCTCCTC         | 68      | L-PCR    |
| -              | mt16425Rv   | GATATTGATTTACGGAGGATGGTG         | 68      | L-PCR    |
| <i>MT-ATP6</i> | 8685F       | CCACCCAACAATGACTAATCAAATAA<br>CC | 61      | PCR      |
| <i>MT-ATP6</i> | 9256R       | GGCTGAGAGGGCCCTGTAGG             | 61      | PCR      |
| <i>MT-ATP6</i> | 9176F       | GGCCACCTACTCATGCACCTAA           | 60      | PCR-RFLP |
| <i>MT-ATP6</i> | 9176R MOD   | GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTTCCT      | 60      | PCR-RFLP |

Se especifica el nombre, gen, secuencia de los oligonucleótidos sentido (Fw) y antisentido (Rv) en dirección 5'→3', temperatura de fusión (Tm) y análisis en el que se usó. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; qPCR: PCR cuantitativa; L-PCR (PCR Larga).

### 1.5 Anticuerpos

**Tabla 7.** Anticuerpos primarios y secundarios

| Anticuerpo                 | PM (kDa) | Especie | Dilución | Casa comercial/Ref   | Uso    |
|----------------------------|----------|---------|----------|----------------------|--------|
| Anti-ATP5A                 | 60       | Ratón   | 1:2000   | Abcam/ab14748        | WB/BNE |
| Anti-ATP5B                 | 57       | Conejo  | 1:2000   | Abcam/ab128743       | WB/BNE |
| Anti-ATP5O                 | 23       | Ratón   | 1:2000   | Mitosciences/MS602-V | WB/BNE |
| Anti-ATP5H                 | 18       | Ratón   | 1:2000   | Abcam/ab110275       | WB/BNE |
| Anti-ATP8                  | 8        | Conejo  | 1:500    | Sta Cruz/sc-584231   | WB     |
| Anti-OXPHOS Human Cocktail | -        | Ratón   | 1:250    | Abcam/ ab110411      | WB     |
| Anti-SDHA                  | 73       | Ratón   | 1:5000   | Abcam/ab14715        | WB/BNE |
| Anti-NDUFA9                | 42       | Ratón   | 1:1000   | Abcam/ab14713        | BNE    |
| Anti-UQCRC2                | 48       | Ratón   | 1:2000   | Abcam/ab14745        | BNE    |
| Anti-COX5A                 | 17       | Ratón   | 1:1000   | Abcam/ab110262       | BNE    |
| GAMPO                      |          | Cabra   | 1:2000   | Cell Signaling/7076  | WB/BNE |
| GARPO                      |          | Cabra   | 1:2000   | Cell Signaling/7074  | WB/BNE |

## 1.6 Equipos

*Tabla 8. Equipos utilizados*

| Equipo   | Casa comercial     | Uso   |
|--|--------------------|---|
| 2100 Bioanalizador   | Agilent            | Análisis fragmentos PCR-RFLP, cuantificación de librerías NGS                     |
| 3130xl Genetic Analyzer  | Applied Biosystems | Secuenciación Sanger  |
| 7500 Fast Real-Time PCR  | Applied Biosystems | Determinación del número de copias de mtDNA (qPCR)                                |
| ChemiDoc MP Imaging System                                     | Bio-Rad            | Visualización de bandas proteicas (WB/BNE)  |
| Contador automático de células TC20                            | Bio-Rad            | Contaje de células  |
| Espectrofotómetro Epoch Microplate                             | BioTek             | Cuantificación de ADN y proteínas   |
| Espectrofotómetro UV-1800                                      | Shimadzu           | Medida actividad enzimática   |
| Fluorómetro Qubit 2.0  | Invitrogen         | Cuantificación de ácidos nucleicos  |
| Ion OneTouch ES  | Life Technologies  | Enriquecimiento de librerías amplificadas   |
| Ion Torrent OneTouch-2   | Life Technologies  | Amplificación clonal mediante PCR en emulsión                                     |
| Ion Torrent Personal Genome Machine-Ion PGM                    | Life Technologies  | Secuenciación NGS mtDNA completo  |
| Microscopio confocal Espectral LSM510 META ConfoCor 3          | ZEISS              | Análisis de ROS y Pot. de membrana  |
| Respirómetro Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer          | Agilent            | Medida parámetros bioenergéticos  |
| Transiluminador E-Gel iBase unit y Safe Imager transiluminator | Invitrogen         | Base de electroforesis y visualizador a tiempo real de bandas en geles de agarosa |

## 2. Métodos

### 2.1 Estudio de la cohorte de pacientes con mutaciones en el CV

Se ha recopilado la información clínica y genética de todos los pacientes con diagnóstico molecular confirmado de déficit en la ATP sintasa durante el periodo 1995-2020.

La información genética se ha obtenido a partir de la base de datos de Laboratorio. El diagnóstico genético se realizó, según cada caso, utilizando una de las siguientes técnicas: PCR-RFLP, minisequenciación, secuenciación directa (Sanger) o NGS. La recopilación de información clínica se ha obtenido, previa anonimización de todos los datos, a partir de los informes remitidos por los médicos solicitantes junto a la muestra para su diagnóstico bioquímico/molecular por parte del laboratorio de Enfermedades Mitocondriales. Los diferentes fenotipos se han codificado

siguiendo la nomenclatura del proyecto “*Human Phenotype Ontology*” (HPO)<sup>163</sup>, que cuenta con términos para más de 13.000 fenotipos clínicos y bioquímicos organizados de forma jerárquica, es decir existen términos más generales a partir del cual ramifican términos más específicos. Por ejemplo, del término “*Myopathy* HP:0003198” ramifican términos más específicos como “*Myofibrillar myopathy* HP:0003715” o “*Inflammatory myopathy* HP:0009071”. Se ha intentado elegir los términos más específicos siempre que ha sido posible.

## 2.2 Aislamiento de ADN genómico a partir de músculo y sangre

Se utilizó el kit QIAamp DNA Mini para la obtención de ADN genómico (ADNg) a partir de tejido muscular y el kit QIAamp DNA Blood Midi (**Tabla 4**) para la obtención de ADNg a partir de sangre periférica, siguiendo los protocolos del fabricante. Una vez aislado, la cuantificación y pureza del ADNg se analizó en el espectrofotómetro Epoch Microplate, teniendo en cuenta la relación A260/280 y A260/230. Se consideraron aptos valores superiores a 1,7. Las muestras de ADNg se conservaron a -20°C.

## 2.3 Amplificación y Secuenciación directa

En primer lugar, se amplificó, mediante PCR, el fragmento de ADN diana mediante el uso específico de oligonucleótidos (secuencia y Tm de los mismos en **Tabla 6**) a una concentración inicial de 20 µM. Cada reacción consta de 29.5 µL de agua para biología molecular, 10 µL de dNTPs, 5 µL de Buffer de reacción NH<sub>4</sub> 10X, 1.5 µL de Buffer de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de cada oligonucleótido (*Fw* y *Rv*), 0.25 µL de Biotaq DNA Polimerasa y 2 µL de ADN de la muestra (a un rango de concentración de 50-300 ng/µL). Las condiciones generales de las PCR, con pequeñas modificaciones según cada caso, fueron las siguientes:

| 32 ciclos      |                   |               |           |                 |        |
|----------------|-------------------|---------------|-----------|-----------------|--------|
| Desnat.Inicial | Desnaturalización | Anillamiento  | Extensión | Extensión Final |        |
| 95°C/5 min     | 94°C/1 min        | Tm Oligo. 30s | 72°C/ 40s | 72°C/10min      | 4°C/ ∞ |

Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0.5X, usando GelRed para la tinción de ADN y el estándar de ADN GeneRuler 100 pb como marcador de peso molecular. Posteriormente se purificaron usando el kit de purificación Illustra GFX PCR DNA and Gel Band (basado en el uso de columnas de microcentrifugación y tampones de captura, lavado y elución), siguiendo el protocolo del fabricante.

A continuación, 20 ng del ADN purificado se secuenciaron usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 mediante el método de terminación de cadena de ADN por incorporación de



dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs)<sup>164</sup>. Se usó uno de los oligonucleótidos utilizado en la PCR (*Foward* o *Reverse*) como *primer* de secuenciación a una concentración de 3.2 µM. Se eliminaron las sales y los terminadores BigDye no incorporados en la reacción de secuenciación usando el Kit de purificación BigDye XTerminator y una vez purificados los productos de la PCR de secuenciación se procesaron en el secuenciador de electroforesis capilar automatizado 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), acorde a las especificaciones del fabricante. Las secuencias se analizaron con el programa ChromasPro (Technelysium).

## 2.4 Secuenciación mtDNA completo por NGS

Para la secuenciación del mtDNA completo por NGS se utilizó ADN extraído de tejido muscular y enriquecido por amplificación mediante Long-range PCR (L-PCR) en un único amplicón. Para ello se utilizó el kit SequalPrep Long PCR Kit y los oligonucleótidos mt16426Fw y mt16425Rv (**Tabla 6**). La mezcla de reacción utilizada se ilustra en la **Tabla 9**:

*Tabla 9. Condiciones de la amplificación por L-PCR del mtDNA completo.*

| Reactivos                          | Volumen (µL) / muestra | Concentración final |
|------------------------------------|------------------------|---------------------|
| SequalPrep™ Reaction Buffer        | 2                      | 1x                  |
| DMSO                               | 0,4                    | -                   |
| SequalPrep™ 10x Enhancer B         | 2                      | 1x                  |
| SequalPrep™ Long Polimerasa, 5U/µL | 0,36                   | 1,8 U               |
| Agua libre-nucleasas               | 4,24                   | -                   |
| Cebador mt16426F (2 µM)            | 5 µL                   | 0.5 µM              |
| Cebador mt16425R (2 µM)            | 5 µL                   |                     |
| TOTAL                              | 19 µL                  | -                   |
| ADN músculo (5-10 ng)              | 1 µL                   |                     |

Las condiciones de la reacción de amplificación del mtDNA para L-PCR se muestran en la **Tabla 10**.

*Tabla 10. Condiciones de amplificación mediante L-PCR del mtDNA en un único amplicón.*

| Nº ciclos | Etapas                      | Temperatura (°C) | Tiempo                   |
|-----------|-----------------------------|------------------|--------------------------|
| -         | Activación de la polimerasa | 94               | 2 minutos                |
| 10 ciclos | Desnaturalización           | 94               | 10 segundos              |
|           | Anillamiento y extensión    | 68               | 17 minutos               |
| 20 ciclos | Desnaturalización           | 94               | 10 segundos              |
|           | Anillamiento y extensión    | 68               | 17 minutos<br>Δ20s/ciclo |
| -         | Extensión final             | 72               | 5 minutos                |

Tras la amplificación, los productos de la L-PCR obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa (SEAKEM®GTG®) del 0,8% con GelRed® (Biotium) al 5% (v/v).

### 2.4.1 Generación de librerías

Una vez realizada la amplificación del mtDNA completo en un amplicón se procedió a generar las librerías para su secuenciación en el secuenciador Ion Torrent Personal Genome Machine-Ion PGM. En primer lugar, se purificaron los productos de la L-PCR generados en el paso anterior con esferas Agencourt AMPure. Para ello se añadieron esferas AMPure (1.8x) al producto L-PCR en un tubo 1.5mL Lobind se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente las esferas se retuvieron en los tubos gracias al rack magnético *DynaMag* durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante con cuidado de no llevarse las esferas. Se añadieron 500 µL de etanol 70% (preparado en el mismo día) y se incubó durante 30 segundos. Cuando la solución estuvo transparente, se tiró el sobrenadante con cuidado de no llevarse el pellet. Se repitió este paso para realizar un segundo lavado. Posteriormente se dejó secar las esferas, manteniendo los tubos abiertos, a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se evaporase el etanol residual. Se retiraron los tubos del rack magnético y se añadieron 25 µL de low TE directamente al pellet con las esferas. Se mezcló durante 10 segundos. Se colocaron los tubos en el rack magnético durante 1 minuto y, cuando la solución se clarificó, se transfirió el sobrenadante (que contiene el ADN eluido) a un tubo 1,5mL Lobind con cuidado de no arrastrar el pellet.

Después se midió la concentración de las muestras de L-PCR purificadas mediante Qubit, según el protocolo dsDNA BR Assay kit. A continuación, se realizó una digestión enzimática del mtDNA para fragmentarlo con el kit Ion Shear Plus Reagent: se añadieron los reactivos indicados en la **Tabla 11** en un tubo de 1.5 mL LoBind, en el orden indicado, mezclándose posteriormente.

*Tabla 11. Mezcla de reacción para la fragmentación enzimática del mtDNA*

| Componentes                        | Volumen (µL) |
|------------------------------------|--------------|
| Muestra L-PCR purificada, 100ng    | γ            |
| Ion Shear Plus 10X Reaction Buffer | 5            |
| Agua libre-nucleasas               | 35- γ        |
| Total                              | 40           |

Posteriormente, se añadieron 10 µL de Ion Shear Plus Enzyme Mix II a la muestra, hasta completar un volumen final de 50 µL. Luego se mezcló la reacción mediante pipeteo de 8 a 10 veces. Se incubaron los tubos a 37°C en un termobloque durante 10 minutos y se añadieron 5 µL de Ion Shear Stop Buffer inmediatamente tras la incubación, mezclándose durante al menos 5 segundos.

Posteriormente se realizó una segunda purificación con esferas Agencourt AMPure (añadiendo 1.6x volúmenes de AMPure por volumen de muestra), siguiendo el mismo protocolo que en la primera purificación.

A continuación, se procedió a realizar la ligación de adaptadores y *barcodes* mediante el uso del kit Kit Ion Plus Fragment Library en un tubo de PCR de 0.2 mL en el que se combinaron los reactivos según se indica en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Mezcla de reacción para la ligación de adaptadores y *barcodes*

| Componentes                 | Volumen(μL) |
|-----------------------------|-------------|
| ADN digerido                | ~25         |
| 10X Ligase Buffer           | 10          |
| Ion Xpress P1 Adapter       | 2           |
| Ion Xpress Barcode X (1-32) | 2           |
| dNTP Mix                    | 2           |
| Agua libre-nucleasas        | 49          |
| DNA ligasa                  | 2           |
| Nick Repair Polimerasa      | 8           |
| Total                       | 100         |

Se mezcló mediante pipeteo y se cargó en un termociclador con el siguiente programa: 15 minutos a 25°C y 5 minutos a 72°C. Posteriormente se transfirió la reacción a un tubo de 1.5 mL LoBind y se realizó un nuevo paso de purificación con esferas Agencourt AMPure (añadiendo 1.6x volúmenes de AMPure por volumen de muestra), siguiendo el mismo protocolo que en las purificaciones previas.

A continuación, es necesario seleccionar los fragmentos de aproximadamente 300 pb y descartar el resto. Para ello se utilizó el E-Gel SizeSelect 2% Agarose Gel utilizando el E-Gel iBase unit y Safe Imager transilluminator siguiendo el protocolo del fabricante.

Para finalizar es necesario amplificar las librerías generadas. Para ello se usó el kit Ion Plus Fragment Library: se añadieron los reactivos de la **Tabla 13** en un tubo PCR de 0.2 mL, se mezclaron y se colocaron en el termociclador usando el programa de la **Tabla 14**.

**Tabla 13.** Mezcla de reacción para la amplificación de librerías

| Componentes                         | Volumen (μL) |
|-------------------------------------|--------------|
| Platinum PCR SuperMix High Fidelity | 100          |
| Library Amplification Primer Mix    | 5            |
| Unamplified library                 | 25           |
| Total                               | 130          |

**Tabla 14.** Condiciones utilizadas para la amplificación de librerías

| Nº ciclos | Etapas            | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|-------------------|------------------|--------|
| -         | Desnaturalización | 95               | 5 min  |
| 6 ciclos  | Desnaturalización | 95               | 15 seg |
|           | Hibridación       | 58               | 15 seg |
|           | Extensión         | 70               | 1 min  |

Por último, se realizó una doble purificación con Agencourt AMPure (añadiendo 1.5x volúmenes de AMPure por volumen de muestra en la primera purificación y 1.4x volúmenes en la segunda), siguiendo el mismo protocolo de purificaciones previas y se cuantificó la concentración de las librerías amplificadas en el 2100 Bioanalyzer usando el kit High Sensitivity DNA, siguiendo el protocolo del fabricante.

#### 2.4.2 Secuenciación por NGS

Una vez generadas las librerías, diez muestras con distintos *barcodes* se combinaron en cantidades equimolares (100 µM). A estas librerías se les realiza una amplificación clonal mediante PCR en emulsión utilizando la plataforma Ion Torrent OneTouch-2 y, posteriormente, un enriquecimiento de las esferas con librería (descartando las esferas vacías) en el equipo Ion OneTouch ES siguiendo los protocolos descritos por el fabricante. Finalmente, las esferas enriquecidas se cargaron en un chip semiconductor de formato 316 (300 Mb–1.0 Gb) según el protocolo del fabricante.

#### 2.4.3 Análisis de datos

Todas las secuencias generadas en el Ion Torrent Personal Genome Machine-Ion PGM se analizaron con Ion Torrent Software Suite usando el *plug-in* Torrent Variant Caller v4.0 (TVC) que emplea el alineador Torrent Mapping Alignment Program (TMAP). Los VCFs anotados por el *variant caller* se presentan en formato tabla como una lista de variantes que difieren de la secuencia de referencia NC\_012920 (rCRF) depositada en GenBank.

La anotación de variantes se realizó mediante la integración del archivo VCF con bases de datos procedentes de MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). La visualización y el filtrado manual de variantes de cada individuo según distintos parámetros (frecuencia poblacional, efecto en la proteína, predictores *in silico* de patogenicidad) se llevó a cabo en el mismo archivo con el anotado (en formato Excel).

## 2.5 Generación de cíbridos transmitocondriales

Las líneas de cíbridos transmitocondriales se obtuvieron a partir de la fusión, mediada por polietilenglicol<sup>165</sup> (PEG), de plaquetas procedentes de los pacientes o sus familiares como donante mitocondrial y células Rho0 puromicina resistentes, totalmente deplecionadas de mtDNA, procedentes de la línea celular tumoral de osteosarcoma 143B como donante nuclear. El proceso se detalla en las siguientes secciones.

### 2.5.1 Purificación de plaquetas

Se realizó a partir de muestras de sangre periférica en tubo de EDTA obtenida en las 24 h previas. Para ello se añadió a la sangre citrato sódico en relación 10:1 (sangre:citrato) y se centrifugó a 200 x g durante 20 minutos, con deceleración sin freno. A continuación, se recogió el plasma y se centrifugó a 1200 x g durante 20 minutos para obtener el sedimento con las plaquetas, las cuales se suspendieron en solución A y se centrifugaron a 1500 x g 20 minutos. Por último, se congelaron en solución de congelación y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### 2.5.2 Obtención de cíbridos.

Se descongelaron las células rho 0 y se mantuvieron en medio de cultivo al menos durante una semana para su estabilización. Posteriormente, cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80%, se procedió a realizar la fusión con las plaquetas. Para ello las células rho 0 se lavaron con PBS y se retiraron del soporte por tripsinización. Las células obtenidas se centrifugaron a 200 x g 5 minutos, se descartó el PBS, se resuspendieron en medio de cultivo y se contaron con un contador automatizado de células TC20 (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EEUU). Posteriormente se centrifugaron a 200 x g 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se diluyeron en medio de cultivo a una concentración final de  $5 \times 10^5$  células/mL.

En paralelo se centrifugaron las plaquetas a 1500 x g 15 minutos, con deceleración sin freno y se desechó el sobrenadante. Sobre las plaquetas sedimentadas se añadieron cuidadosamente (sin deshacer el *pellet*)  $10^6$  células rho 0 (2 mL aproximadamente) que se habían reservado anteriormente y se centrifugaron a 180 x g 10 minutos, con deceleración sin freno. A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ L de PEG para iniciar la fusión, mezclándose mediante pipeteo durante 3 minutos, y dejándose reposar 1 minuto, para posteriormente volver a mezclar mediante pipeteo 30 segundos más. A continuación, se diluyó la mezcla con células rho 0 y plaquetas con 900  $\mu$ L de medio rho 0 mediante pipeteo, y posteriormente se añadió más medio para completar un volumen final de aproximadamente 10 mL de suspensión de células. Dicha suspensión se volvió a centrifugar a 180 x g 10 minutos con deceleración sin freno y se retiró el sobrenadante. A continuación, las células se resuspendieron nuevamente en un volumen final de 10 mL que se sembraron en una placa de cultivo de 10 cm de

diámetro (Fisher Scientific, Cleveland, EEUU). Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Cuando la placa alcanzó aproximadamente el 80-90% de confluencia las células resultantes se levantaron mediante tripsinización y se duplicaron y subcultivaron para: i) determinar si los híbridos resultantes portaban la mutación de interés mediante secuenciación Sanger, ii) conservar parte de células en nitrógeno líquido; y iii) mantener el cultivo en pase, e iniciar el proceso de selección de híbridos (eliminación de células rho 0 no fusionadas para conservar solo los híbridos). A partir de este punto, como control de la selección también se mantuvo una placa de células Rho0.

El proceso de selección de híbridos comenzó una vez que los híbridos y las células rho 0 control alcanzaron una confluencia  $\approx 90\%$ . Para ello se cambió el medio de los híbridos y el de las células Rho0 por medio de selección de híbridos con 5-Bromouridina para eliminar del cultivo a las células Rho0, que son auxotróficas para la uridina, por selección en el medio hasta el momento de la desaparición de las células Rho0 del control de selección. Finalmente, una parte de los híbridos resultantes, se almacenó en nitrógeno líquido y otra se utilizó para realizar la dilución límite.

### **2.5.3 Selección de clones. Dilución límite**

Una vez realizada la selección se tripsinizaron los híbridos y se contaron usando el contador automatizado de células TC20 con el objetivo de dejarlas a una concentración  $\approx 10^6$  células/mL. A partir de esta concentración se realizaron varias diluciones seriadas 1/10 con el objetivo de sembrar varias placas con un número muy bajo de células. De esta manera cada célula pudo crecer en la placa de cultivo separada del resto, y cuando crecieron formando clones, se aislaron y se cuantificó la heteroplasmia para la variante de interés mediante secuenciación Sanger. Concretamente se sembró, en medio de selección:

- 2 placas placa de cultivo de 10 cm de diámetro con una concentración aproximada de 40 células/placa.
- 2 placas de 96 pocillos con 1 célula/pocillo. En uno de los pocillos se sembró una cantidad mayor (5000 células/pocillo) para facilitar el enfoque del microscopio al realizar el seguimiento de los clones.

En los días posteriores a la siembra de la dilución límite se llevó a cabo un seguimiento de las células que se consiguieron aislar. Para ello, en un plazo máximo de 24h desde el inicio de la siembra, se visualizaron las placas de cultivo en el microscopio para localizar todas las células que se quedaron aisladas (separadas) del resto, descartándose todas aquellas células que no lo estaban. También se visualizaron las placas con 96 pocillos y se seleccionó solo aquellos pocillos en los que se hubo sembrado una célula, descartándose el resto.

En los días siguientes se controló el crecimiento de las células seleccionadas y, cuando formaron un clon de unas 50-100 células (al cabo de aproximadamente 10 días) se levantó cada clon para cultivarlo en placas independientes. Para poder separar los clones aptos de las placas de cultivo de 10 cm de diámetro fue necesario el uso de cilindros de clonación (Sigma Aldrich), mientras que en las placas de 96 pocillos los clones se obtuvieron mediante tripsinización directa de los pocillos. En ambos casos se usó un volumen de 100  $\mu$ L de tripsina para levantar los clones y éstos se sembraron en placas de 24 pocillos. Según fueron creciendo se pasaron sucesivamente a placas de 12 y 6 pocillos, y por último a placas de cultivo de 10 cm de diámetro. Cuando las células estuvieron en las placas de 10 cm de diámetro se obtuvo un *pellet* celular de cada clon para extraer ADN y comprobar mediante secuenciación Sanger la heteroplasmia de cada uno, y se desecharon aquellos clones cuya heteroplasmia no resultó de interés (generalmente todos aquellos que no sean 100% WT o 100% mutantes). Todos los clones así seleccionados se mantuvieron en cultivo durante un periodo de dos meses para estabilizar su número de copias de mtDNA.

### 2.5.4 Mantenimiento de líneas celulares

Una vez finalizado el proceso de estabilización del número de copias de mtDNA, se comprobó mediante qPCR (ver apartado correspondiente) el número de copias de mtDNA de cada clon. A partir de este punto los clones se mantuvieron en cultivo utilizando el medio de cultivo rho 0 en placas Petri, cambiando el medio cada 2 días, y subcultivándose al alcanzar una confluencia del 80-90%.

## 2.6 Caracterización molecular de las líneas celulares

### 2.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico total de los cíbridos se utilizó el kit comercial NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYtech, Lisboa, Portugal) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el método se basa en el uso de columnas de sílice y un tampón de lisis que contiene Proteinasa K y SDS para la liberación del ADN. Posteriormente el ADN es adsorbido de forma selectiva en las columnas, mientras que las impurezas (sales, proteínas, etc) son desechadas durante los pasos de lavado. Una vez realizada la extracción se cuantificó el rendimiento del ADN obtenido mediante medida de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTek, Vermont, EEUU).

### 2.6.2 Secuenciación Sanger

Ver apartado 2.3. Amplificación y Secuenciación directa.

### 2.6.3 PCR-RFLP y electroforesis microfluídica

El porcentaje de heteroplasmia para la mutación m.8391G>A en músculo y en los clones de su línea de híbridos se determinó mediante un ensayo de PCR-RFLP. En primer lugar, se procedió a amplificar mediante PCR un fragmento de 413 pb usando los primers Lys-ATP8 *Fw* y *Rv* detallados en la **Tabla 6** y siguiendo las siguientes condiciones:

*Tabla 15. Condiciones de amplificación del ensayo PCR-RFLP.*

| Desnat.Inicial | 30 ciclos         |              |             | Extensión Final | Extensión |
|----------------|-------------------|--------------|-------------|-----------------|-----------|
|                | Desnaturalización | Anillamiento | Extensión   |                 |           |
| 94°C/5 min     | 94°C/1 min        | 58°C/1 min   | 72°C/ 90seg | 72°C/10min      | 4°C/ ∞    |

El producto de la amplificación se incubó con la enzima de restricción “Cfr13I” dos horas a 37°C, generando tres fragmentos de aproximadamente 85, 145 y 195 pb respectivamente en las moléculas de ADN WT, y generando dos fragmentos de 195 pb y 230 pb en las moléculas portadoras de la mutación m.8391G>A. Los productos de la digestión se separaron y visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed y se analizaron por electroforesis microfluidica en DNA Chip-Electrophoresis (Kit DNA 1000) en el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California), usando 1 uL de ADN del producto de digestión según el protocolo del fabricante.

La mutación m.9176T>C en músculo y en los clones de su línea de híbridos también se determinó mediante un ensayo de PCR-RFLP. Se procedió a amplificar mediante PCR un fragmento de 179 pb usando los primers 9176F y 9176R MOD detallados en la **Tabla 6** y siguiendo las condiciones detalladas en la **Tabla 15**. El producto de la amplificación se incubó con la enzima de restricción “ScrFI” dos horas a 37°C y posteriormente 20 minutos a 65°C, obteniéndose un fragmento de 179 pb en las moléculas de ADN WT, y generando dos fragmentos de 152 pb y 27 pb en las moléculas portadoras de la mutación m.9176T>C. Los productos de la digestión se separaron y se analizaron de forma análoga a la descrita para la mutación m.8391G>A en el punto anterior.

### 2.6.4 Estudio del número de copias de mtDNA por qPCR

Para comprobar si entre los diferentes clones obtenidos de cada línea celular existía una diferencia significativa en el número de copias de mtDNA, lo cual podría actuar como factor de confusión a la hora de evaluar el efecto de las variantes en el modelo celular, se cuantificó mediante PCR cuantitativa (qPCR) el número de copias de mtDNA de cada clon una vez terminada la selección de clones y cuando ya se había estabilizado el número de copias de mtDNA. Para ello se usaron dos sondas Taqman (Thermo Fisher, Massachusetts, EEUU), una específica del gen mitocondrial



*MT-RNR1*, marcada con FAM, y otra del gen nuclear RNasa P, marcada con VIC, calculándose la cantidad relativa de mtDNA y nDNA a partir de sus respectivos CTs.

Las muestras de ADN se diluyeron en agua para biología molecular a una concentración de 10 ng/μL, analizándose cada muestra por triplicado. La amplificación y detección del gen mitocondrial *MT-RNR1* se realizó usando los primers 12S Forward y 12S Reverse especificados en el apartado de oligonucleótidos (**Tabla 6**), y la sonda TaqMan Ribosomal 12S 6FAM-5' – TGCCAGCCACCGCG -3'- MGB (Life Technologies). Para la amplificación y detección del gen nuclear RNasa P se utilizó el kit Taqman RNaseP Control Reactions.

Como calibradores del ensayo se usaron dos plásmidos, uno conteniendo el amplicon mitocondrial y otro el gen nuclear. Su construcción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Andreu et al<sup>166</sup>. Ambos plásmidos se mezclaron a un ratio mtDNA/nDNA de 100, y se diluyeron en Tris 10 mM pH=8.5 para obtener un valor de Ct de 14-16.

Una vez preparada la curva de calibración se preparó una mezcla de reacción con 10 μL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 0.5 μL de 12S Forward 5 μM, 0.5 μL de 12S Reverse 0.5 μM, 0.5 μL sonda TaqMan Ribosomal 12S 5 μM, 1 μL RNase P 20X y 15 μL de agua para biología molecular para un volumen total por reacción de 15 μL. Se alicuotaron los 15 μL de la mezcla de reacción en cada uno de los pocillos de la placa; y se añadió 5 μL de cada muestra o punto de la curva, y 5 μL de agua para biología molecular para los blancos. La amplificación a tiempo real (qPCR) se llevó a cabo usando el equipo HT7500 Fast Real-Time PCR System con las siguientes condiciones:

|            |             |              |            |
|------------|-------------|--------------|------------|
|            |             | 45 ciclos    |            |
| 50°C/2 min | 95°C/10 min | 95°C /15 seg | 60°C/1 min |

Para cada clon la determinación se realizó por triplicado en células obtenidas al inicio, punto medio y final de la fase de estabilización. Se consideró que el número de copias de mtDNA se había estabilizado si entre los puntos intermedio y final la variación del número copias de mtDNA no superó el 20%.

## **2.7 Caracterización funcional de las líneas celulares**

### **2.7.1 Ensayo de proliferación celular**

Los ensayos de proliferación celular se realizaron según el protocolo descrito por Blanco-Grau et al<sup>167</sup> con pequeñas modificaciones en cuanto a la composición del medio de cultivo y la duración del ensayo. Para ello se sembraron 25.000 células en frascos de cultivos de 75 cm<sup>2</sup> en medio de

cultivo rho 0 durante 24 horas. Pasado este tiempo el medio se substituyó por *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) bajo en glucosa (descrito en la **Tabla 5** de “Soluciones y tampones”), considerándose este momento como el inicio del experimento (tiempo = 0). A partir de este momento se mantuvieron las células en cultivo durante 4 días (tiempo = 96 horas) y, una vez transcurrido este periodo, se levantaron las células por tripsinización y se contaron en un contador automatizado TC20. Se realizaron 3 ensayos independientes de proliferación celular para cada clon de cada una de las 3 líneas celulares.

### 2.7.2 Cadena Respiratoria Mitocondrial y ATP Sintasa

La medida de la actividad de los complejos de la CRM, la citrato sintasa (CS) y la ATP sintasa se realizó en lisados totales de cíbridos cultivados en medio de cultivo rho 0 obtenidos a una confluencia del 80-90%: para ello los lisados celulares se obtuvieron sonicando en tampón con manitol con una relación 1:3 células:tampón (volumen:volumen) dos veces durante 15 s en hielo, con un minuto de incubación en hielo entre ambas. Se cuantificó la concentración de proteínas con el kit Pierce BCA Protein Assay según el protocolo del fabricante. Finalmente, los lisados se diluyeron en tampón de lisis para dejar una concentración de proteínas final de 3 mg/mL.

Las determinaciones de la actividad enzimática de la CS y los complejos de la CRM (CI, CII, CIII y CIV) se realizaron espectrofotométricamente según el protocolo descrito por Medja et al<sup>168</sup>, con un Espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-1800. Las variaciones de absorbancia se registraron durante 3 minutos a 37°C. Los valores de actividad de los complejos de la CRM y ATP sintasa se normalizaron por la actividad de la CS y se expresaron como cU/UCS.

La actividad CS se midió monitorizando el aumento de la absorbancia a 412 nm por reducción del ácido-5-5' ditiono-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) por la Coenzima A libre (CoA-SH), acoplada a la producción de citrato a partir de oxalacetato catalizada por la CS. El medio de reacción contenía 100 mM Tris-HCl pH 8.1, DTNB 100 µM, Triton™ X-100 0,1% y Acetil CoA 300 µM. Como iniciador de la reacción se añadieron 60 microgramos de lisado celular y oxalacetato 500 µM. La actividad se calculó a partir de la variación de absorbancia por reducción del DTNB y su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 13.6 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), y se expresó en nmol/min/mg de proteína.

La actividad citrato sintasa se utilizó para estimar el contenido mitocondrial y normalizar las actividades enzimáticas de los complejos OXPHOS.

La actividad enzimática del complejo I (NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidoreductasa) se midió monitorizando el descenso en la absorbancia de NADH a 340 nm, debido a la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> acoplado a la reducción de la decilubiquinona. Para ello se utilizó medio de

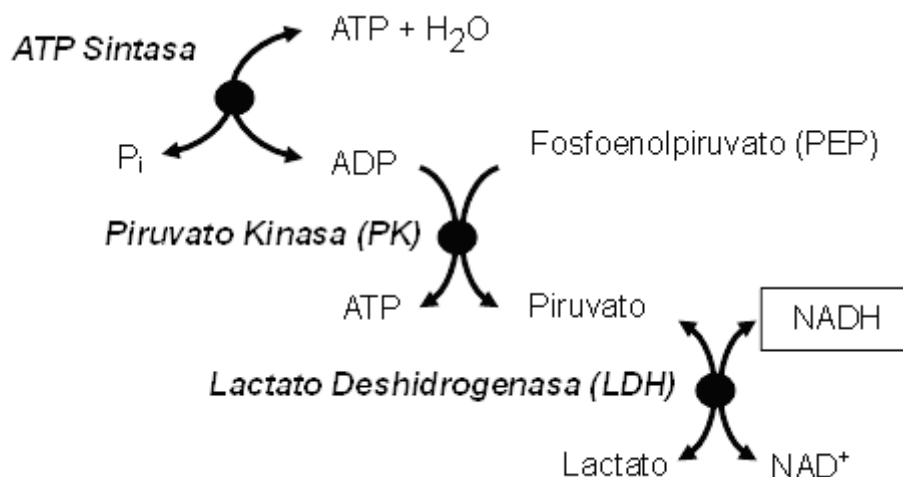
ensayo conteniendo tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5, BSA 3.75 mg/mL y decilubiquinona 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ g de lisado celular. El ensayo se realizó en duplicado en ausencia y presencia de rotenona 2,5 mM como inhibidor del CI. La reacción se inició con NADH 100  $\mu$ M, registrándose durante 3 minutos la disminución de absorbancia. La actividad se calculó como la diferencia entre la actividad en presencia y ausencia de rotenona y utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH ( $\epsilon = 6.22 \times 10^{-3} \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

La actividad enzimática del complejo II (succinato deshidrogenasa) se midió siguiendo la disminución en la absorbancia a 600 nm por reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) acoplada a la oxidación de ubiquinol a ubiquinona. El medio de reacción contenía tampón fosfato potásico 25 mM pH 7.5, succinato 20 mM, DCPIP 50  $\mu$ M, KCN 1 mM y BSA 2 mg/ml. La reacción se verificó con 60  $\mu$ g de lisado celular y se midió la línea base durante 3 minutos. La reacción se inició añadiendo decilubiquinona 100  $\mu$ M y registrándose la variación de absorbancia durante 3 minutos. La actividad se calculó a partir de la diferencia de la variación de absorbancia con decilubiquinona menos la línea base y utilizando el coeficiente de extinción molar del DCPIP ( $\epsilon = 19.1 \times 10^{-3} \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

La actividad enzimática del complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa) se midió monitorizando la reducción del citocromo c a 550 nm, acoplada a la oxidación de decilubiquinol a ubiquinona. Para ello se utilizó medio de reacción conteniendo tampón fosfato potásico 25 mM pH 7.5, citocromo c 75  $\mu$ M, KCN 0,5 mM, EDTA 0,1 mM y Tween-20 0,025% (v/v) y 60  $\mu$ g de proteínas de lisado celular, en presencia y ausencia de antimicina A 10  $\mu$ g/mL para la inhibición específica del CIII. La reacción se inició con decilubiquinol 100  $\mu$ M y registrándose a continuación el incremento de la absorbancia durante 3 minutos. La actividad se calculó a partir de la variación de absorbancia en presencia y ausencia de antimicina A, con el coeficiente de extinción molar del citocromo c ( $\epsilon = 18.5 \times 10^{-3} \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

La actividad enzimática del complejo IV (citocromo c oxidasa) se midió monitorizando el descenso en la absorbancia a 550 nm provocado por la oxidación del citocromo c reducido en el medio de reacción. El medio de ensayo contenía citocromo c 100  $\mu$ M reducido (90-95%) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,0. La reacción se inició con 60 microgramos de lisado celular y se siguió 3 minutos a 37°C. La actividad se calculó a partir de la variación de absorbancia por la oxidación citocromo c, con el coeficiente de extinción molar del citocromo c ( $\epsilon = 18.5 \times 10^{-3} \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

La actividad enzimática del complejo V (ATP Sintasa) se midió según el protocolo descrito por Haraux et al<sup>169</sup>. con pequeñas modificaciones. El ensayo se basa en la valoración de la actividad ATPasa (hidrólisis de ATP a ADP) de la ATP Sintasa mediante el sistema acoplado ilustrado en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Representación esquemática del ensayo espectrofotométrico para la medida de la actividad ATPasa de la ATP Sintasa. Adaptado de Haraux et al<sup>169</sup>.

En presencia de piruvato kinasa (PK) el ADP producido por la ATP Sintasa es utilizado para la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato por la piruvato quinasa, regenerando el ATP. A continuación, la lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción de este piruvato en lactato produciendo la oxidación de NADH en  $NAD^+$ , que se midió monitorizando el descenso en la absorbancia de NADH a 340 nm a 30°C.

El medio de reacción contenía HEPES-Mg 50 mM pH 8.0, NADH 0.2mM, PEP 2.5mM, 5  $\mu$ L de PK, 10  $\mu$ L de LDH y 2  $\mu$ g/mL de antimicina A. El ensayo se realizó con 150 microgramos de proteína y a continuación se midió la línea base durante 3 minutos. La reacción se inició añadiendo ATP 2.5mM midiéndose la actividad ATPasa durante 3 minutos. Finalmente, se añadió 2  $\mu$ g/ml de oligomicina y se registró la variación de absorbancia otros 2 minutos. La actividad ATPasa se calculó a partir de la diferencia de la variación de absorbancia en presencia y ausencia de oligomicina (inhibidor específico de la ATP Sintasa) con el coeficiente extinción molar del NADH ( $\epsilon = 6.22 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

### 2.7.3 Función del sistema OXPHOS

Para analizar la función del sistema OXPHOS se determinó el consumo de oxígeno OCR (Oxygen Consumption Rate) mediante respirometría de alta resolución con un analizador Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent, Santa Clara, California), realizando un test de estrés mitocondrial mediante la inyección secuencial de oligomicina 2,6  $\mu$ M, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 2  $\mu$ M, y una mezcla de rotenona y antimincina A 1  $\mu$ M (para cada compuesto) preparados con el kit comercial XFp Cell Mito Stress Test (Agilent). Para llevar a cabo el ensayo se sembraron 30.000 células por pocillo en placas XFp Cell Culture

Miniplate en medio de cultivo rho 0, y se mantuvieron en un incubador de CO<sub>2</sub> 24 h. Posteriormente, el medio se sustituyó por medio XF Seahorse Base pH 7,4 suplementado con glucosa 2,5 mM, piruvato sódico 100 mM y glutamina 200 mM, y se incubaron a 37°C sin CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. A continuación, la placa se introdujo en el bionalizador y se realizaron cuatro inyecciones secuenciales de los compuestos, una de oligomicina, dos inyecciones sucesivas de FCCP, 1µM cada una, y una inyección final con la mezcla de rotenona y antimicina A.

Dicho protocolo permite la obtención de los siguientes parámetros:

- Respiración no mitocondrial (OCRnm), es el OCR tras la inyección de rotenona y antimicina A.
- Respiración mitocondrial basal (OCR basal), se calculó como el OCR en condiciones basales, antes de inyectar ningún compuesto, menos el OCRnm.
- Respiración máxima (OCRmax), representa la capacidad máxima de funcionamiento de la CR. Se calculó como el OCR obtenido tras la inyección de FCCP menos el OCR no mitocondrial.
- Respiración sensible a oligomicina (OCRo), representa el consumo de oxígeno mitocondrial invertido en la producción de ATP. Se calculó como la diferencia entre el OCR en condiciones basales y el OCR tras la inyección de oligomicina.
- Permeabilidad a H<sup>+</sup>: se calculó como el OCRo menos el OCRnm.

Asimismo, se analizó la función glucolítica utilizando el kit comercial XFp Glycolysis Stress Test en el sistema XFp Extracellular Flux Analyzer, para determinar la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR), que representa fundamentalmente la producción de lactato. En el ensayo se añadieron secuencialmente glucosa 25 Mm, oligomicina 2,6 µM y 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) 100 mM. La siembra y tratamiento posterior de las células se realizó en las mismas condiciones del Mito Stress Test, pero el medio se reemplazó por medio XF Seahorse Base Medium sin glucosa, suplementado sólo con piruvato sódico 100 mM y glutamina 200 mM. A continuación, se realizaron las tres inyecciones secuenciales de los compuestos mencionados que permite la obtención de los siguientes parámetros:

- Acidificación no glucolítica: Es la acidificación producida por otros procesos celulares independientes de la glucolisis. Se obtiene tras la inyección de 2DG.
- Glucolisis Basal, representa la actividad glucolítica basal de la célula, medida tras inyectar glucosa al medio celular. Se calcula como el ECAR tras inyección de glucosa menos el ECAR inicial o acidificación no glucolítica.
- Capacidad glucolítica máxima, se alcanza tras inyectar oligomicina y detener la producción de ATP de origen mitocondrial. Se calculó como el ECAR tras inyección de oligomicina menos el ECAR inicial.

- Reserva glucolítica, es la capacidad de aumentar la actividad glucolítica en respuesta a un incremento de la demanda energética. Se calculó como ECAR tras inyección de oligomicina menos el ECAR tras la inyección de glucosa (o glucolisis basal).

#### **2.7.4 SDS-PAGE/Western Blot**

Para la obtención de fracciones enriquecidas en mitocondrias se recogieron células a un 80-90% de confluencia y se resuspendieron en 5 mL de Solución B (**Tabla 5**) y se homogeneizaron en un homogenizador de tipo Potter-Elvehjem en hielo. El homogeneizado se centrifugó a 800 x g 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sedimento y se reservó el sobrenadante conteniendo la fracción mitocondrial que se centrifugó a 16.000 x g 15 minutos a 4 °C, para obtener un sedimento con la fracción enriquecida en mitocondrias. Ésta se resuspendió en Solución B y se volvió a centrifugar a 16.000 x g 15 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la fracción mitocondrial resultante en tampón con sacarosa (**Tabla 5**). Por último, se cuantificó la concentración de proteínas utilizando el kit Pierce BCA protein Assay según el protocolo del fabricante.

Para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se utilizaron 30 µg de proteína de muestra enriquecida en fracción mitocondrial en tampón de carga Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EEUU) que se separaron en geles de poliacrilamida al 12% Mini-PROTEAN TGX Precast (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, EEUU), a 100V durante los primeros 30 minutos y posteriormente a 150V.

A continuación, se realizó una inmunodetección de las proteínas de interés mediante Western Blot, por electrotransferencia húmeda con tampón de transferencia (**Tabla 5**) a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare), previamente activadas en metanol. Posteriormente las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (**Tabla 5**) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de las membranas se hibridaron con los anticuerpos primarios (preparados en TBS, Tween-20 0.1% y leche desnatada en polvo al 2-5%) según las concentraciones detalladas en la **Tabla 7**, y se incubaron a 4 °C en agitación hasta el día siguiente. Posteriormente se lavaron tres veces a temperatura ambiente 10 minutos en agitación con solución de lavado (**Tabla 5**) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (información detallada en la **Tabla 7**) a temperatura ambiente durante 1 hora. Por último, se realizaron dos lavados con solución de lavado y otros dos lavados con TBS sin Tween-20, todos ellos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las bandas proteicas se revelaron con ECL plus/prime Western Blotting Detection System y se visualizaron con un ChemiDoc MP Imaging System. El análisis densitométrico se realizó mediante cuantificación de la señal quimioluminiscente presente en las membranas usando el programa ImageJ v1.46r (Wayne Rasband, NIH).

### 2.7.5 Electroforesis Azul Nativa - Blue Native Electrophoresis (BNE)

La electroforesis azul nativa (Blue Native Electrophoresis, BNE) permite evaluar el ensamblaje y estabilidad de complejos multiproteicos. Se basa en la separación de los complejos por electroforesis en condiciones nativas en función de su peso molecular. La técnica fue descrita por Schägger y Von Jagow<sup>72</sup> y se basa en la solubilización de proteínas de membrana con ácido aminocaproico y la unión de azul Coomassie, cargado negativamente, a la superficie de los complejos para facilitar la electroforesis. El método se llevó a cabo siguiendo protocolos previamente descritos<sup>73</sup>.

La obtención de los extractos enriquecidos en fracción mitocondrial se realizó de manera análoga a la descrita en el apartado 2.7.4 SDS-PAGE Electroforesis/Western Blot. A continuación, el extracto se centrifugó a 16.000 x g 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las mitocondrias obtenidas se resuspendieron en *Buffer Mix* (**Tabla 5**). A continuación, se añadió el volumen necesario de digitonina 20 µg/µL diluida en PBS para obtener una ratio de 4 gramos de digitonina por gramo de muestra (o de 2 gramos digitonina por gramo de muestras para análisis de la ATP Sintasa). Después se incubaron en hielo durante 15 minutos, con agitación suave a intervalos de 5 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 16.000 x g 30 minutos 4 °C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que se diluyó 1/10 (vol/vol) en *Sample Buffer* (**Tabla 5**).

De la muestra resultante se cargaron 40µg de proteína de muestra por pocillo en geles BNE PAGE 3-12% Bis-Tris (Invitrogen, Massachusetts, EEUU), utilizándose ferritina como marcador de peso molecular (440 kDa, dímero: 880 kDa). Como tampón para el cátodo de la electroforesis se utilizó Cátodo A y como tampón para el ánodo se utilizó Ánodo BNE (**Tabla 5**). La primera fase de la electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 30V durante 1-2h (hasta que el frente de migración alcanzó la mitad del gel, aproximadamente) y posteriormente se sustituyó el Cátodo A por Cátodo B (**Tabla 5**), continuando la electroforesis a 30V durante 13 horas a 4 °C. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas mediante transferencia húmeda a membranas de PVDF con Buffer de transferencia (**Tabla 5**) a un voltaje constante de 30V durante aproximadamente 16 horas (“overnight”). Una vez finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana con Solución de bloqueo y se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios de forma análoga a la detallada en la sección 2.7.4 SDS-PAGE/Western Blot. El análisis densitométrico se realizó mediante cuantificación de la señal quimioluminiscente presente en las membranas usando el programa ImageJ v1.46r (Wayne Rasband, NIH).

### 2.7.6 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Para la valoración de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó la sonda fluorescente diacetato-diclorofluoresceína (DA-DCF) que se incorpora a la célula donde difunde y se hidroliza a 2',7'-diclorofluoresceína, que al ser polar se queda retenida. La 2',7'-diclorofluoresceína intracelular se oxida rápidamente a 2',7'-diclorofluoresceína altamente fluorescente en presencia de ROS o peróxido de hidrógeno en las células<sup>170</sup>, emitiendo con un máximo a 522 nm.

Para llevar a cabo el experimento se sembraron 40.000 células en medio rho 0 en placas 1 $\mu$ -Slide 4 well ibiTreat Microscopy Chamber (ibidi, Gräfelfing, Alemania) y se dejaron en incubador de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células se incubaron en PBS con 5mM glucosa y DA-DCF 10 mM a 37 °C durante 20 minutos en incubador de CO<sub>2</sub>. A continuación, se lavaron con la solución tampón en PBS 3 veces. En paralelo se mantuvo un pocillo sin marcar como control negativo y un pocillo se trató con 200  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como control positivo. Las células se visualizaron en un microscopio confocal LSM510 META (Zeiss, Jena, Alemania) con un objetivo de 40x apocromático a temperatura ambiente. El análisis de la fluorescencia celular se realizó usando el programa ImageJ v1.46r (Wayne Rasband, NIH). La medida de fluorescencia se realizó calculando la fluorescencia total celular corregida (FTCC): FTCC = Densidad integrada - (Área celular x Fluorescencia media).

### 2.7.7 Análisis del Potencial de Membrana

Para determinar el potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) mediante microscopía confocal se utilizó la sonda fluorescente tetra-metil rodamina etil éster (TMRM, Sigma, San Luis, EEUU) en células vivas según el protocolo de Davidson *et al*<sup>171</sup>. Se sembraron 40.000 células en medio rho 0 en placas 1 $\mu$ -Slide 4 well ibiTreat Microscopy Chamber (ibidi) y se mantuvieron en incubador de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37°C. A continuación, el medio se sustituyó por tampón Krebs-Ringer modificado (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), incubándose 30 minutos en incubador a 37 °C, y posteriormente se añadió TMRM 20 nM. Inmediatamente se realizó la toma de imágenes con un objetivo 63x planopocromático iluminando las células con un láser de 543 nm ajustado a una intensidad del 1,5% en el microscopio confocal LSM510 META (Zeiss). El análisis de la fluorescencia celular se realizó usando el programa ImageJ v1.46r (Wayne Rasband, NIH).



### **2.7.8 Análisis de la ultraestructura mitocondrial**

El análisis la ultraestructura mitocondrial por microscopía electrónica se realizó en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM) de la Universidad Autónoma de Madrid.

Las células en cultivo se fijaron en glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 4% en PBS durante 90 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y posteriormente rasparon con raspador Costar, se fijaron en OsO<sub>4</sub> al 1% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente fueron deshidratadas en series graduadas de etanol, se fijaron en Epon 812 (Fluka) y se polimerizaron a 60 °C durante 2 días. Se obtuvieron imágenes de secciones celulares ultrafinas (90 nm) con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010 equipado con una cámara digital 4K × 4K TemCam-F416 (TVIPS, Gauting, Alemania). Se analizaron las imágenes con el programa ImageJ v1.46r (Wayne Rasband, NIH) para obtener descriptores de tamaño y forma mitocondriales<sup>172</sup> seleccionando manualmente solo mitocondrias claramente discernibles. También se midió el número de crestas por sección mitocondrial.

### **2.8 Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, excepto los experimentos de microscopía confocal que se realizaron por duplicado. Los resultados se muestran como valores de media ± desviación estándar (DE). Los valores estadísticos de p se obtuvieron mediante la aplicación del test de Kruskal-Wallis con el método de corrección de Bonferroni para comparaciones de más de dos grupos. El análisis estadístico y la generación de gráficos se llevó a cabo con el software estadístico R (4.0.1)<sup>173-175</sup> y el nivel de significación estadística se estableció en 0.05

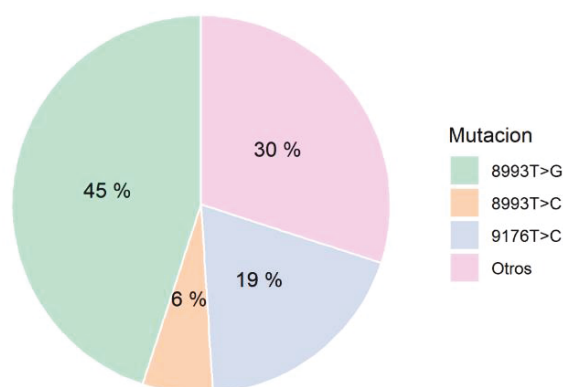
## **RESULTADOS**

### 1. Estudio de una cohorte de pacientes con mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* del complejo V del sistema OXPHOS.

Se recogió información clínica y genética de un total de 67 individuos con mutaciones en los genes *MT-ATP6* o *MT-ATP8*, tanto pacientes sintomáticos como familiares asintomáticos, pertenecientes a 29 familias diferentes. De ellos, 59 individuos presentaban mutaciones en el gen *MT-ATP6* (87%) y 8 individuos (13%) presentaban mutaciones en el gen *MT-ATP8*. En la **Tabla 16** y en la **Figura 11** se resumen las diferentes variantes y la frecuencia en las que se han encontrado. Se observa el predominio de las mutaciones más frecuentemente descritas en el gen *MT-ATP6*: m.8993T>G (45%) y m.9176T>C (19%)<sup>125</sup>.

**Tabla 16.** Variantes y frecuencia de las mismas halladas en la cohorte de pacientes.

| Variante              | Proteína                   | Frecuencia | Gen            |
|-----------------------|----------------------------|------------|----------------|
| m.8993T>G             | p.Leu156Arg                | 29         | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9176T>C             | p.Leu217Pro                | 13         | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8424T>C             | p.Leu20Pro                 | 6          | <i>MT-ATP8</i> |
| m.8993T>C             | p.Leu156Pro                | 4          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9035T>C             | p.Leu170Pro                | 3          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9176T>C / m.8959G>A | p.Leu217Pro<br>p.Glu145Lys | 3          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8579C>T             | p.Pro18Leu                 | 2          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9185T>C             | p.Leu220Pro                | 2          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8391G>A             | p.Trp9Ter                  | 1          | <i>MT-ATP8</i> |
| m.8403T>C             | p.Ile13Thr                 | 1          | <i>MT-ATP8</i> |
| m.8716dupT            | p.Lys64Ter                 | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9124A>G             | p.Thr200Ala                | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9204_9205delAT      | p.Ter227Met                | 1          | <i>MT-ATP6</i> |



**Figura 11.** Distribución de variantes en la cohorte de 67 pacientes. Las variantes m.8993T>G y m.9176T>C resultaron las más frecuentes (64%).

Algunas de las familias fueron estudiadas más exhaustivamente que otras desde el punto de vista clínico y genético, lo que provoca algunos sesgos en la distribución de las variantes, una limitación de este análisis. Como ejemplo, la variante m.8424T>C en el gen *MT-ATP8* es una variante rara identificada en los miembros de una única familia, pero que al haberse estudiado la segregación en un mayor número de miembros de la misma aparece como una de las variantes más frecuentes superando incluso a otras mutaciones ampliamente descritas (como la m.8993T>C en el gen *MT-ATP6*). Para evitar este sesgo, en la **Tabla 17** se muestra la distribución de las variantes agrupadas por familias (29 en total):

**Tabla 17.** Variantes y frecuencia de las mismas halladas en las 29 familias diferentes que forman la cohorte de pacientes.

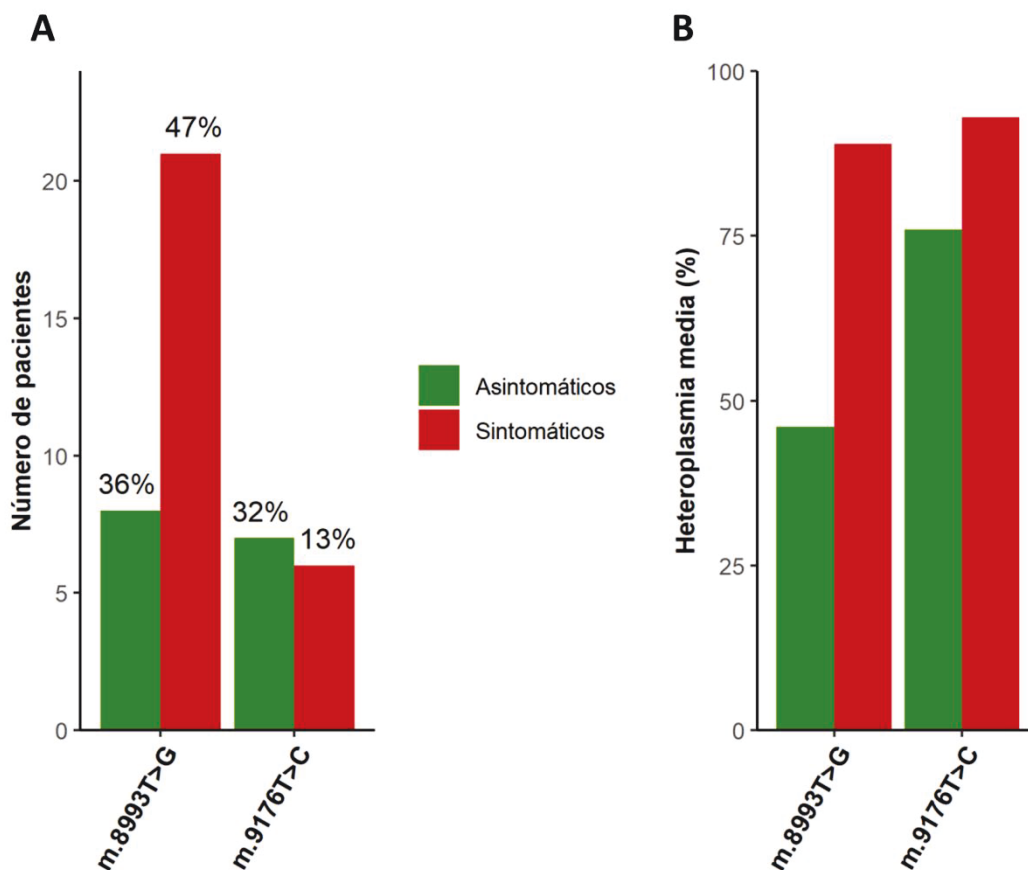
| Variante              | Frecuencia | Gen            |
|-----------------------|------------|----------------|
| m.8993T>G             | 15         | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8993T>C             | 2          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9176T>C             | 2          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9204_9205delAT      | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9185T>C             | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9176T>C / m.8959G>A | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9124A>G             | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.9035T>C             | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8579C>T             | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8716dupT            | 1          | <i>MT-ATP6</i> |
| m.8424T>C             | 1          | <i>MT-ATP8</i> |
| m.8403T>C             | 1          | <i>MT-ATP8</i> |
| m.8391G>A             | 1          | <i>MT-ATP8</i> |

### 1.1 Características genotípicas de los pacientes de la cohorte

De los 67 pacientes de la cohorte, 22 (33%) eran asintomáticos. Entre los asintomáticos las variantes más frecuentes fueron la m.8993T>G (n = 8; 36%) y la m.9176T>C (n = 7; 32%), mientras que entre los pacientes sintomáticos las variantes más frecuentes fueron la m.8993T>G (n = 21; 47%), m.9176T>C (n = 6; 13%) y la m.8424T>C (n = 6; 13%), aunque, como se ha mencionado anteriormente, ésta última variante solo se halló en los miembros de una misma familia. El porcentaje de heteroplasma en células sanguíneas de las diferentes variantes fue mayor en los pacientes sintomáticos,  $84 \pm 9\%$  (I.C. 95%) que en los individuos asintomáticos,  $60 \pm 13\%$  (I.C. 95%). Para el estudio comparativo en la cohorte se utilizó el valor de

heteroplasmia determinado en células sanguíneas debido a que es el único tejido que fue estudiado en la mayoría de individuos.

El análisis de la distribución de las dos variantes más frecuentes, m.8993T>G y m.9176T>C, ambas en el gen *MT-ATP6*, entre los dos grupos de individuos, sintomáticos y asintomáticos, reveló que la proporción de pacientes con la variante m.8993T>G en el grupo de sintomáticos es ligeramente mayor que en el grupo de asintomáticos (47% vs 36%), mientras que en el caso de la variante m.9176T>C la proporción en el grupo de pacientes sintomáticos es considerablemente menor (13%) que en el grupo de individuos asintomáticos (32%) (**Figura 12**, Panel A). En cuanto a los niveles de heteroplasmia de estas dos variantes en ambos grupos, la variante m.8993T>G presentó una heteroplasmia media del 46% entre los individuos asintomáticos y del 89% entre los pacientes sintomáticos mientras que la variante m.9176T>C presentó una heteroplasmia media del 76% entre los asintomáticos y del 93% en los sintomáticos (**Figura 12**, Panel B), siendo la variante que presentó un mayor porcentaje de heteroplasmia media en el grupo de individuos asintomáticos (**Tabla 18**).

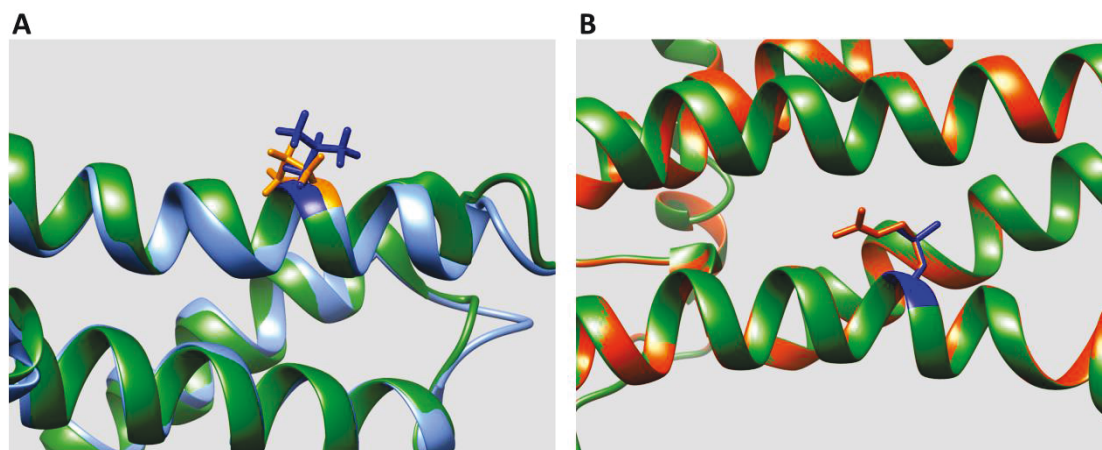


**Figura 12. Panel A:** Número de pacientes por grupo (sintomáticos y asintomáticos) para las dos variantes más frecuentes halladas en la cohorte. En la parte superior de la barra se indica la proporción de la variante dentro de cada grupo. **Panel B:** Heteroplasmia media de las dos variantes para cada grupo de pacientes.

Se realizó una predicción estructural de las dos variantes más frecuentes en la cohorte (m.9176T>C; p.Leu217Pro y m.8993T>G; p.Leu156Arg) usando el software de modelado por homología SWISS-MODEL<sup>176</sup>. Los resultados se muestran en la **Figura 13**.

**Tabla 18.** Variantes y heteroplasmia media de las mismas en el grupo de pacientes asintomáticos.

| Variante  | Heteroplasmia media (%) |
|-----------|-------------------------|
| m.9176T>C | 76                      |
| m.8993T>C | 73                      |
| m.8959G>A | 63                      |
| m.8993T>G | 46                      |
| m.9035T>C | 43                      |
| m.8579C>T | 38                      |



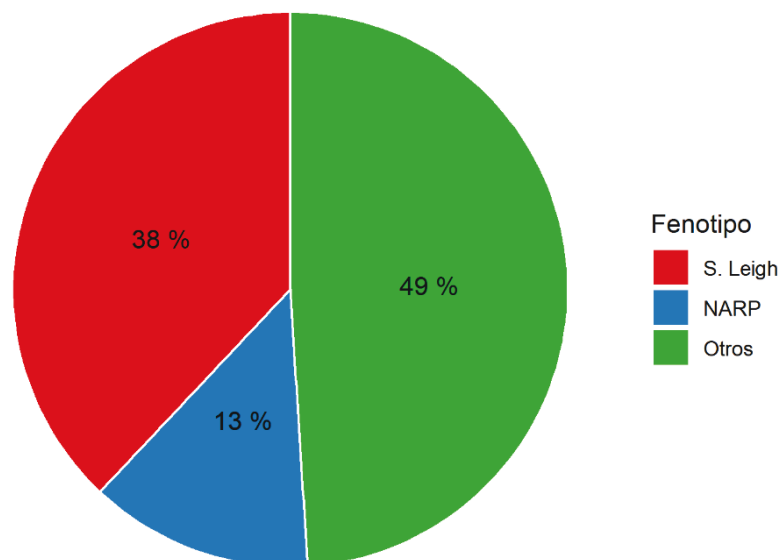
**Figura 13.** Predicción estructural de las variantes m.9176T>C y m.8993T>G. **Panel A:** Efecto de la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro). Se observa que la prolina (naranja) desestabiliza la  $\alpha$ -hélice de la proteína mutante (en azul). **Panel B:** Efecto de la variante m.8993T>G (p.Leu156Arg). La arginina en la posición 156 (naranja) no parece afectar la  $\alpha$ -hélice donde se ubica, pero el mayor tamaño del residuo podría afectar a regiones cercanas. El análisis se realizó mediante el software SWISS-MODEL; la proteína *wild type* se indica en color verde.

## 1.2 Características fenotípicas de los pacientes de la cohorte

La descripción fenotípica de los pacientes se ha realizado, por una parte, teniendo en cuenta su “fenotipo global”, es decir teniendo en cuenta el conjunto de fenotipos individuales que da nombre a los diferentes síndromes de origen mitocondrial, por ejemplo, Síndrome de Leigh (MIM

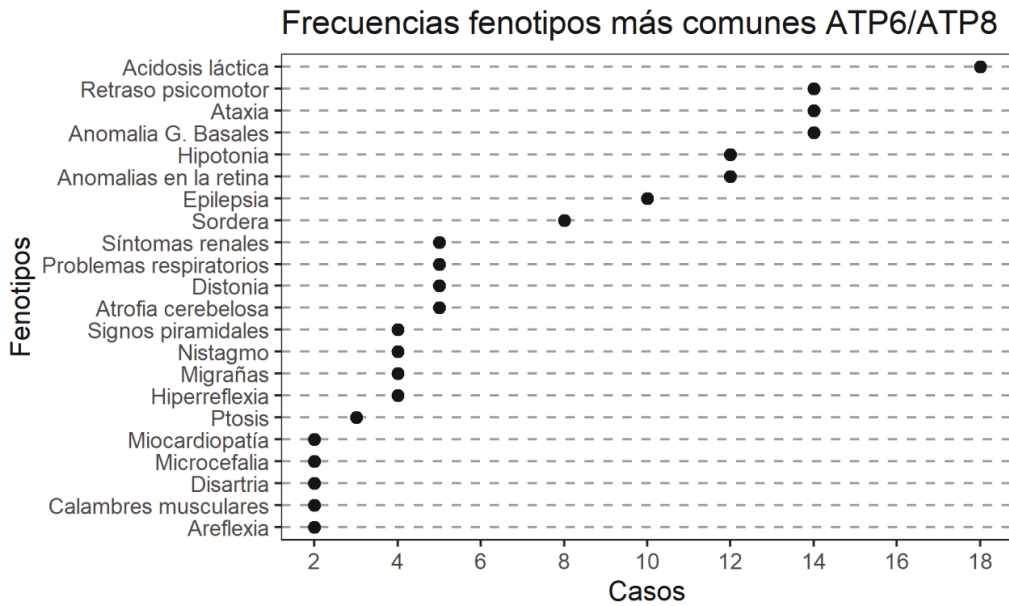
#256000), Neuropatía Ataxia y Retinitis Pigmentosa (NARP, MIM #551500) o Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios similares a ictus (MELAS, MIM #540000) y, por otra parte, tomando los diferentes fenotipos individuales usando el término de la *Human Phenotype Ontology* (HPO)<sup>163</sup> más específico posible para cada síntoma (por ejemplo términos tales como “acidosis láctica”, “ataxia” o “anomalías en la retina”).

Aproximadamente un 50% de los pacientes sintomáticos se pudo categorizar en alguno de los síndromes mitocondriales clásicos: 23 de los 45 pacientes con síntomas (51%) se clasificaron como síndrome de Leigh (17 pacientes, 38%) o NARP (6 pacientes, 13%) (**Figura 14**). El resto de pacientes sintomáticos presentó un solo fenotipo o el conjunto de síntomas no se pudo categorizar claramente en ninguno de los síndromes mitocondriales típicos previamente comentados.



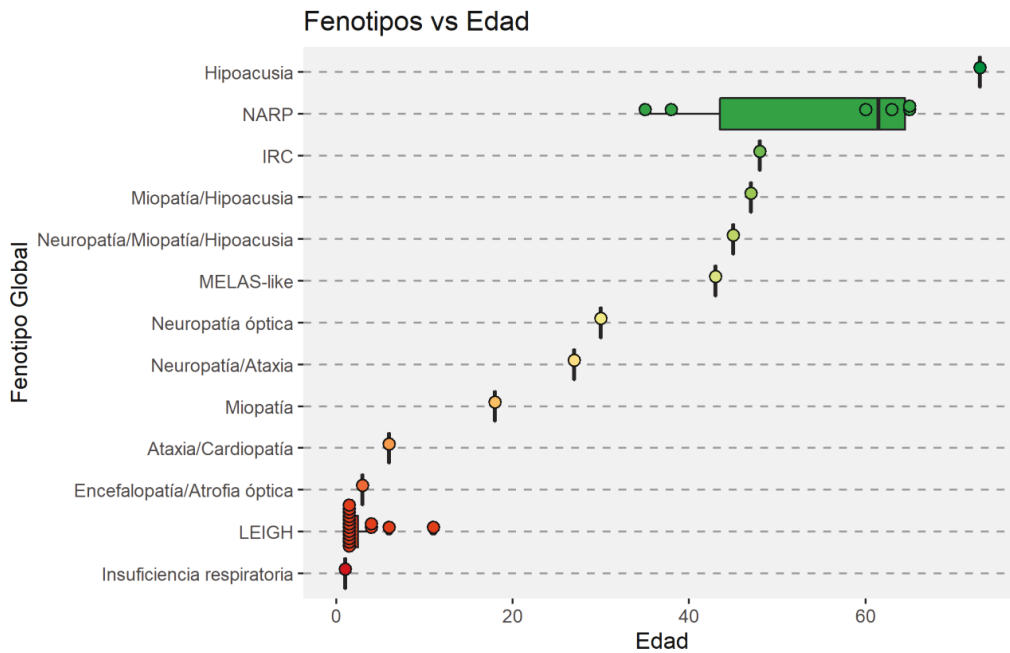
**Figura 14.** Proporción de pacientes diagnosticados con Síndrome de Leigh o NARP. En “Otros” se engloban los pacientes no catalogados dentro de algún síndrome mitocondrial típico o presentaba un solo síntoma.

En cuanto a los fenotipos individuales, los más comunes fueron “Acidosis láctica” con término HPO HP:0003128, presente en 18 pacientes, “Retraso psicomotor” (HP:0001263) en 14 pacientes, “Ataxia” (HP:0001251) en 14 pacientes y “Anomalía en Ganglios Basales” (HP:0002134) en 14 pacientes. En total se pudieron asignar hasta 33 fenotipos individuales diferentes. En la **Figura 15** se resumen los fenotipos encontrados y su frecuencia (únicamente se presentan los fenotipos que aparecen en al menos dos pacientes). Una posible limitación de estos resultados se podría deber a la variabilidad de información clínica disponible en los archivos del laboratorio, ya que el período de inclusión es extenso y la normalización e informatización de los datos de origen clínico ha variado y ha ido evolucionando en ese período.



**Figura 15.** Frecuencia de fenotipos individuales en pacientes con mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP-8*. Fenotipos individuales y número de casos (pacientes) en los que aparecen, ordenados de más frecuentes (arriba) a menos frecuentes (abajo). Solo se muestran aquellos fenotipos que han aparecido en al menos dos pacientes.

Por último, en la **Figura 16** se resumen la edad de los pacientes al inicio de la enfermedad en función del fenotipo. Como cabría esperar, los pacientes con síntomas más graves debutan a una edad más temprana. Por ejemplo, la media de edad de debut en los pacientes con síndrome de Leigh es de 3 años mientras que aquella en los pacientes con NARP es de 54 años.



**Figura 16.** Fenotipos en función de la edad de aparición de los síntomas. Los fenotipos más severos (parte inferior de la gráfica) debutan a una edad más temprana que los más leves (parte superior). IRC: Insuficiencia renal crónica.



## 2. Paciente 1: Caracterización genético-molecular

La única variante con potencial patogénico priorizada en el análisis de los datos obtenidos por secuenciación NGS del mtDNA completo de tejido muscular de la paciente 1 fue la sustitución m.8391G>A (p.Trp9Ter) en el gen *MT-ATP8*. La variante mostró una heteroplasmia del 77%. El resto de variantes identificadas fueron polimorfismos homoplásmicos que predijeron el haplogrupo mitocondrial U4a1b. La presencia de esta variante fue analizada en otros tejidos de la paciente y en sus familiares por secuenciación Sanger y, además, se estudió el grado de heteroplasmia mediante PCR-RFLP y electroforesis microfluídica en bioanalizador. Los resultados se resumen en la **Tabla 19**:

**Tabla 19.** Heteroplasmia de la variante m.8391G>A en distintos tejidos de la paciente 1 y en sus familiares.

| Paciente                | % Ht (sangre) | % Ht (células uroepiteliales) |
|-------------------------|---------------|-------------------------------|
| <b>P1 (caso índice)</b> | 24            | 36                            |
| <b>Madre P1</b>         | 0             | NA                            |
| <b>Hermana P1</b>       | 0             | NA                            |
| <b>Tía materna P1</b>   | 0             | NA                            |

Los valores representan las medias de la heteroplasmia obtenida mediante secuenciación Sanger y PCR-RFLP-electroforesis microfluídica. NA: No analizado. Ht: heteroplasmia.

Debido a la ausencia de la variante en madre, hermana y una tía materna de la paciente por ambos métodos, se asumió que probablemente se trataba de una mutación *de novo*, lo cual, junto con el efecto en la proteína predicho por el tipo de variante (truncante) y su presencia en heteroplasmia en distintos tejidos apoyan la patogenicidad de la misma.

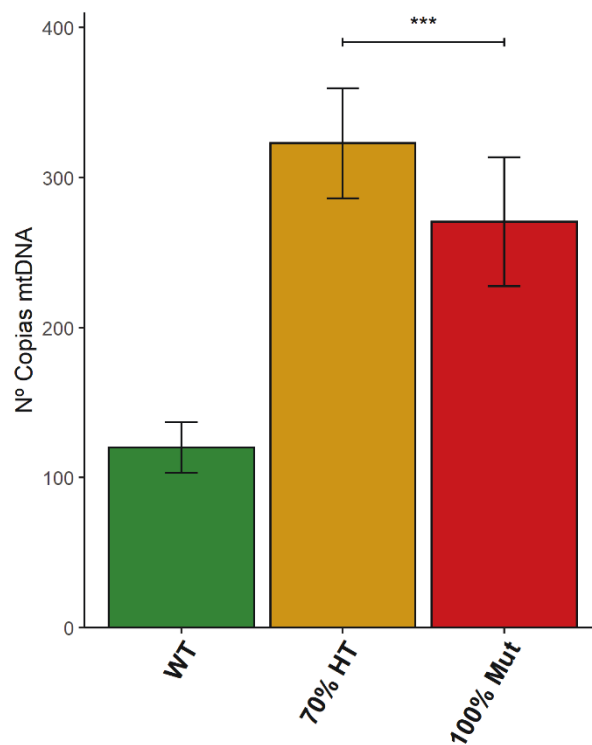
### 2.1 Paciente 1: Estudio molecular y bioquímico de la variante m.8391G>A en cíbridos transmitocondriales

Se estableció una línea de cíbridos transmitocondriales con la variante m.8391G>A. Mediante el proceso de selección de clones y estudio de su heteroplasmia por secuenciación Sanger y PCR-RFLP detallados en el apartado “Material y Métodos” se obtuvieron 3 clones WT, dos clones ≈ 70% heteroplásmicos y un clon homoplásmico (100% mutante). Con el objetivo de caracterizar los efectos de la variante a nivel bioquímico y estructural se realizaron los siguientes experimentos, cuyos resultados se detallan a continuación: tasa de proliferación celular, medida de actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa, perfil bioenergético, análisis de los niveles de proteínas de la ATP Sintasa y otros complejos OXPHOS mediante SDS-PAGE/WB, análisis estructural mediante BNE, estudio de la producción de ROS y del potencial

de membrana mitocondrial mediante microscopía confocal y análisis morfológico mitocondrial mediante microscopía electrónica.

### a) Estudio del número de copias de mtDNA

El estudio del número de copias de mtDNA, una vez transcurrido el periodo necesario para su estabilización, reveló una diferencia significativa entre los clones WT y los mutantes: el clon 100% mutante mostró un incremento en el número de copias de mtDNA del 225% respecto a los valores de los clones WT, mientras que los clones 70% heteroplásmicos mostraron un incremento del 270% respecto a los clones WT (**Figura 17**).

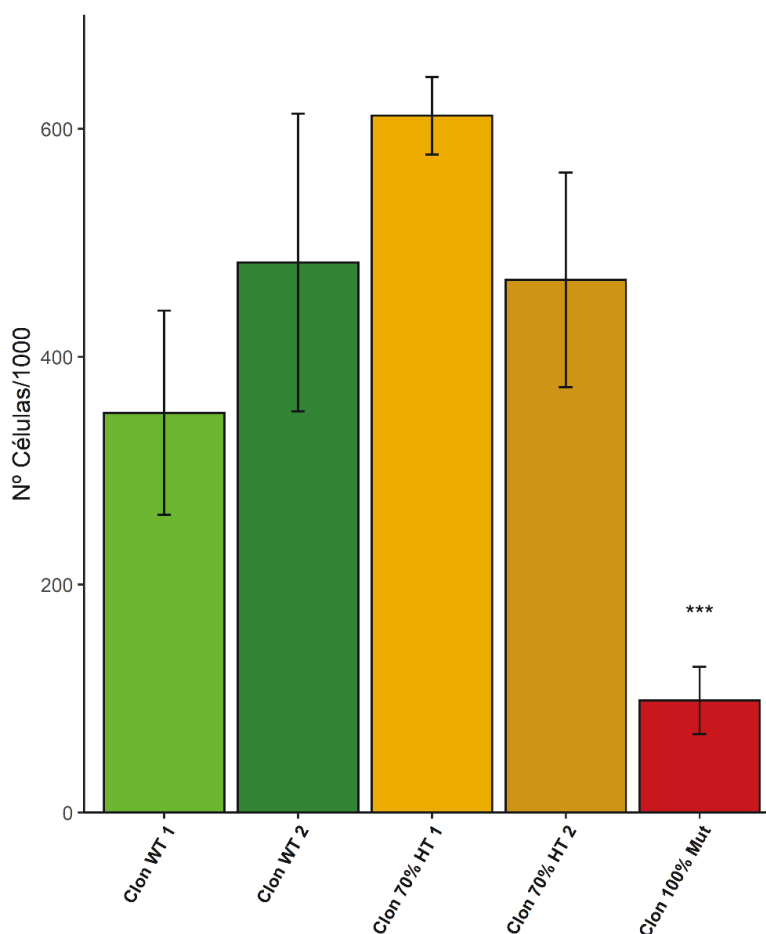


**Figura 17.** Número de copias de mtDNA de los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A*. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

### b) Tasa de proliferación celular

La tasa de proliferación celular reveló un crecimiento notablemente inferior del clon 100% mutante respecto a los clones WT y los 70% heteroplásmicos tras 96 horas desde la suplementación de las células con DMEM bajo en glucosa: se observó un aumento en el número de células de 1700% respecto a las sembradas inicialmente en los clones WT y del 2100% en los clones heteroplásmicos, mientras que el clon 100% mutante solo mostró un incremento del 400%.

No se encontraron diferencias significativas entre los clones WT y los 70% heteroplásmicos (**Figura 18**).

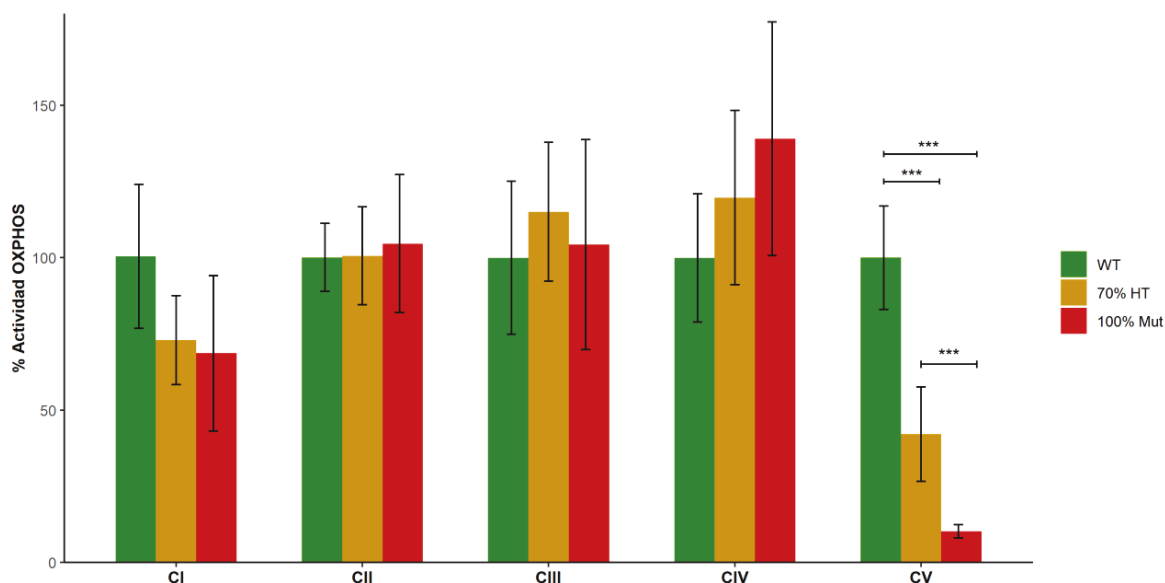


**Figura 18.** Proliferación celular de los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A* tras 96 horas en medio de cultivo bajo en glucosa. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE, (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

### c) Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa

La medida de la actividad de los complejos de la CRM (CI-CIV) no reveló diferencias significativas en ninguno de los complejos de la CRM entre los clones WT, los 70% heteroplásmicos y el 100% mutante.

La actividad de la ATP Sintasa (CV), que fue valorada como actividad ATPasa (hidrólisis de ATP a ADP), mostró valores disminuidos estadísticamente significativos respecto a las actividades del clon WT. La actividad ATPasa fue un 10% de la actividad del clon WT en el clon 100% mutante, y resultó un 42% de actividad respecto a los valores WT en los clones 70% heteroplásmicos. Los resultados se muestran en la **Figura 19**:



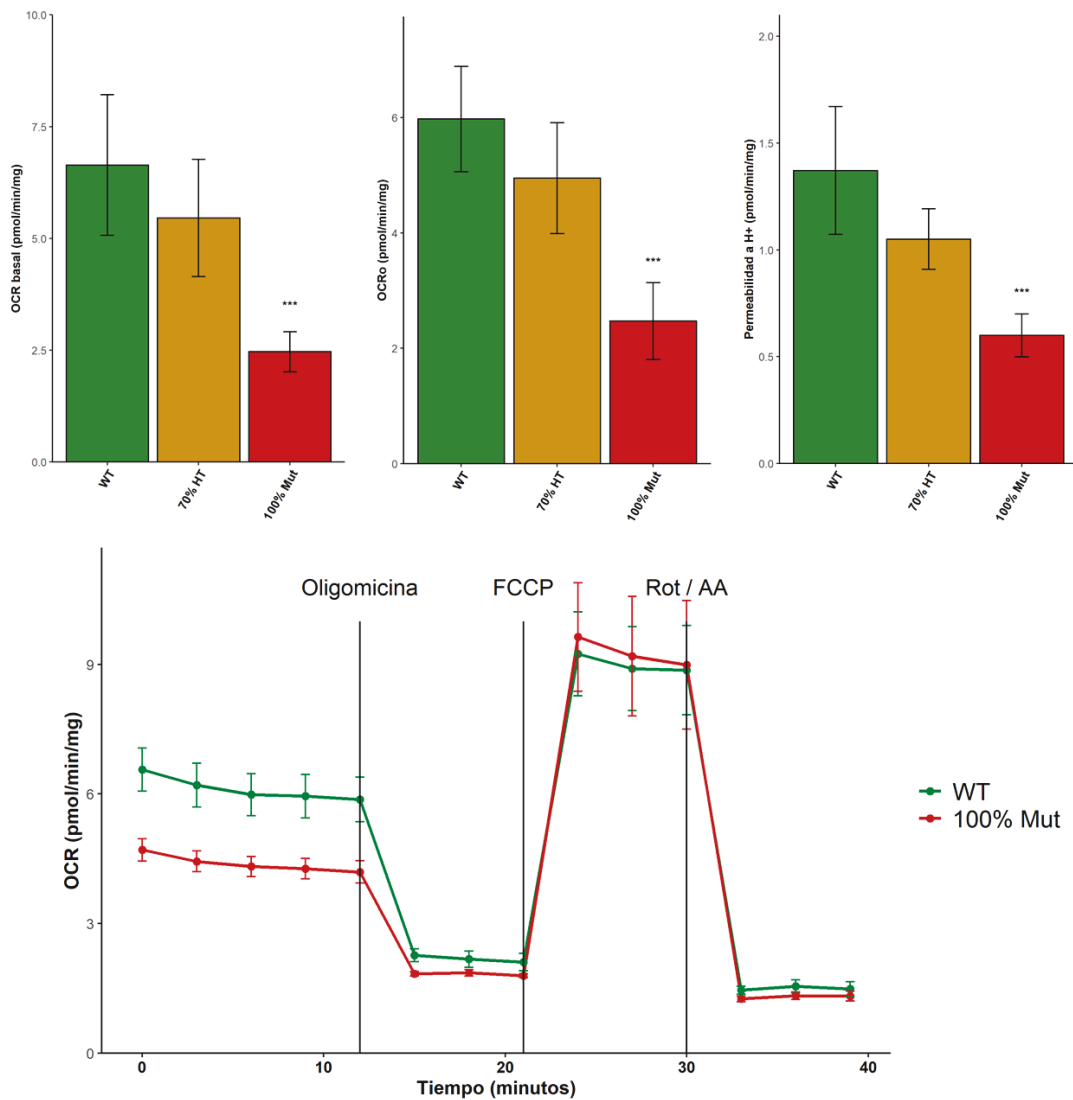
**Figura 19.** Actividades enzimáticas de los complejos OXPHOS (CI-CV) en los clones de la línea de cibridos con la variante *m.8391G>A*. Se muestra el porcentaje de actividad de cada complejo respecto al valor medio de los clones WT. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\* $p < 0.05$  significativamente distinto del WT.

#### d) Estudios Bioenergéticos

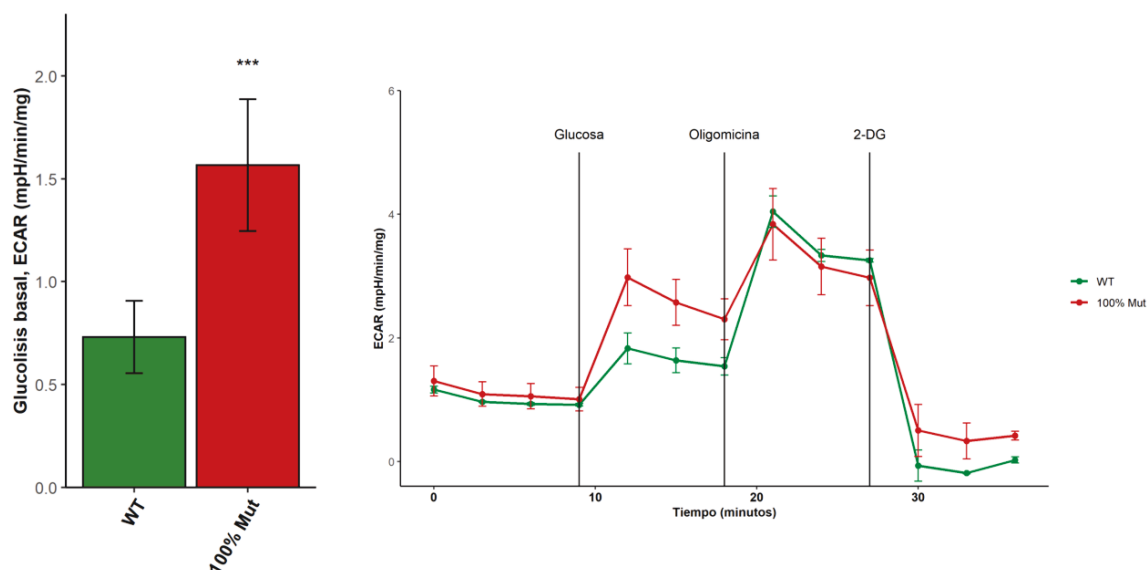
Los estudios bioenergéticos de respirometría mostraron un consumo de oxígeno basal (OCR basal) significativamente disminuido en el clon 100% mutante en comparación con el OCR basal de los clones WT (38% OCR basal respecto a los valores WT). El OCRo (respiración sensible a oligomicina o consumo de oxígeno invertido en la producción de ATP) también estaba disminuido en el clon 100% mutante respecto a los clones WT (42% OCRo del clon 100% mutante respecto a los WT). La permeabilidad a  $H^+$  o fuga de protones también se encontró disminuida en el clon 100% mutante (46% del valor obtenido con los clones WT). No se encontraron diferencias significativas entre los clones WT y los 70% heteroplásmicos en ninguno de los parámetros. No se hallaron diferencias significativas en la respiración máxima y en la respiración no mitocondrial en ninguno de los clones. En la **Figura 20** se representan los resultados (experimentos replicados al menos 3 veces) y un perfil representativo obtenido en uno de los experimentos, que muestra la comparación entre el clon 100% mutante con uno de los clones WT.

En cuanto a los resultados del estudio de función glucolítica, el clon 100% mutante mostró un incremento significativo de su glucolisis basal respecto a los clones WT (215% en el ECAR post-inyección de glucosa respecto a los valores WT). Los clones 70% heteroplásmicos se excluyeron de este experimento debido a que en estos clones no se encontraron diferencias significativas en los estudios de respirometría respecto a los clones WT. No se hallaron diferencias significativas

en la capacidad glucolítica máxima, la reserva glucolítica y en la acidificación no glucolítica en ninguno de los clones. En la **Figura 21** se muestran los valores obtenidos en ambos clones de ECAR post-glucosa (glucolisis basal) y un perfil representativo obtenido en uno de los experimentos.



**Figura 20.** Análisis del consumo de oxígeno por respirometría en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A*. En los gráficos de la parte superior se muestran los valores de OCR basal (izquierda), OCRo (centro) y permeabilidad a H<sup>+</sup> (derecha) obtenidos en los 3 grupos de clones (WT, 70% HT y 100% Mut). En el gráfico de la parte inferior se muestra un ejemplo representativo de uno de los experimentos utilizando un clon WT y el clon 100% mutante. Los datos se muestran como media ± DE, n=3. Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

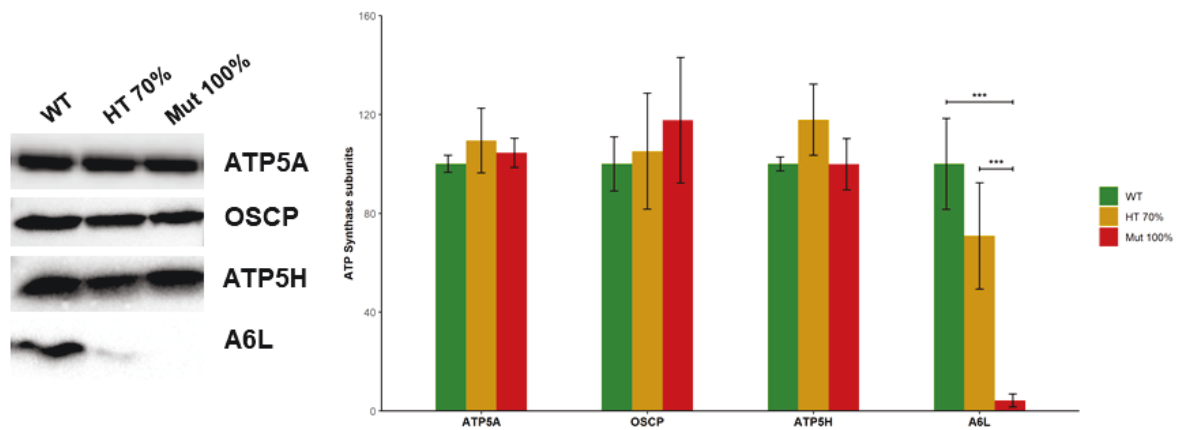


**Figura 21.** Tasa de acidificación extracelular (ECAR) en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A*. El gráfico de la izquierda muestra los valores de ECAR post-inyección de glucosa (glucolisis basal) obtenidos en los clones WT y el 100% mutante (Barras de error = DE,  $n = 3$ ). En el gráfico de la derecha se muestra un experimento representativo utilizando un clon WT y el clon 100% mutante,  $n=3$  (Barras de error = DE). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni,  $***p < 0.05$  significativamente distinto del WT.

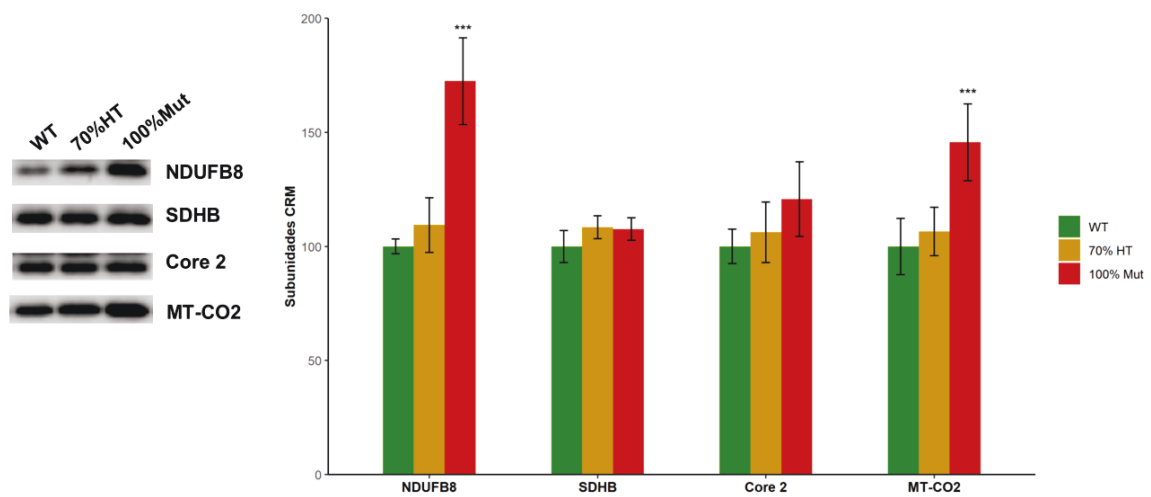
### e) Niveles de proteínas OXPPOS

El estudio de expresión de proteínas mediante SDS-PAGE/Western Blot de varias subunidades de la ATP Sintasa reveló una ausencia casi total de la subunidad A6L (codificada por el gen *MT-ATP8*) en el clon 100% mutante, lo que demuestra un posible fallo en la estabilidad o una degradación del péptido resultante por el efecto truncante sobre la proteína A6L de la variante *nonsense m.8391G>A* (p.Trp9Ter). Los clones 70% heteroplásmicos mostraron una disminución en los niveles de A6L de aproximadamente un 25% respecto a los niveles de los clones WT. Los niveles del resto de proteínas estudiadas pertenecientes a la ATP Sintasa (ATP5A o subunidad  $\alpha$ , ATP5H o subunidad d y OSCP) no mostraron diferencias significativas entre los clones WT, los clones 70% heteroplásmicos y el clon 100% mutante. Los resultados se muestran en la **Figura 22**.

El análisis de expresión de proteínas pertenecientes a los complejos de la CRM (CI-CIV) mostró un aumento significativo de los niveles de las subunidades NDUFB8 (CI) y MT-CO2 (CIV) en el clon 100% mutante respecto a los valores de los clones WT y los 70% heteroplásmicos. No se observaron diferencias en los niveles de las subunidades SDHB (CII) y Core 2 (CIII). Los resultados se muestran en la **Figura 23**.



**Figura 22.** Análisis por SDS-PAGE/WB de subunidades del complejo V. En el gráfico de la derecha se representa las cuantificaciones densitométricas de las señales normalizadas respecto a la subunidad SDHA del CII. Los datos se normalizaron por el promedio del grupo WT. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.



**Figura 23.** Análisis por SDS-PAGE/WB de los niveles de subunidades de diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. La media obtenida con los clones WT se estableció en 100 y todas las medidas se referenciaron a ese valor. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

## f) Estudio de Ensamblaje

### I. Análisis de ensamblaje de la ATP Sintasa

Los experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones diferentes: i) manteniendo una relación digitonina:proteína de 4:1 (condiciones fuertes), o bien ii) una relación digitonina:proteína de 2:1 (condiciones suaves). Cuanto mayor es el ratio digitonina:proteína más desestabilizantes son las condiciones; así por ejemplo, con un ratio 4:1 en clones WT, los multímeros (dímero y tetrámero) de ATP Sintasa no se conservan, visualizándose solo el monómero. Sin embargo, con una ratio 2:1 las condiciones son lo suficientemente lábiles como para poder visualizar los multímeros. Solo se utilizaron los clones WT y el clon 100% mutante para realizar estos experimentos (se excluyeron los clones 70% heteroplásmicos).

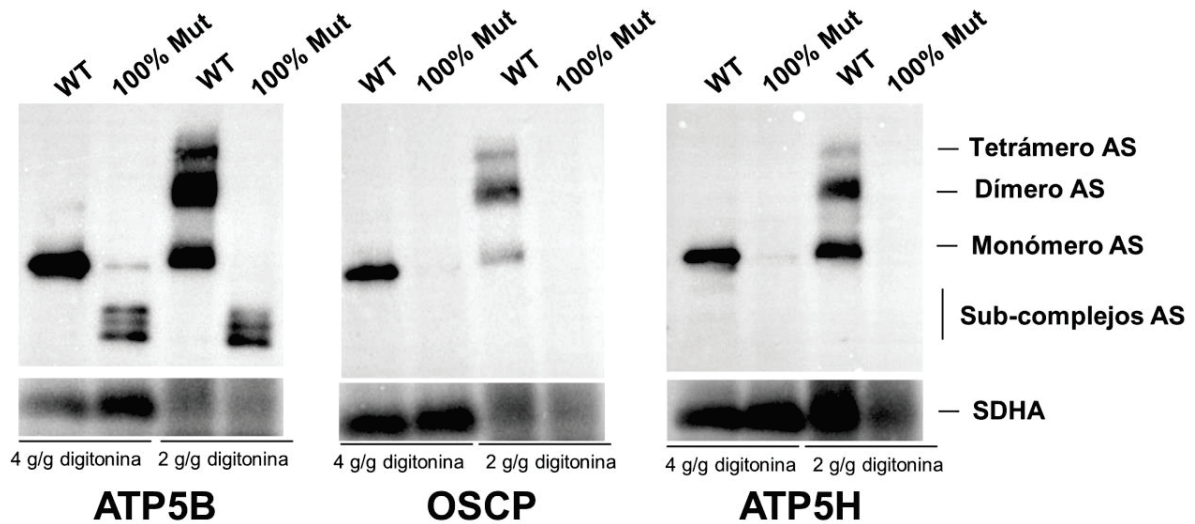
La inmunodetección de la subunidad ATP5B (anti-subunidad  $\beta$  de la ATP Sintasa) mostró la acumulación de tres bandas de subcomplejos en el clon 100% mutante que no estaban presentes en el clon WT, tanto en las condiciones fuertes como en las suaves. Además, en el clon 100% mutante se observó una disminución notable en los niveles del monómero de CV en ambas condiciones, así como de los oligómeros de CV en condiciones suaves.

La inmunodetección de las subunidades OSCP y ATP5H (subunidad d) mostró una ausencia total de subcomplejos en ambas condiciones en el clon 100% mutante. Ambas subunidades se detectaron únicamente co-localizando en las bandas correspondientes al monómero u oligómeros del CV maduro en el clon 100% mutante, pero no se visualizaron en ninguno de los tres subcomplejos en los que sí estaba presente la subunidad ATP5B. Esto indica que estos componentes del tallo periférico (OSCP y subunidad d) no están presentes en los mencionados subcomplejos. Los resultados se muestran en la **Figura 24**.

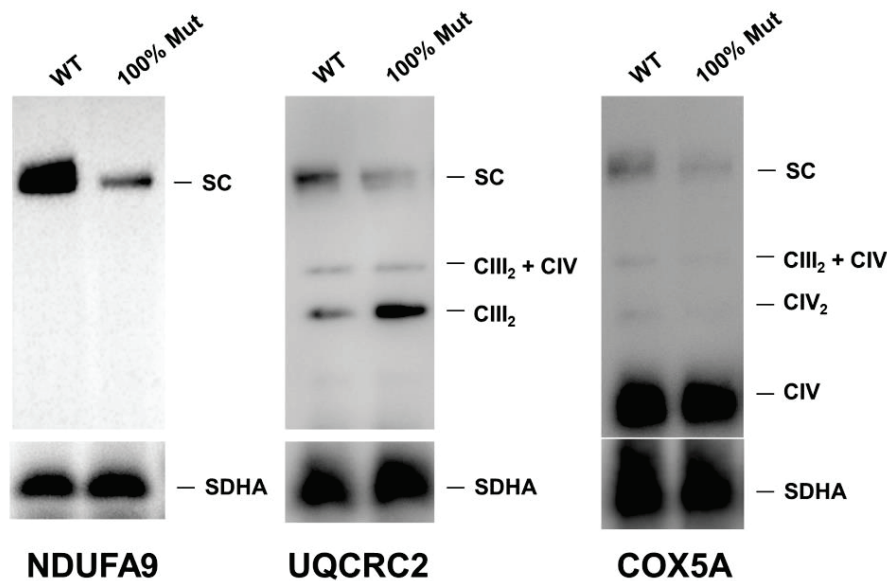
### II. Análisis de ensamblaje de los supercomplejos de la CRM

Para este análisis de los supercomplejos de la CRM se utilizó un ratio digitonina:proteína de 4:1. Se observó una clara disminución en los niveles del respirasoma (SC I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1,2</sub>) en el clon 100% mutante en comparación con el WT, con una acumulación paralela del dímero de CIII (CIII<sub>2</sub>). Los resultados se muestran en la **Figura 25**.





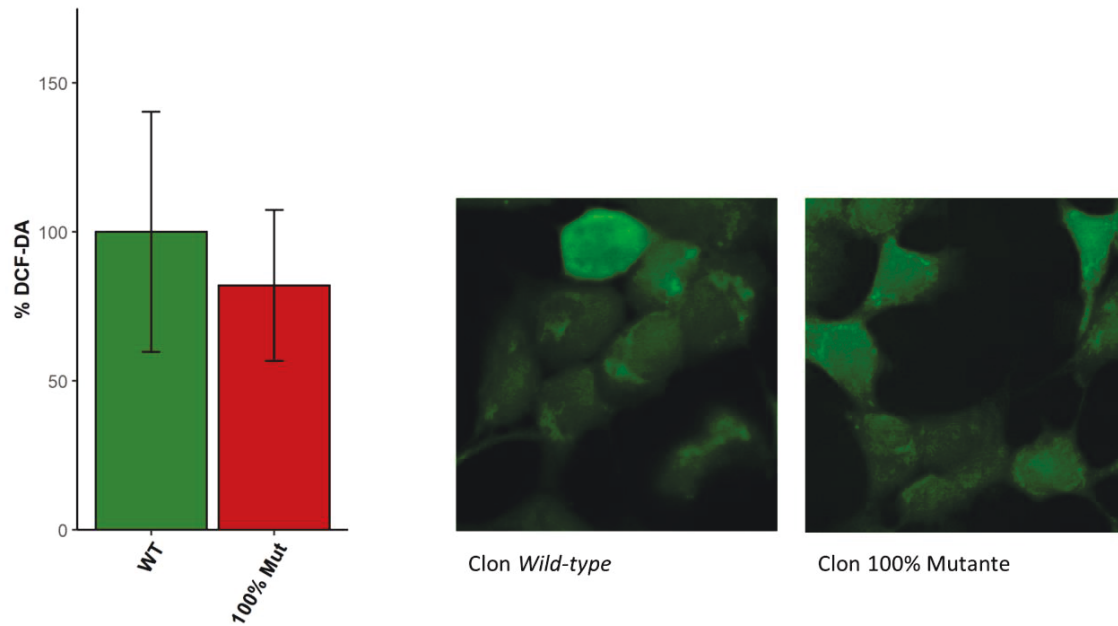
**Figura 24.** Análisis estructural mediante BNE de la ATP Sintasa. Inmunodetección tras separación en primera dimensión en condiciones nativas de las subunidades ATP5B, OSCP y ATP5H de la ATP sintasa. La proteína SDHA (CII) se utilizó como control de carga. AS: ATP sintasa.



**Figura 25.** Análisis estructural mediante BNE de los complejos y supercomplejos de la CRM en la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A*. La proteína SDHA se utilizó como control de carga. SC: respirasoma.

### g) Análisis de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

El análisis de los niveles de ROS en forma de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante microscopía confocal usando la sonda DA-DCF no mostró diferencias significativas entre el clon 100% mutante y los clones WT. Los resultados se muestran en la **Figura 26**.



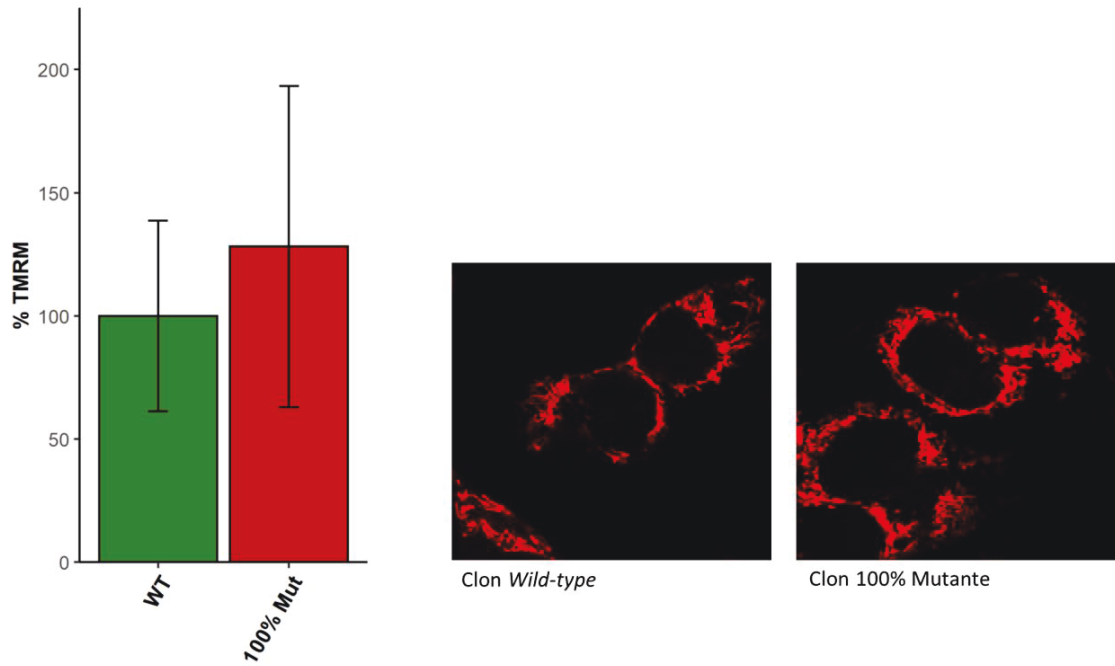
**Figura 26.** Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante microscopía confocal usando la sonda fluorescente DA-DCF en híbridos con la variante *m.8391G>A*. En la gráfica se muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de la sonda DCF-DA por célula registrada a Tª ambiente. Los clones 70% heteroplásmicos se excluyeron de este experimento. Los valores de intensidad media de fluorescencia por célula se normalizaron respecto al valor medio del grupo WT. Imagen representativa de híbridos WT y mutantes marcados con la sonda DCF-DA tomadas con un objetivo 40X. Los datos se muestran como media ± DE de 2 experimentos independientes.

#### **h) Análisis del Potencial de Membrana**

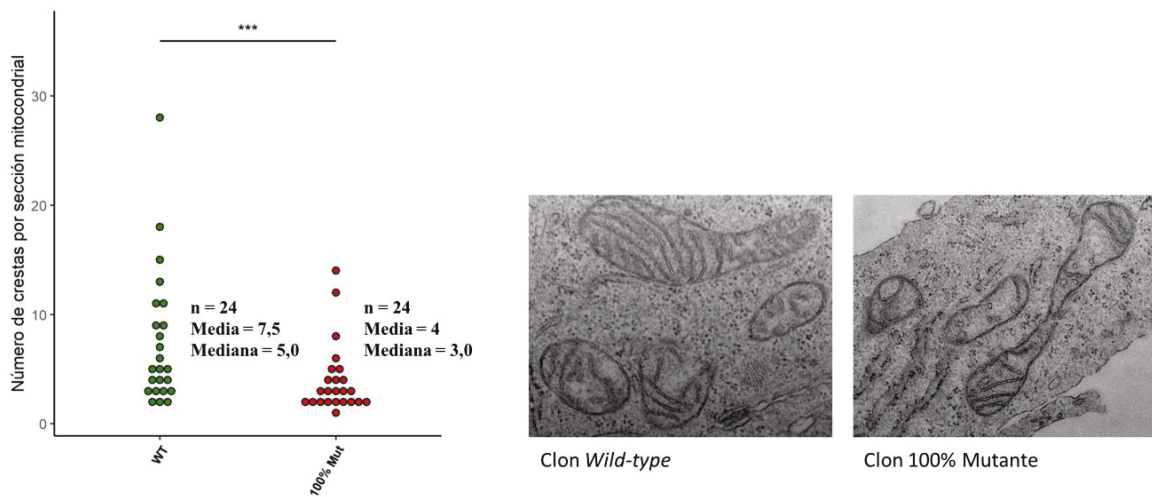
El análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante microscopía confocal usando la sonda TMRM no mostró diferencias significativas entre el clon 100% mutante y los clones WT. Los resultados se muestran en la **Figura 27**.

#### **i) Análisis de la ultraestructura mitocondrial**

El análisis morfológico mitocondrial mediante microscopía electrónica mostró una disminución significativa en el clon 100% mutante en comparación con el clon WT en el número de crestas por sección mitocondrial (se contaron un total de 24 secciones diferentes de cada clon). No se encontraron diferencias significativas entre los clones WT y el clon 100% mutante en ninguna de las medidas de forma y tamaño realizadas: área mitocondrial, perímetro, relación de aspecto (eje mayor/eje menor), circularidad [ $4\pi(\text{área mitocondrial}/\text{perímetro}^2)$ ] y diámetro de Feret (distancia más larga entre dos puntos dentro de una misma mitocondria). Los resultados se muestran en la **Figura 28**.



**Figura 27.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante microscopía confocal usando la sonda fluorescente TMRM en cibridos con la variante *m.8391G>A*. Los clones 70% heteroplásmicos se excluyeron de este experimento. En la gráfica se muestra la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por célula de la sonda TMRM registrada en condiciones de equilibrio a T<sup>a</sup> ambiente. Los valores de intensidad media de fluorescencia por célula se normalizaron respecto al valor medio del grupo WT. En la derecha se ilustran dos imágenes representativas de cibridos WT y mutantes marcados con la sonda TMRM tomadas con un objetivo 63X. Los datos se muestran como media ± DE de 2 experimentos independientes.



**Figura 28.** Análisis de la ultraestructura mitocondrial mediante microscopía electrónica en cibridos con la variante *m.8391G>A*. En la gráfica de la izquierda se muestra el n° de crestas/sección mitocondrial. En la derecha se ilustran dos imágenes representativas de mitocondrias WT y mutantes. Aumento: 12000X.

### 3. Paciente 2: Caracterización genético-molecular

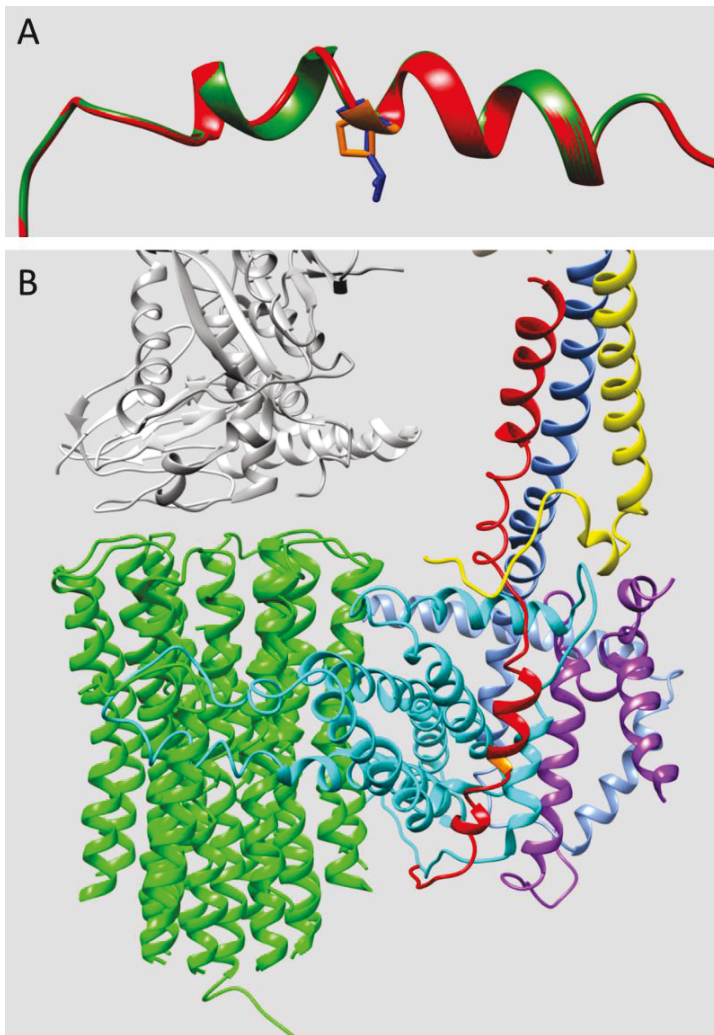
La única variante genética priorizada con potencial patogénico en el análisis de los datos obtenidos por secuenciación NGS del mtDNA completo procedente de células uroepiteliales del paciente 2 fue la transición m.8424T>C (p.Leu20Pro) en el gen *MT-ATP8*, con un porcentaje de heteroplasmia del 94%. El resto de variantes identificadas fueron polimorfismos en homoplasmia que predijeron la pertenencia de la molécula del mtDNA del paciente al haplogrupo mitocondrial T2b. La presencia de esta variante se confirmó en células uroepiteliales del paciente y fue analizada en otros tejidos del paciente y en varios familiares de la rama materna mediante secuenciación Sanger. Los resultados se resumen en la **Tabla 20**. La presencia de la variante con diferentes niveles de heteroplasmia en varios tejidos y su detección en heteroplasmia en otros familiares sintomáticos por vía materna apoyan su posible patogenicidad.

Adicionalmente, la variante m.8424T>C (p.Leu20Pro) se localiza en una  $\alpha$ -hélice del extremo N-terminal de la proteína. La sustitución de un residuo de leucina ubicado en una  $\alpha$ -hélice por una prolina probablemente provoque una desestabilización de la hélice, pues este efecto desestabilizador de la prolina sobre las estructuras  $\alpha$ -hélice es un mecanismo bien conocido<sup>177,178</sup>. Se llevó a cabo un análisis estructural de la mutación p.Leu20Pro mediante el programa de modelado por homología SWISS-MODEL<sup>176</sup> que predijo este efecto desestabilizador. La región afectada por la variante en la subunidad A6L está ubicada en un área cercana a la subunidad a, codificada por el gen *MT-ATP6* (**Figura 29**).

**Tabla 20.** Análisis de la variante m.8424T>C en distintos tejidos del paciente 2 y en sus familiares.

| Paciente                | % Ht (sangre) | % Ht<br>(células uroepiteliales) |
|-------------------------|---------------|----------------------------------|
| <b>P2 (caso índice)</b> | 79            | 85                               |
| <b>Madre P2</b>         | 64*           | NA                               |
| <b>Hermana P2</b>       | 23            | 45                               |
| <b>Hermano P2</b>       | 42            | 57                               |
| <b>Tía materna P2</b>   | NA            | 53                               |
| <b>Sobrina P2</b>       | 22            | 45                               |

La estimación de los porcentajes de heteroplasmia se obtuvo mediante secuenciación Sanger. NA: No analizado. \* Heteroplasmia medida en tejido cerebral *post-mortem*.



*Panel A.* Superposición de la proteína WT (verde) y mutante (rojo) de la subunidad A6L humana, codificada por el gen *MT-ATP8*. La sustitución de la leucina (color azul) por una prolina (color naranja) produce la ruptura de la estructura en  $\alpha$ -hélice.

*Panel B.* Ubicación de la mutación dentro del complejo  $F_0$  de la ATP Sintasa. La subunidad A6L está coloreada en rojo y el aminoácido 20 Prolina en naranja. La región de la proteína afectada por la mutación está próxima a la subunidad a, codificada por el gen *MT-ATP6* (en color azul claro).

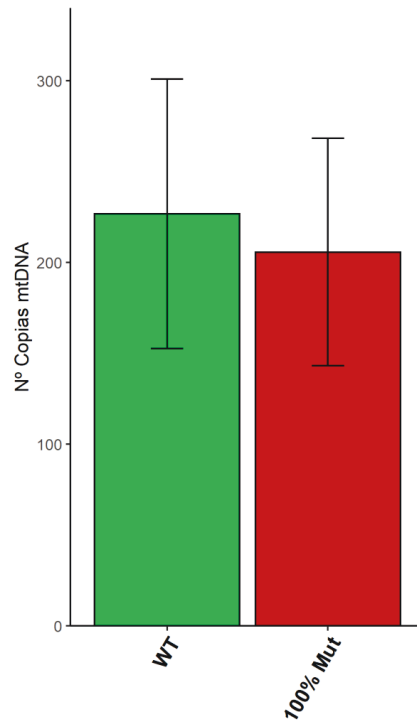
**Figura 29.** Análisis estructural de la mutación p.Leu20Pro.

### 3.1 Paciente 2: Estudio molecular y bioquímico de la variante m.8424T>C en cíbridos transmitocondriales

Se estableció una línea de cíbridos transmitocondriales de la variante m.8424T>C (p.Leu20Pro). Mediante el proceso de selección de clones y estudio de su heteroplasma por secuenciación Sanger se obtuvieron 3 clones WT y 3 clones homoplásmicos para la mutación (100% mutante). Con el objetivo de caracterizar los efectos de la variante a nivel bioquímico y estructural se realizaron los mismos análisis que los realizadas para la línea de cíbridos con la variante m.8391G>A.

**a) Estudio del número de copias de mtDNA**

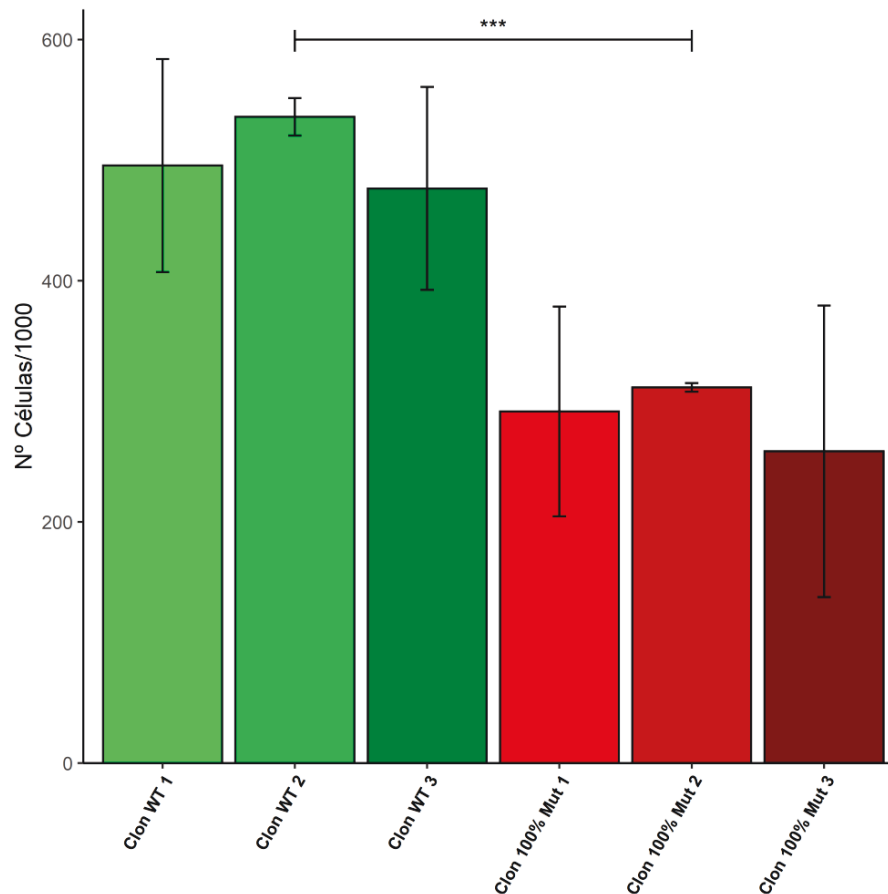
El estudio del número de copias de mtDNA, una vez transcurrido el periodo necesario para su estabilización, no reveló diferencias significativas entre los clones WT y los clones 100% mutantes (**Figura 30**).



**Figura 30.** Número de copias de mtDNA de los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C*. Barras de error = DE (n = 3).

**b) Tasa de proliferación celular**

Los clones 100% mutantes mostraron un crecimiento celular significativamente menor que los clones WT tras 96 horas desde la suplementación de las células con DMEM bajo en glucosa. Se observó un aumento en el número de células de 2000% respecto a las sembradas inicialmente en los clones WT y del 1100% en los clones 100% mutantes (**Figura 31**).

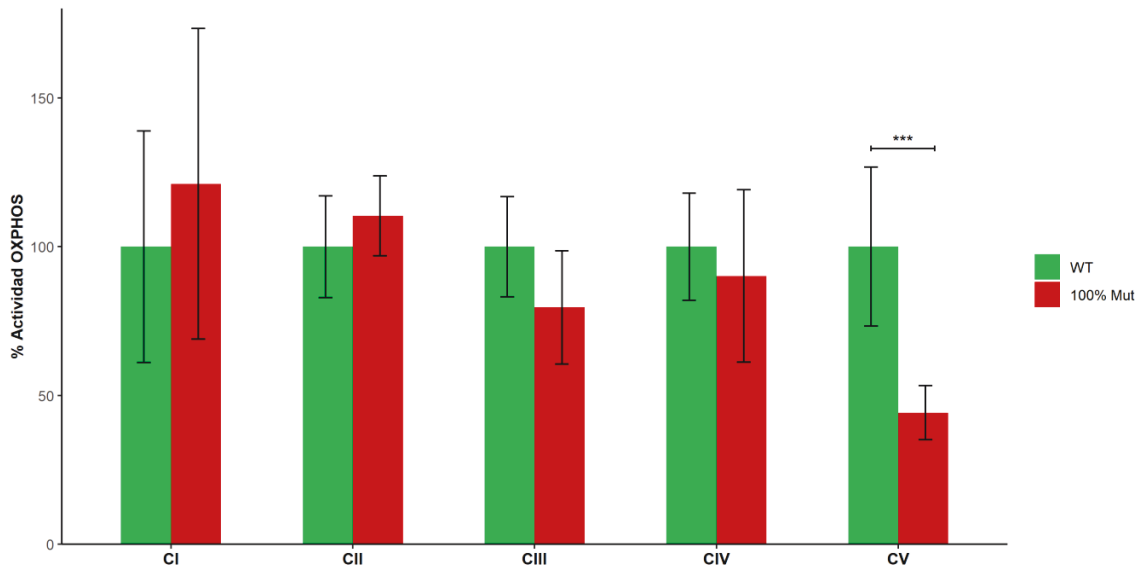


**Figura 31.** Tasa de proliferación celular en los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C*. Barras de error = DE (n = 3 experimentos independientes para cada clon analizado). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

### c) Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa

La medida de la actividad de los complejos de la CRM (CI-CIV) no reveló diferencias significativas en ninguno de los complejos entre los clones WT y los 100% mutantes.

La actividad enzimática de la ATP Sintasa (CV) evaluada como actividad ATPasa mostró una disminución significativa en los clones 100% mutantes respecto a los valores de los clones WT (44%). Los resultados se muestran en la **Figura 32**.



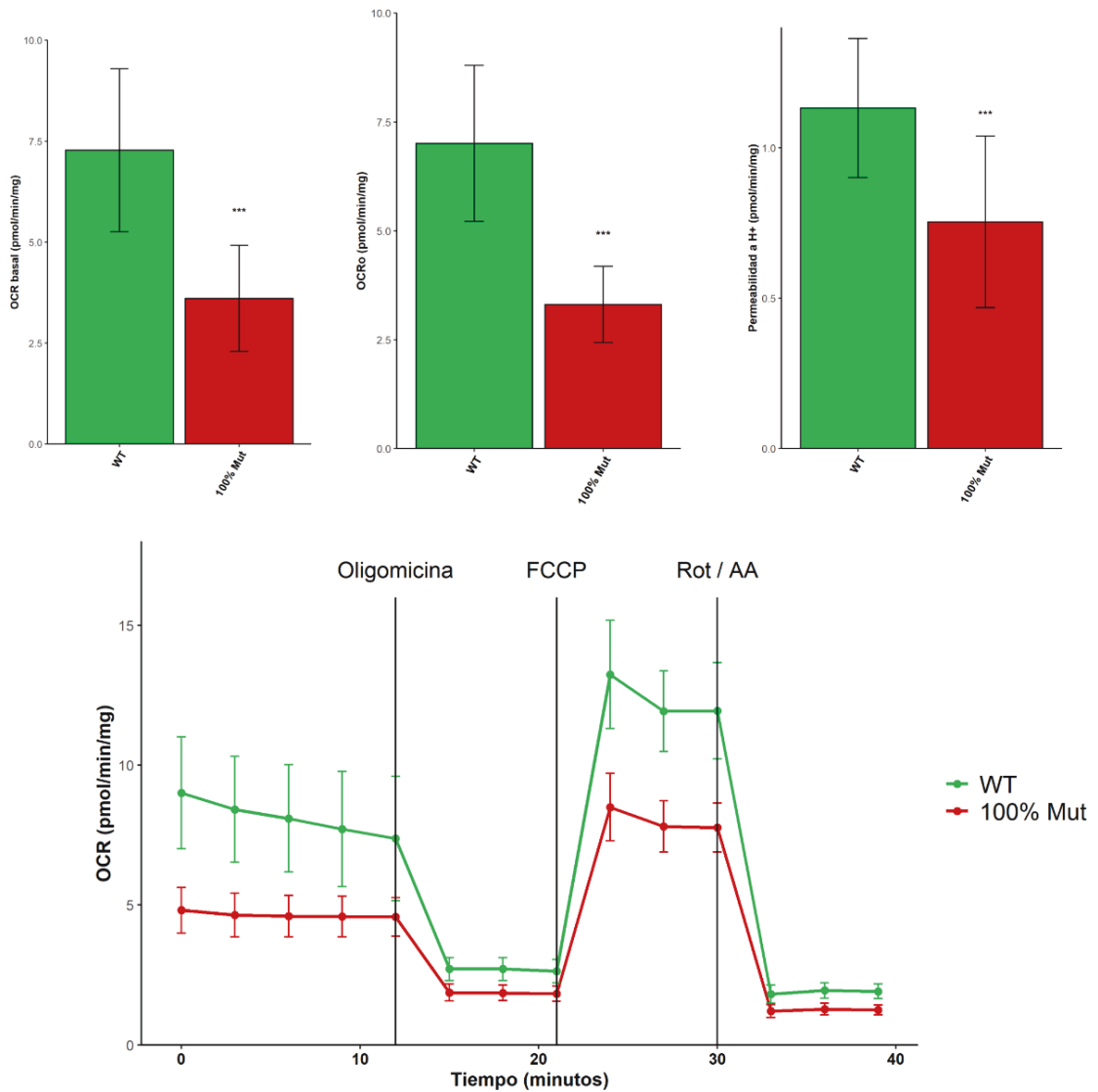
**Figura 32.** Actividad enzimática de los complejos OXPHOS (CI-CV) en los clones de la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C*. Se muestra el porcentaje de actividad de cada complejo respecto al valor medio de los clones WT. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

#### d) Estudios Bioenergéticos

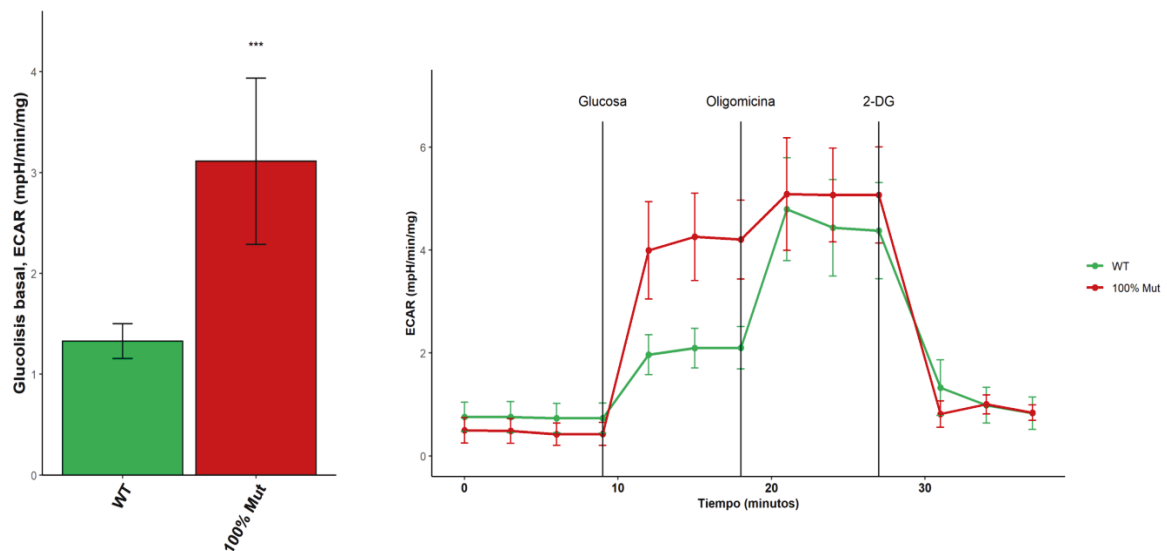
Los estudios bioenergéticos de respirometría revelaron un consumo de oxígeno basal (OCR basal) significativamente menor en los clones 100% mutantes respecto a los clones WT (60% OCR basal). El OCR<sub>o</sub> también estaba disminuido en los clones 100% mutantes respecto a los clones WT (48% OCR<sub>o</sub>). La permeabilidad a H<sup>+</sup> también se encontró disminuida en los clones 100% mutantes (66% del valor obtenido con los clones WT). No se hallaron diferencias significativas en la respiración máxima ni en la respiración no mitocondrial. En la **Figura 33** se representa gráficamente los valores obtenidos en los dos grupos de clones (experimentos replicados al menos 3 veces) y un perfil representativo de uno de los experimentos.

En el estudio de función glucolítica, los clones mutantes mostraron significativamente mayor tasa de glucólisis basal respecto a los clones WT (204% en el ECAR post-inyección de glucosa respecto a los valores WT). En la **Figura 34** se representa gráficamente los valores obtenidos de ECAR post-glucosa (glucólisis basal) en los dos grupos y un perfil representativo obtenido en uno de los experimentos.





**Figura 33.** Consumo de oxígeno por respirometría en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en los clones de cibridos con la variante *m.8424T>C*. En los gráficos de la parte superior se muestran los valores de OCR basal (izquierda), OCRo (centro) y permeabilidad a H<sup>+</sup> (derecha) obtenidos en los 2 grupos de clones (WT y 100% Mut, barras de error = DE, n = 3 experimentos independientes). En la parte inferior se muestra como ejemplo un experimento representativo de un clon WT y un clon 100% mutante, ambos por triplicado (Barras de error = DE). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\**p* < 0.05 significativamente distinto del WT.

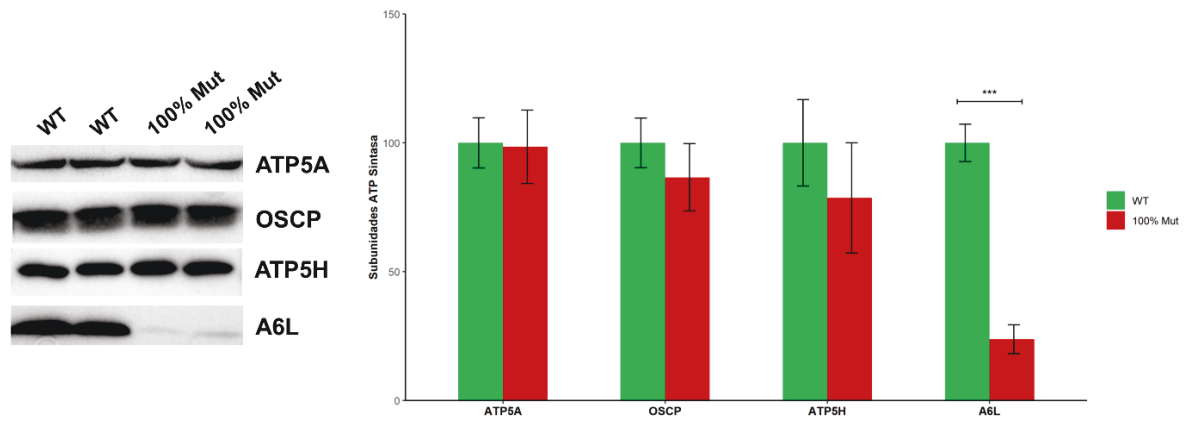


**Figura 34.** Tasa de acidificación extracelular (ECAR) en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en híbridos con la variante *m.8424T>C*. En la parte izquierda se representan los valores de ECAR post-inyección de glucosa (glucolisis basal) obtenidos con los clones WT y los 100% mutantes (Barras de error = DE, n = 3). En la parte derecha se muestra como ejemplo un experimento representativo utilizando un clon WT y un clon 100% mutante, ambos por triplicado. Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\* $p < 0.05$  significativamente distinto del WT.

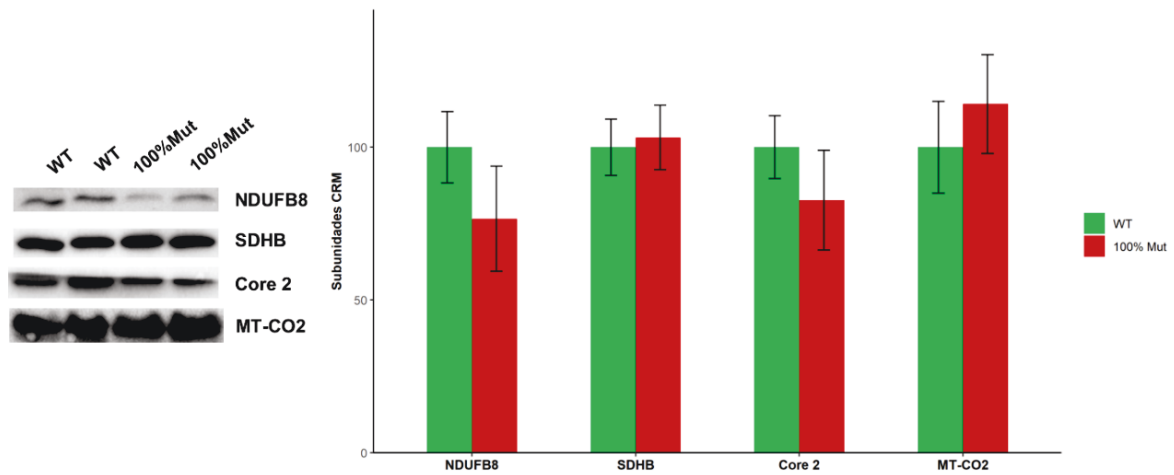
### e) Niveles de proteínas OXPHOS

El estudio de expresión de proteínas mediante SDS-PAGE/Western Blot en las subunidades de la ATP Sintasa ATP5A, ATP5H, OSCP y A6L reveló una notable disminución de la subunidad A6L en los clones 100% mutantes respecto a los clones WT. La expresión del resto de subunidades de la ATP Sintasa no mostró diferencias significativas entre los clones WT y los 100% mutantes. Los resultados se muestran en la **Figura 35**.

Mediante el estudio de expresión de proteínas pertenecientes a los complejos de la CRM (CI-CIV) no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de las subunidades NDUFB8 (CI), SDHB (CII), Core 2 (CIII) y MT-CO2 (CIV) entre los clones WT y los clones 100% mutantes. Los resultados se muestran en la **Figura 36**.



**Figura 35.** Análisis por SDS-PAGE/Western-blot de subunidades del complejo V. Se observa una disminución significativa en los niveles de la subunidad A6L en los clones 100% mutantes. En la parte derecha se representa la cuantificación densitométrica de las señales normalizadas con la subunidad SDHA del CII. La media obtenida con los clones WT se estableció en 100 y todas las medidas se referenciaron a ese valor. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.



**Figura 36.** Análisis por SDS-PAGE/WB de los niveles de subunidades representativas de los complejos de la CRM: NDUFB8 (CI), SDHB (CII), Core 2 (CIII) y MT-CO2 (CIV). La media obtenida con los clones WT se estableció en 100 y todas las medidas se referenciaron a ese valor. Barras de error = DE (n = 3).

## f) Estudio de Ensamblaje

### I. Análisis de ensamblaje de la ATP Sintasa

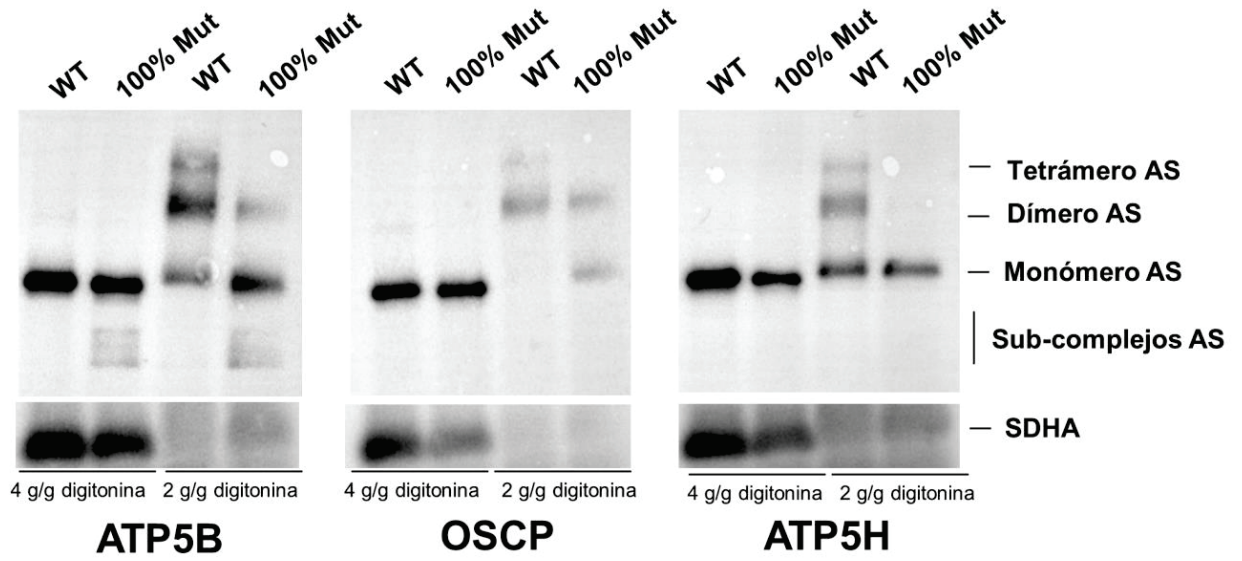
De nuevo, los experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones diferentes de digitonina: con un ratio digitonina:proteína de 4:1 (condiciones fuertes) y con un ratio de 2:1 (condiciones suaves).

En las condiciones fuertes, el clon 100% mutante mostró una pequeña disminución de los niveles del monómero de CV, junto con la acumulación relativa de los tres subcomplejos que contenían a la subunidad subunidad  $\beta$ . Este patrón se asemejaba al observado en el mutante con la variante m.8391G>A, aunque comparativamente la alteración estructural del CV es de menor intensidad en este mutante con la variante m.8424T>C. En las condiciones suaves se apreció una banda correspondiente al dímero de ATP Sintasa en los clones 100% mutantes, aunque de menor intensidad a la banda correspondiente que muestran los clones WT. No se apreció la banda correspondiente al tetrámero en los clones 100% mutantes.

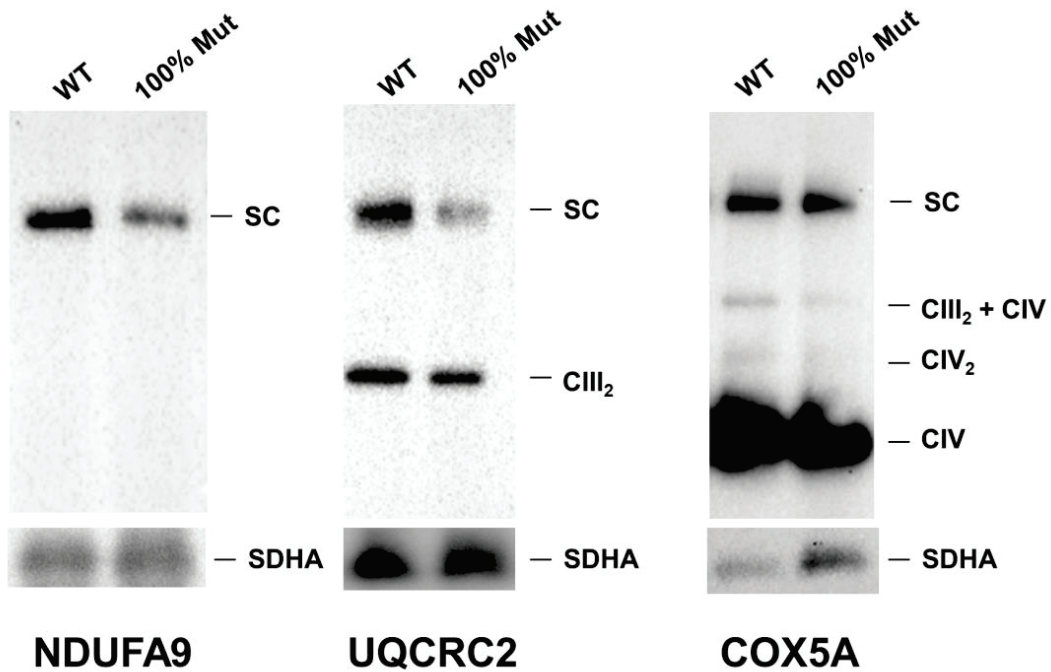
Estas observaciones fueron corroboradas por inmunodetección con los anticuerpos que reconocen las subunidades OSCP y ATP5H (subunidad d) del tallo periférico, que tampoco se visualizaron en ninguno de los tres subcomplejos en los que sí que aparecía la subunidad ATP5B. Los resultados se muestran en la **Figura 37**.

### II. Análisis de ensamblaje de los supercomplejos de la CRM

Para el análisis de los complejos de la CRM se utilizó únicamente un ratio digitonina:proteína de 4:1. Los resultados nuevamente mostraron una disminución en los niveles del respirasoma (SC I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1-2</sub>) en el clon 100% mutante respecto al WT, aunque en este caso no fue tan marcada como se apreció en la línea de cíbridos con la variante m.8391G>A, ni llevaba aparejado un incremento de los niveles del CIII<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en la **Figura 38**.



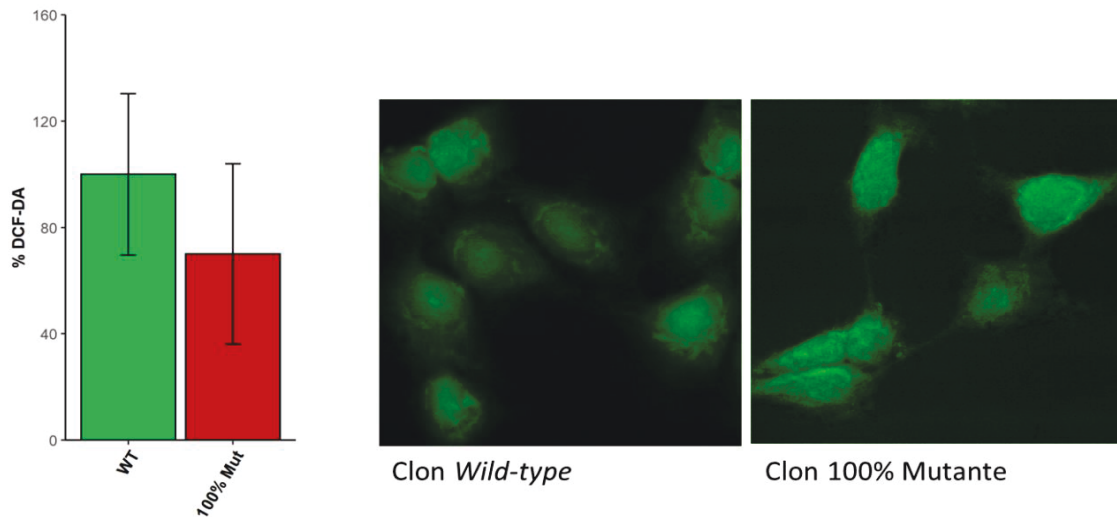
**Figura 37.** Análisis estructural mediante BNE de la ATP Sintasa. La proteína SDHA (CII) se utilizó como control de carga. AS: ATP sintasa.



**Figura 38.** Análisis estructural mediante BNE de los complejos de la CRM en la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C* (*p.Leu20Pro*). La proteína SDHA (CII) se utilizó como control de carga. SC: respirasoma.

**g) Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

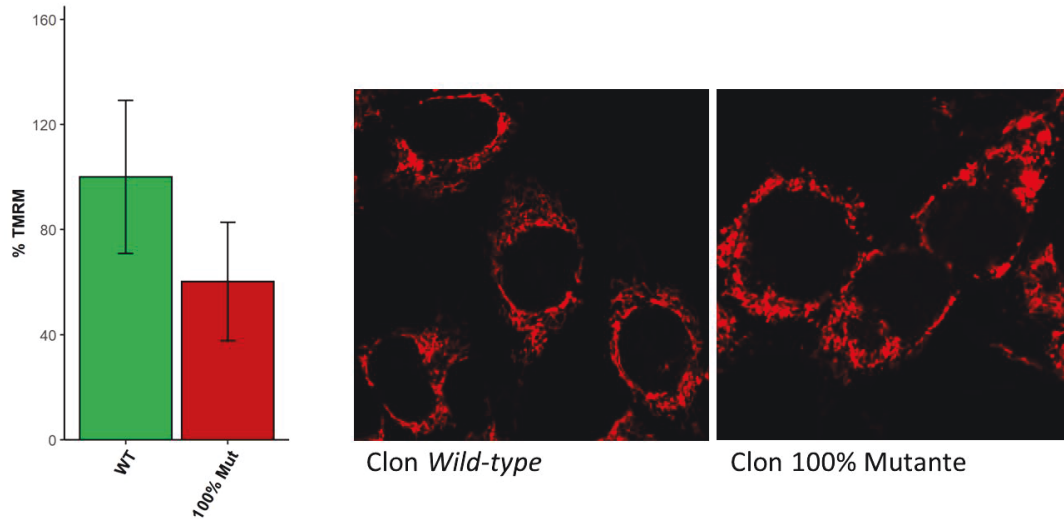
El análisis de los niveles de ROS (principalmente  $H_2O_2$ ) mediante microscopia confocal no mostró diferencias significativas entre los clones 100% mutantes y los clones WT. Los resultados se muestran en la **Figura 39**.



**Figura 39.** Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C* (*p.Leu20Pro*). Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los clones WT y los 100% mutantes.

**h) Análisis del Potencial de Membrana**

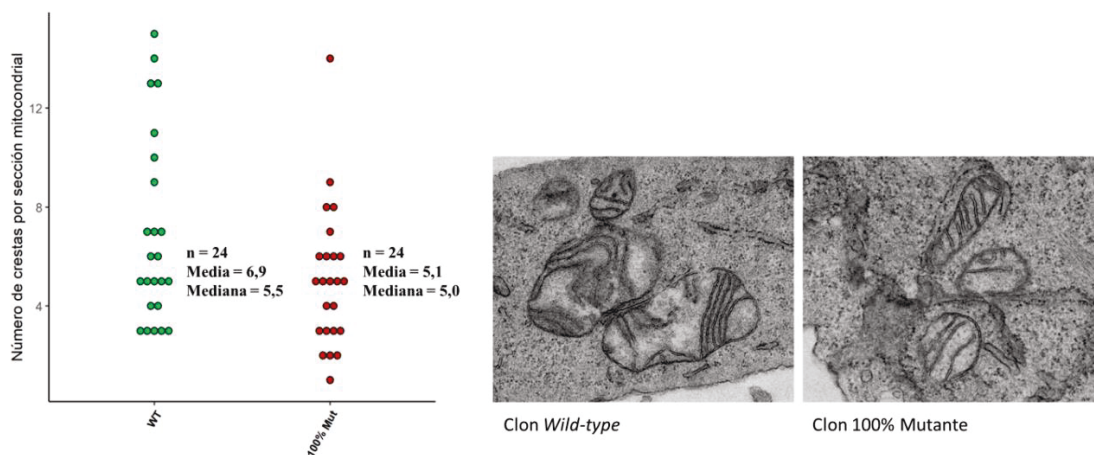
El análisis del potencial de membrana mediante microscopia confocal no reveló diferencias significativas entre los clones 100% mutantes y los clones WT. Los resultados se muestran en la **Figura 40**.



**Figura 40.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial en la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C*. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los clones WT y los 100% mutantes.

### i) Análisis morfológico mitocondrial

El análisis morfológico mitocondrial mediante microscopía electrónica no reveló diferencias significativas entre los clones WT y los 100% mutantes en ninguna de las medidas de forma y tamaño realizadas (los parámetros analizados fueron los mismos que para la línea de híbridos con la variante *m.8391G>A*). El número de crestas por sección mitocondrial tampoco reveló diferencias entre los clones 100% mutantes en comparación con los WT (a diferencia de la disminución observada en la línea *m.8391G>A*). El resultado del conteo de crestas mitocondriales se muestra en la **Figura 41**:



**Figura 41.** Análisis morfológico mitocondrial mediante microscopía electrónica en la línea de híbridos con la variante *m.8424T>C*. En la gráfica de la izquierda se muestra el nº de crestas/sección mitocondrial. En la derecha se ilustran dos imágenes representativas de mitocondrias WT y mutantes. Aumento: 12000X. Se han omitido el resto de parámetros morfológicos, los cuáles no mostraron diferencias significativas.

#### 4. Paciente 3: Caracterización genético-molecular

Se priorizaron dos variantes, ambas localizadas en el gen *MT-ATP6*, con potencial patogénico en el análisis de los datos obtenidos por secuenciación NGS del mtDNA completo procedente de tejido muscular del paciente 3. Una de ellas fue la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro) que se encontró en homoplasmia, y la otra fue la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys) presente con un porcentaje de heteroplasmia del 92%. El resto de variantes identificadas fueron polimorfismos en homoplasmia con los cuales se atribuyó el haplogrupo mitocondrial H3.

La variante m.9176T>C ha sido publicada como patogénica<sup>179,180</sup> y presenta una frecuencia <0.01% en las 51.836 secuencias de mtDNA completo depositadas en GenBank recopiladas en la base de datos Mitomap. La variante m.8959G>A presenta una frecuencia similar a la m.9176T>C en Mitomap (<0.01%) y únicamente se ha descrito en una cohorte de pacientes con diferentes mutaciones en el gen *MT-ATP6* asociadas a un patrón de acilcarnitinas alterado<sup>181</sup>, en la que no se documentan características clínicas presentes en el paciente con la variante m.8959G>A. Dado que las frecuencias de ambas variantes eran similares en Mitomap y que las dos variantes habían sido identificadas en nuestro paciente, se revisó la secuencia completa de los genomas mtDNA de la base de datos GenBank<sup>139</sup> en los que aparecen estas variantes para determinar si también aparecen ligadas en un mismo individuo. Se comprobó que todos los individuos que presentaban la variante m.9176T>C (GeneBank IDs: GU065327.1, JQ797865.1 y JQ797865.1) eran distintos a aquellos que portaban la variante m.8959G>A (GeneBank IDs: KJ154760.1, KT213743.1, KY595611.1 y MF588852.1).

La presencia de ambas variantes se confirmó en el paciente y fueron analizadas en otros tejidos del paciente y en varios familiares de la rama materna mediante secuenciación Sanger. La variante m.9176T>C se encontró en homoplasmia (100% mutante) en todos los tejidos analizados del paciente y sus familiares. Los resultados para la variante m.8959G>A se resumen en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Heteroplasmia de la variante m.8959G>A en distintos tejidos del paciente 3 y en sus familiares.

| Paciente                | % Ht<br>(músculo) | % Ht<br>(células uroepiteliales) | % Ht (sangre) |
|-------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------|
| <b>P3 (caso índice)</b> | 90                | 96                               | 89            |
| <b>Madre P3</b>         | NA                | 35                               | 34            |
| <b>Hermano P3</b>       | NA                | NA                               | 93            |
| <b>Abuela P3</b>        | NA                | NA                               | 0             |
| <b>Tía materna P3</b>   | NA                | 0                                | 0             |
| <b>Primo materno P3</b> | NA                | NA                               | 0             |



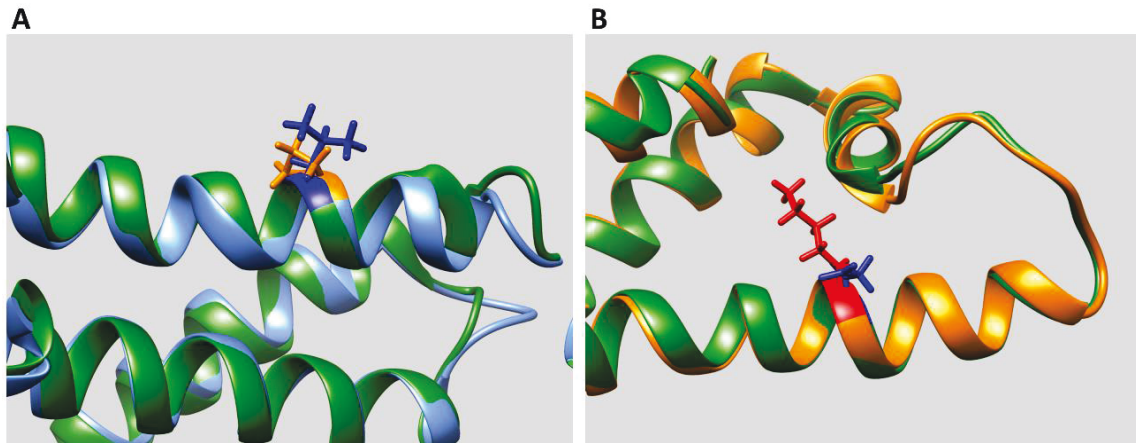
Se indican valores medios de heteroplasmia obtenidos mediante secuenciación Sanger y PCR-RFLP-electroforesis microfluídica. NA: No analizado, Ht: heteroplasmia.

En resumen, los datos fenotípicos y genéticos en esta familia son:

- a) Presencia de la variante m.9176T>C, que ha sido descrita en la literatura como patogénica, en homoplasmia en todos los miembros de la familia, tanto sintomáticos como asintomáticos.
- b) Presencia de la variante m.8959G>A con niveles elevados de heteroplasmia en distintos tejidos del caso índice (paciente 3) y en su hermano, también sintomático.
- c) Presencia de la variante m.8959G>A con un bajo nivel de heteroplasmia en células sanguíneas y epiteliales de orina de la madre asintomática (**Figura 9**).

El conjunto de datos clínicos y genéticos sugieren que en esta familia la variante m.9176T>C por sí sola no tiene la suficiente capacidad patogénica para causar síntomas y que solo cuando está acompañada de la variante m.8959G>A con altos niveles de heteroplasmia conducen a la aparición de un fenotipo clínico.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis estructural de estas dos variantes usando el software de modelado por homología SWISS-MODEL<sup>176</sup> que reveló en el caso de la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro) un efecto en la desestabilización de la  $\alpha$ -hélice del extremo C-terminal de la proteína (**Figura 42**, Panel A), apoyando el previamente mencionado efecto desestabilizador en las  $\alpha$ -hélices que posee la prolina<sup>177,178</sup>. En el caso de la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys), también ubicada en una  $\alpha$ -hélice, no se predice un efecto desestabilizador tan marcado sobre la hélice en comparación con el efecto de la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro). Sin embargo, se aprecia como el mayor tamaño del residuo mutante (Lys) en comparación con el WT (Glu) podría interferir con regiones cercanas y afectar su funcionalidad (**Figura 42**, Panel B).



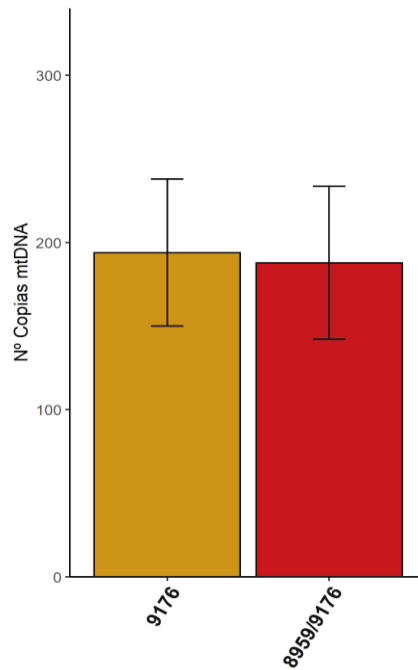
**Figura 42.** Predicción estructural del efecto de las variantes *m.9176T>C* y *m.8959G>A* en la subunidad  $\alpha$  de la ATP Sintasa, **Panel A:** Efecto de la variante *m.9176T>C* (p.Leu217Pro). Se observa como la prolina (naranja) desestabiliza la  $\alpha$ -hélice de la proteína mutante (en azul celeste). **Panel B:** Efecto de la variante *m.8959G>A* (p.Glu145Lys). La lisina en la posición 145 (rojo) no parece afectar la  $\alpha$ -hélice donde se ubica, pero el mayor tamaño del residuo podría afectar a regiones cercanas. Proteína WT: aminoácido en color azul oscuro, cadena en color verde.

#### 4.1 Paciente 3: Estudio molecular y bioquímico de las variantes *m.9176T>C* y *m.8959G>A* en cíbridos trasnmitocondriales

Con el objetivo de caracterizar los efectos de ambas variantes a nivel bioquímico y estructural se estableció una línea de cíbridos trasnmitocondriales con las variantes *m.9176T>C* y *m.8959G>A*: mediante el proceso de selección de clones y estudio de su heteroplasmia por secuenciación Sanger y PCR-RFLP se obtuvieron: i) dos clones homoplásmicos que portaban únicamente la variante *m.9176T>C* y que fueron WT para la variante *m.8959G>A* (“clones 9176”) y ii) dos clones homoplásmicos para las dos variantes (“clones 8959/9176”). Como control WT se utilizó una línea de cíbridos comercial pertenecientes al haplogrupo mitocondrial H, el mismo que presentó el paciente 3. Los resultados obtenidos con esta línea de cíbridos se detallan a continuación:

##### a) Estudio del número de copias de mtDNA

El estudio del número de copias de mtDNA, una vez transcurrido el periodo necesario para su estabilización, no reveló diferencias significativas entre los clones 9176 y los clones 8959/9176 (**Figura 43**):



**Figura 43.** Representación gráfica del número de copias de mtDNA de los clones de la línea de híbridos con las variantes *m.9176T>C* y *m.8959G>A*. Barras de error = DE (n = 3).

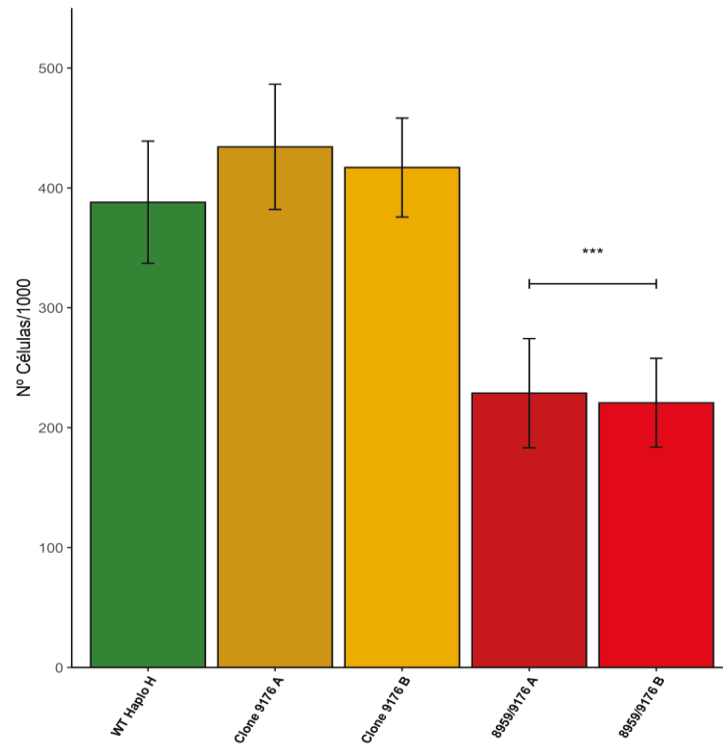
#### **b) Tasa de proliferación celular**

Los clones dobles mutantes 8959/9176 mostraron menor crecimiento en comparación con los clones 9176 y el control WT de haplogrupo mitocondrial H tras 96 horas de cultivo de las células con DMEM bajo en glucosa. En los clones 8959/9176 se observó un aumento en el número de células de  $\approx 900\%$  respecto a las sembradas inicialmente mientras que en los clones 9176 este aumento fue del 1700% y en el control WT del 1500% (**Figura 44**).

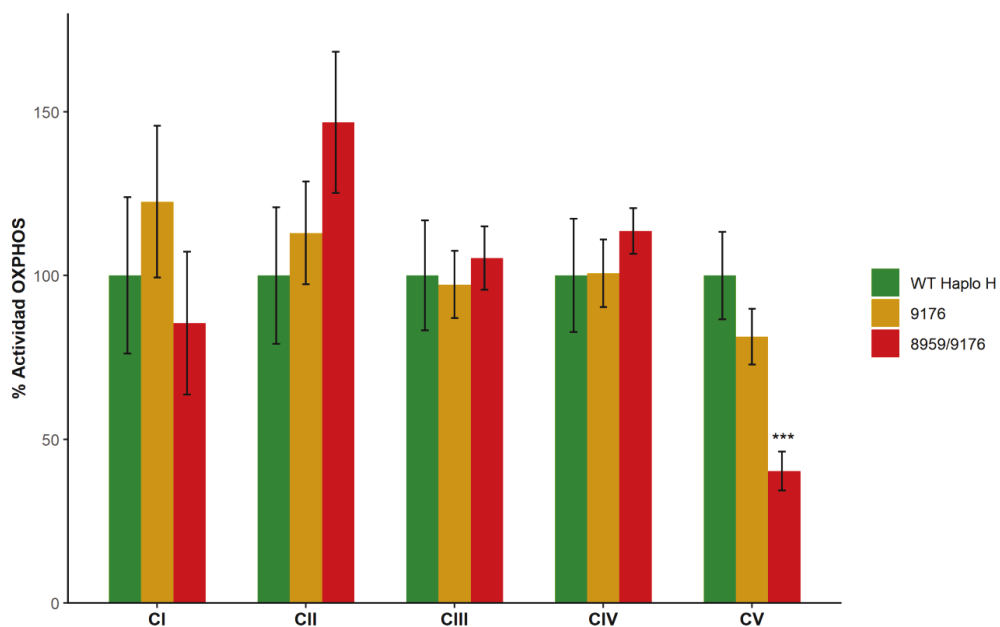
#### **c) Actividad enzimática de los complejos de la CRM y de la ATP Sintasa**

La actividad enzimática de los complejos de la CRM (CI-CIV) no reveló diferencias significativas en ninguno de los complejos entre los clones control WT y los clones 9176 ni entre los clones control y los 8959/9176.

La medida de la actividad de la ATP Sintasa (CV) determinada como actividad ATPasa mostró un descenso significativo en la actividad de los clones 8959/9176 en comparación con los clones WT (40% de actividad respecto al valor de los clones WT), mientras que los clones 9176 no revelaron diferencias significativas en la actividad de la ATP Sintasa respecto a los controles (**Figura 45**).



**Figura 44.** Tasa de proliferación celular en los clones de la línea de híbridos con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*, y del clon control de haplogrupo *H*. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\* $p < 0.05$  significativamente distinto del WT.



**Figura 45.** Actividades enzimáticas de los complejos OXPHOS (CI-CV) en los clones de la línea de híbridos con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*, y del clon control de haplogrupo *H*. Se muestra el porcentaje de actividad de cada complejo respecto al valor medio de los clones control. Barras de error = DE (n = 3). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\* $p < 0.05$  significativamente distinto del WT.

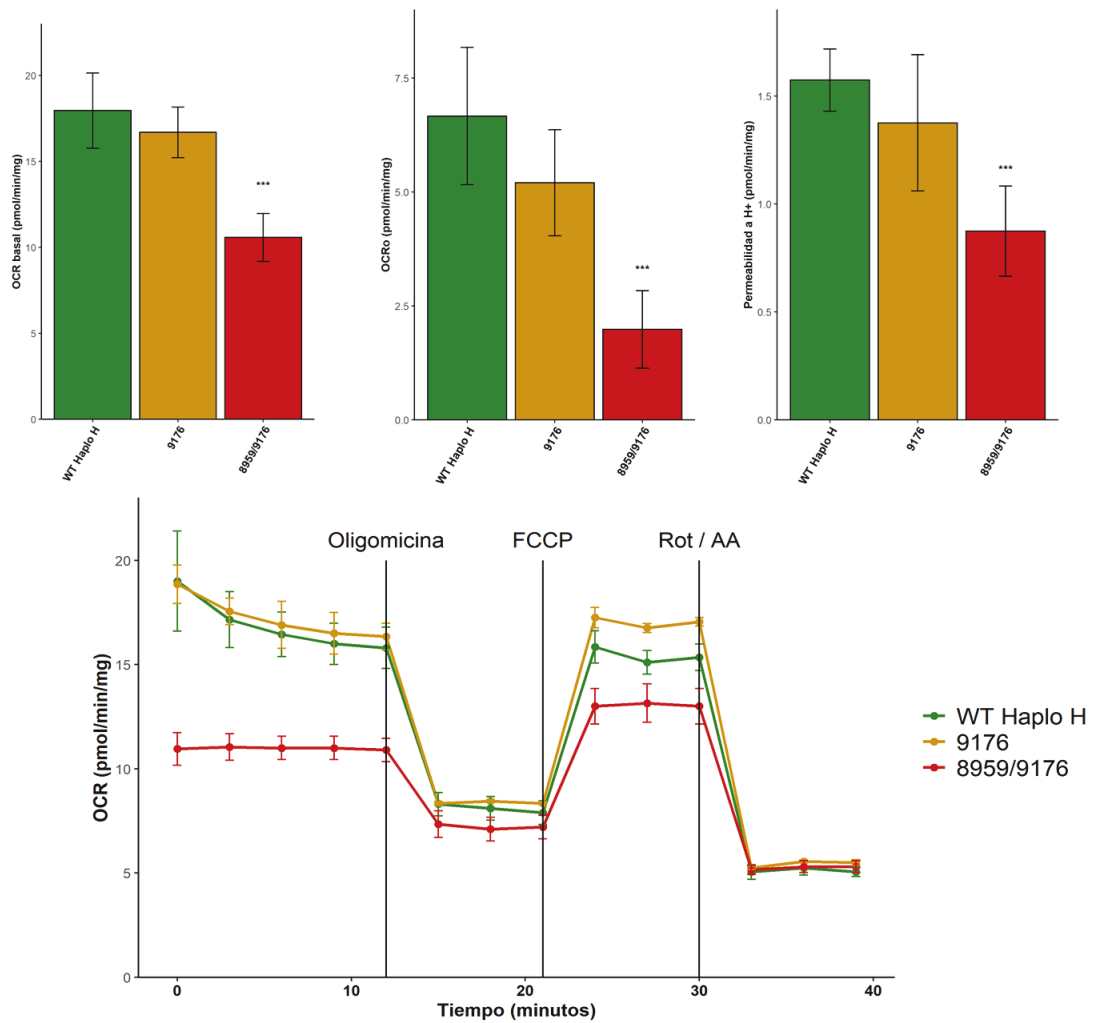
**d) Estudios Bioenergéticos**

Los estudios bioenergéticos de respirometría revelaron un consumo de oxígeno basal (OCR basal) significativamente disminuido en los clones 8959/9176 en comparación con el OCR basal de los clones control y los clones 9176 (56% OCR basal de los clones 8959/9176 respecto a los valores de los clones control y 60% OCR basal respecto a los clones 9176). El OCRo también estaba disminuido en los clones 8959/9176 respecto a los clones control y los 9176 (30% OCRo de los clones 8959/9176 respecto a los valores de los clones control y 38% OCRo respecto a los clones 9176). La permeabilidad a H<sup>+</sup> también se encontró disminuida en los clones 8959/9176 (56% del valor obtenido con los clones control y 64% del valor obtenido con los clones 9176). No se encontraron diferencias significativas entre los clones control y los 9176 en ninguno de los parámetros. No se hallaron diferencias significativas en la respiración máxima y en la respiración no mitocondrial en ninguno de los clones. En la **Figura 46** se representan los resultados (experimentos replicados al menos 3 veces) y un perfil representativo obtenido en uno de los experimentos.

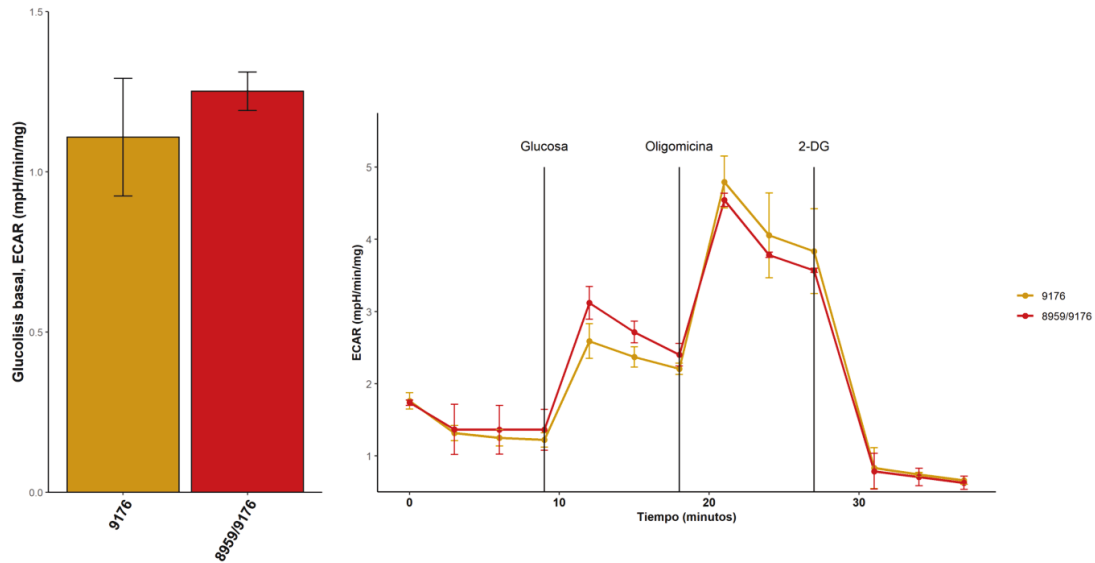
En el estudio de la función glucolítica no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los clones 9176 y los 8959/9176 (los clones control se excluyeron en estos experimentos) en ninguna de las variables determinadas: glucolisis basal, capacidad glucolítica máxima, reserva glucolítica y acidificación no glucolítica. Solo se apreció una ligera tendencia a una mayor glucolisis basal por parte de los clones 8959/9176. En la **Figura 47** se representa gráficamente los valores obtenidos de ECAR post-glucosa (glucolisis basal) en los dos grupos y el perfil típico obtenido en uno de los experimentos.

**e) Niveles de proteínas OXPHOS**

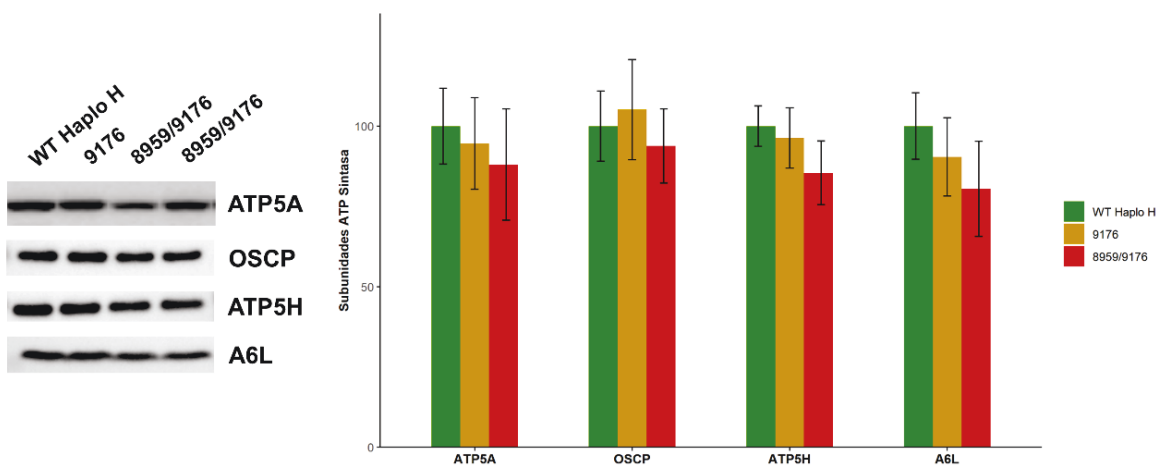
El estudio de expresión de proteínas mediante SDS-PAGE/Western Blot de las subunidades de la ATP Sintasa, ATP5A, ATP5H, OSCP y A6L no mostró diferencias significativas entre los clones control WT, los 9176 y los 8959/9176. Los resultados se muestran en la **Figura 48**.



**Figura 46.** Consumo de oxígeno por respirometría en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en los clones de la línea de cíbridos con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*. En la parte superior se representan los valores de OCR basal (izquierda), OCRo (centro) y permeabilidad a H<sup>+</sup> (derecha) obtenidos en los tres grupos de clones (control haplogrupo H, 9176 y 8959/9176, Barras de error = DE, n = 3). En la parte inferior se muestra como ejemplo un experimento típico utilizando dos clones control, dos clones 9176 y dos clones 8959/9176 (Barras de error = DE). Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\*p < 0.05 significativamente distinto del WT.

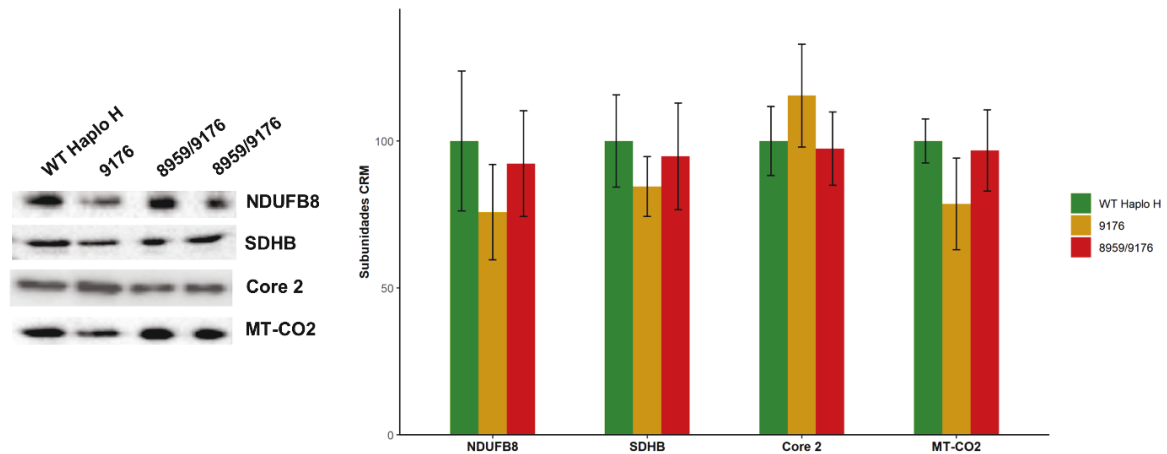


**Figura 47.** Tasa de acidificación extracelular (ECAR) en el analizador Seahorse XFp (Agilent Technologies) en la línea de cibrados con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*. En la parte izquierda se representa un gráfico de barras con los valores de ECAR post-inyección de glucosa (glucolisis basal) obtenidos con los clones 9176 y los 8959/9176 (Barras de error = DE, n = 3). En la parte derecha se muestra como ejemplo un experimento típico utilizando un clon 9176 y un clon 8959/9176, ambos por triplicado. Test principal Kruskal Wallis. Test *post hoc*: Bonferroni, \*\*\**p* < 0.05 significativamente distinto del WT.



**Figura 48.** Análisis por SDS-PAGE/WB de subunidades de complejo V. En la parte derecha se representa la cuantificación densitométrica de las señales normalizadas con la subunidad SDHA del CII. La media obtenida con los clones control se estableció en 100 y todas las medidas se referenciaron a ese valor. Barras de error = DE (n = 2).

Mediante el estudio de expresión de proteínas pertenecientes a los complejos de la CRM (CI-CIV) no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de las subunidades NDUFB8 (CI), SDHB (CII), Core 2 (CIII) y MT-CO2 (CIV) entre los clones control WT, los clones 9176, y los 8959/9176. Los resultados se muestran en la **Figura 49**:



**Figura 49.** Análisis por SDS-PAGE/WB de los niveles de algunas subunidades de los complejos de la CRM. No se observan diferencias significativas en la expresión de las subunidades NDUFB8 (CI), SDHB (CII), Core 2 (CIII) y MT-CO2 (CIV). La media obtenida con los clones control WT de haplogrupo H se estableció en 100 y todas las medidas se referenciaron a ese valor. Barras de error = DE (n = 2).

## f) Estudio de ensamblaje.

### I. Análisis de ensamblaje de la ATP Sintasa

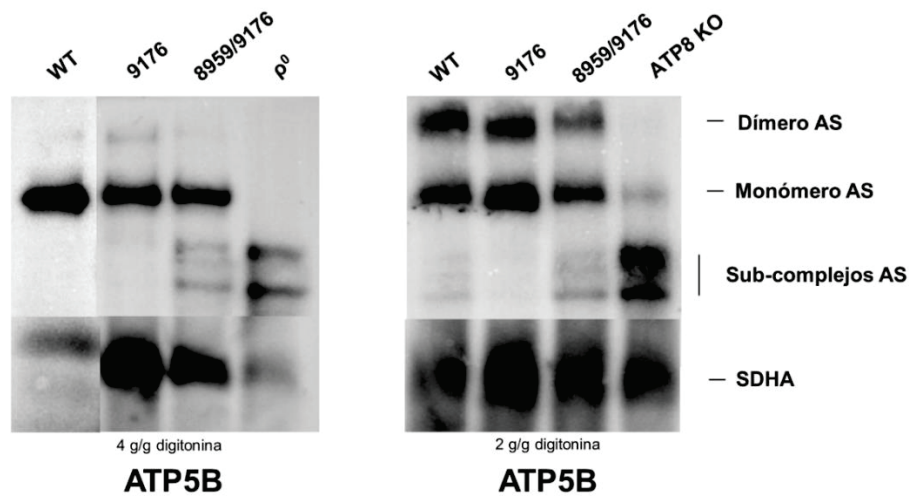
Los experimentos se llevaron a cabo en las dos condiciones de digitonina utilizadas previamente, sin embargo, en esta ocasión, para el análisis estructural de la ATP Sintasa solo se utilizó el anticuerpo dirigido contra la subunidad ATP5B. En las condiciones fuertes, únicamente el clon doble mutante mostró la acumulación de las tres bandas de subcomplejos. Ni el clon WT ni el portador de la mutación m.9176T>C mostraron dicha acumulación de subcomplejos. Además, se usó un clon  $\rho^0$  como control positivo en este experimento, en el que se apreció claramente la presencia de los 3 subcomplejos, pero no del monómero del CV. En las condiciones suaves se observó un resultado similar, siendo el clon doble mutante el único en el que se apreció claramente la presencia de los 3 subcomplejos. En esta ocasión se usó el mutante homoplásmico con la variante m.8391G>A (ATP8 KO) como control positivo. Respecto al análisis de los oligómeros, el clon doble mutante mostró una leve disminución en los niveles del dímero de CV en comparación con el control WT y con el mutante homoplásmico m.9176T>C, que no mostraron



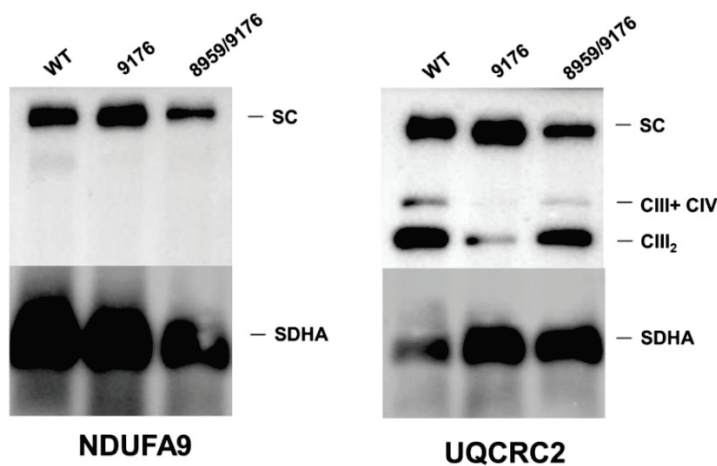
diferencias apreciables en los niveles del dímero entre ellos. Los resultados se muestran en la **Figura 50**.

II. Análisis de ensamblaje de los supercomplejos de la CRM

Los resultados del análisis de los supercomplejos de la CRM revelaron principalmente una disminución en los niveles del respirasoma en los clones dobles mutantes 8959/9176 respecto a los clones control y los clones 9176, con los dos anticuerpos utilizados (anti-NDUFA9-CI y anti-UQCRC2-CIII). Los resultados se muestran en la **Figura 51**:



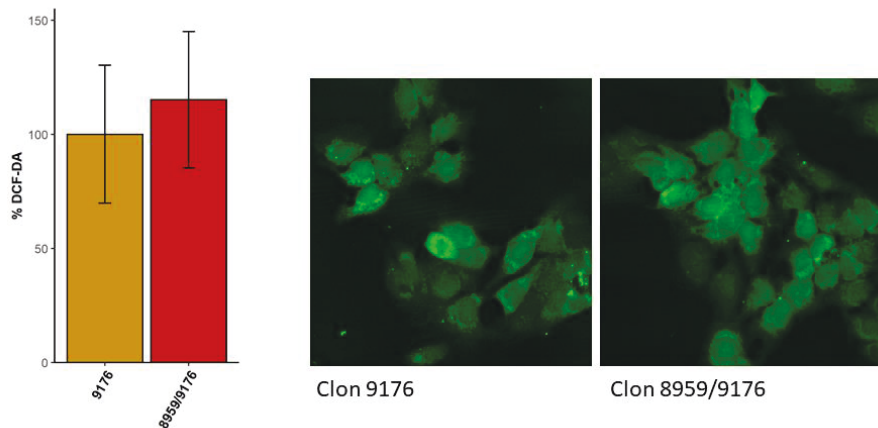
**Figura 50.** Análisis estructural mediante BNE de la ATP Sintasa. Se observa un leve efecto desestabilizador de la doble mutación m.9176T>C/m.8959G>A tanto en el monómero como en el dímero de la ATP sintasa. Los clones con la mutación m.9176T>C no mostraron diferencias apreciables respecto a los clones WT. La proteína SDHA (CII) se utilizó como control de carga.



**Figura 51.** Análisis estructural mediante BNE de los supercomplejos de la CRM en la línea de híbridos con las variantes m.9176T>C/m.8959G>A. Se observa una ligera disminución del respirasoma (SC I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1-2</sub>). La proteína SDHA (CII) se utilizó como control de carga. SC: respirasoma.

### f) Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

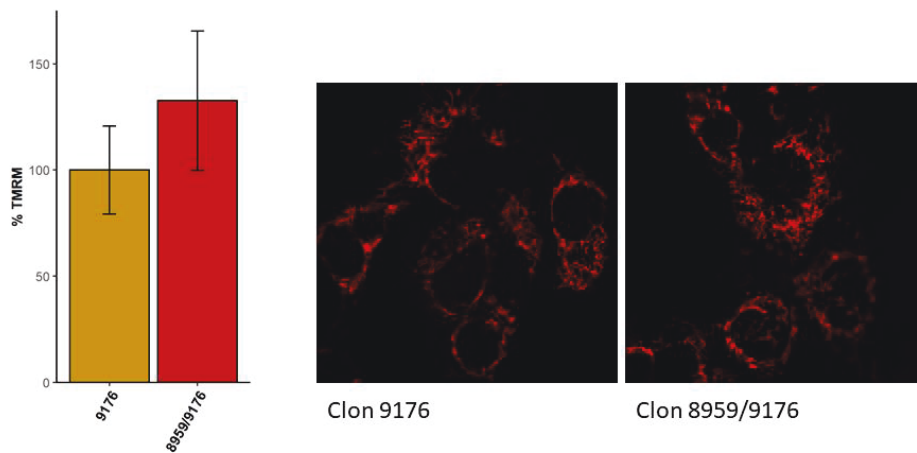
El análisis de los niveles de ROS en forma de  $H_2O_2$  mediante microscopía confocal usando la sonda DA-DCF no mostró diferencias significativas entre los clones 8959/9176 y los clones 9176. Los resultados se muestran en la **Figura 52**.



**Figura 52.** Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea de híbridos con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los clones 9176 y los 8959/9176.

### g) Análisis del Potencial de Membrana

El análisis del potencial de membrana mediante microscopía confocal no reveló diferencias significativas entre los clones dobles mutantes y los clones 9176. Los resultados se muestran en la **Figura 53**.



**Figura 53.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial en la línea de híbridos con las variantes *m.9176T>C/m.8959G>A*. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los clones 9176 y los 8959/9176.

## DISCUSIÓN

## 1. Estudio cohorte de pacientes con mutaciones en los genes del ADN mitocondrial que codifican subunidades del complejo V

El análisis de la cohorte de pacientes con enfermedad mitocondrial debida a mutaciones en el gen *MT-ATP6* mostró que la frecuencia de las variantes agrupadas por familias era similar a la distribución de mutaciones en el gen *MT-ATP6* descrita en la bibliografía<sup>125,182</sup>. Las mutaciones en la posición 8993 del mtDNA, m.8993T>G y m.8993T>C, fueron las más frecuentes, representando más del 50% del total de mutaciones. Respecto a las variantes identificadas en el gen *MT-ATP8*, dos de ellas, la m.8403T>C y m.8424T>C, se han descrito previamente en la literatura<sup>142,144</sup>. Las familias con mutaciones en el gen *MT-ATP8* representaron aproximadamente el 10% del total de familias de la cohorte. Esta proporción es superior a la esperada teniendo en cuenta los numerosos pacientes descritos portadores de mutaciones en el gen *MT-ATP6* (más de 200 en el año 2019)<sup>125</sup> en comparación con el escaso número de pacientes con mutaciones en *MT-ATP8* publicados hasta la fecha, ya que únicamente se han descrito 11 pacientes y en varios de los casos no se han realizado ensayos funcionales que demuestren la patogenicidad de las variantes identificadas<sup>135,142-146,149,150,183-185</sup>.

La distribución de las dos variantes más frecuentes en la cohorte analizada, la m.8993T>G y m.9176T>C, entre los grupos de pacientes sintomáticos e individuos asintomáticos sugiere un efecto menos deletéreo de la variante m.9176T>C en comparación con la m.8993T>G. Por una parte, la proporción de la variante m.9176T>C es mayoritaria en el grupo de asintomáticos en relación con el de pacientes, al contrario de lo que ocurre con la variante m.8993T>G y, por otro lado, la heteroplasmia media de la variante m.9176T>C es superior que la heteroplasmia media de la variante m.8993T>G tanto en el grupo de sintomáticos como en el de asintomáticos (**Figura 12**, Panel B). Llama la atención que, en el grupo de asintomáticos, la heteroplasmia media de la variante m.9176T>C fue del 76% (habiendo incluso individuos asintomáticos homoplásmicos para esta variante) en comparación con el 46% de heteroplasmia media observada para la variante m.8993T>G, lo que sugiere la existencia de posible penetrancia incompleta de la misma. De hecho, la heteroplasmia media de la variante m.9176T>C en el grupo de individuos asintomáticos fue la más elevada de entre todas las variantes identificadas en este grupo (**Tabla 18**), hallazgo que es consistente con un efecto deletéreo de esta variante más leve en comparación con el resto de variantes. Además, como se discutirá más adelante en el apartado 4 de esta sección (dedicado a las mutaciones m.9176T>C y m.8959G>A halladas en el paciente 3), los estudios funcionales realizados en este trabajo en los cíbridos portadores de la variante m.9176T>C aislada no mostraron un impacto funcional sustancial, comportándose en la mayor parte de los estudios realizados de forma similar a los cíbridos control-WT, hallazgos que refuerzan el presumible

menor efecto deletéreo observado en los individuos portadores de esta variante en nuestra cohorte de pacientes.

La predicción estructural para las variantes m.8993T>G y m.9176T>C realizada con el software de modelado por homología SWISS-MODEL<sup>176</sup> reveló que la sustitución del residuo leucina-271 por prolina predicho por la variante m.9176T>C provocaría un efecto de desestabilización de la  $\alpha$ -hélice localizada en el extremo C-terminal de la proteína (**Figura 13**, Panel A), lo que es consistente con el efecto desestabilizador en  $\alpha$ -hélices previamente documentado que posee el aminoácido prolina<sup>177,178</sup>. En el caso de la variante m.8993T>G, que conduce a una sustitución del residuo leucina-156 por arginina, la predicción estructural no mostró ningún efecto sobre la  $\alpha$ -hélice en la que se localiza la variante (**Figura 13**, Panel B). Sin embargo, este residuo se localiza en la zona central de la proteína y la sustitución de leucina por un aminoácido de mayor tamaño como la arginina podría tener un efecto desestabilizador sobre regiones cercanas (como  $\alpha$ -hélices vecinas) causado por un impedimento estérico. Por otra parte, la subunidad a (codificada por el gen *MT-ATP6*) junto con el anillo formado por 8 subunidades c son las regiones proteicas responsables de la translocación de protones durante el ciclo catalítico de la ATP sintasa, y el residuo 156 de la subunidad a está localizado en la  $\alpha$ -hélice que interviene en la formación de este canal de protones; en este sentido, se ha descrito que la mutación m.8993T>G podría inducir cambios estructurales que provocarían una disminución en la capacidad de síntesis de ATP de la ATP sintasa debido a una translocación deficiente de protones<sup>125,137</sup>. Estos datos a nivel estructural también parecen indicar que el efecto deletéreo de la mutación m.8993T>G podría ser más acusado que el provocado por la variante m.9176T>C, si bien las predicciones *in silico* necesitan ser corroboradas mediante estudios funcionales.

En cuanto a una posible relación genotipo-fenotipo, se ha descrito que la variante m.8993T>G tiende a provocar un fenotipo más grave y una aparición de los síntomas más temprana que otras variantes patogénicas identificadas en el gen *MT-ATP6*<sup>136</sup>. En la cohorte estudiada en este trabajo el número de pacientes probablemente no es lo suficientemente elevado como para observar diferencias significativas. De hecho, no se apreció una relación genotipo-fenotipo en cuanto al tipo de variante, siendo la mutación m.8993T>G predominante tanto en el fenotipo más grave, el Síndrome de Leigh, como en el más leve, el Síndrome NARP, con un 65% y 83% de los casos, respectivamente. La relación clara se observó en los niveles de heteroplasmia, siendo la heteroplasmia media de todas las variantes en los pacientes con el fenotipo más grave, Síndrome de Leigh, superior a 99%, mientras que la heteroplasmia media de las variantes en los casos de fenotipo menos grave, NARP, fue del 68%.

Por último, destacar que aproximadamente el 50% de los pacientes no se pudo encuadrar en ninguno de los síndromes mitocondriales clásicos (tales como Síndrome de Leigh, MELAS, y

NARP) lo que muestra la elevada heterogeneidad clínica en esta cohorte, y la dificultad para establecer relaciones fenotipo-genotipo en pacientes con enfermedad mitocondrial producida por mutaciones en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* que afecten al CV, de forma similar a lo que sucede en otras enfermedades mitocondriales<sup>83</sup>. Esta heterogeneidad clínica queda ilustrada en la familia del paciente 2 donde cada miembro afectado (3 hermanos y su madre) muestra una sintomatología diferente (**Figura 8**).

## 2. Caracterización bioquímica, molecular y funcional de la variante m.8391G>A en el gen *MT-ATP8*

La variante m.8391G>A, que predice la aparición de un codón prematuro de terminación en residuo 9 de la proteína (p.Trp9Ter), se identificó en la paciente 1. Esta paciente fue diagnosticada clínicamente de síndrome de NARP con hipoacusia y cefaleas. Este cuadro clínico no ha sido descrito previamente asociado a mutaciones en el gen *MT-ATP8*, sin embargo, sí se ha asociado frecuentemente a mutaciones en el gen *MT-ATP6*<sup>125</sup>. El estudio de la variante en familiares de la rama materna de la paciente 1 mostró la ausencia de la misma en su madre, una hermana y una tía materna por lo que se consideró que se trataba muy probablemente de una variante que había aparecido *de novo* en la paciente.

Se generó una línea de híbridos a partir de plaquetas de la Paciente 1, seleccionándose finalmente 3 clones WT (controles isogénicos), 2 clones 70% heteroplásmicos y un clon 100% mutante (homoplásmico). No se pudieron obtener más clones 100% mutantes, razón por la que se seleccionaron para los experimentos los dos clones heteroplásmicos mencionados anteriormente. Esta dificultad para obtener clones homoplásmicos para la mutación indica en sí misma un probable efecto deletéreo de la variante m.8391G>A. El análisis por RT-PCR del número de copias de mtDNA de los diferentes clones una vez transcurrido el periodo necesario para su estabilización (aproximadamente 8 semanas) reveló un aumento significativo del número de copias de mtDNA de los clones 70% heteroplásmicos y del clon 100% mutante en comparación con los WT (**Figura 17**). Esta diferencia en el número de copias entre clones no es la situación ideal, ya que puede hacer que la evaluación de los resultados de la función mitocondrial obtenidos en los diferentes experimentos ostente un cierto sesgo, puesto que a mayor número de copias de mtDNA se podría esperar, por ejemplo, una mayor expresión de proteínas codificadas por el mtDNA. Sin embargo, el aumento del número de copias de mtDNA en los clones mutantes es otro indicador de que esos clones pueden tener un defecto en la función mitocondrial y que se produce un efecto compensatorio mediante este mecanismo, entre otros.

En cuanto al resultado de los diferentes ensayos funcionales, se comprobó en primer lugar los niveles de expresión de la subunidad A6L, codificada por el gen *MT-ATP8*, en los diferentes clones mediante WB, y se confirmó que la variante *nonsense* provoca la ausencia casi en su totalidad de proteína en el clon 100% mutante y un marcado descenso de su expresión en los clones 70% heteroplásmicos (**Figura 22**). El estudio de la tasa de proliferación celular evidenció un déficit en la producción de ATP mitocondrial en el clon 100% mutante en comparación con los clones WT y los 70% heteroplásmicos, ya que se realizó en un medio suplementado con galactosa y bajo en glucosa, y en esas condiciones la producción de ATP celular es casi exclusivamente de origen mitocondrial<sup>186</sup>. Este déficit en la producción de ATP mitocondrial se confirmó mediante los estudios bioenergéticos en los que el clon 100% mutante mostró una menor tasa de consumo de oxígeno basal y sensible a oligomicina, y un incremento en su glucólisis basal, demostrando la dependencia de la vía glucolítica para obtener energía de este clon. Además, puesto que la respiración máxima y las actividades de la CRM fueron normales, se podría descartar que un fallo secundario en la CRM fuese responsable de la baja tasa de crecimiento en condiciones de baja disponibilidad de glucosa. Los clones 70% heteroplásmicos no mostraron diferencias en estos estudios respecto a los clones control, lo que sugiere que un contenido bajo de copias de mtDNA WT tiene una elevada capacidad de compensación en estas células, de hecho, en la mayoría de experimentos realizados no se apreciaron diferencias significativas entre los clones 70% heteroplásmicos y los clones control.

El estudio de la actividad enzimática del CV y el estudio bioenergético mediante respirometría demostraron que el déficit de producción de ATP mitocondrial es debido a un defecto en la ATP Sintasa, puesto que el clon 100% mutante presentó una actividad ATPasa y un OCRo considerablemente menor que los clones WT. Los clones heteroplásmicos obtuvieron una actividad ATPasa intermedia entre los clones WT y el 100% mutante, siendo este ensayo, junto con el de la expresión de la subunidad A6L mediante WB, los únicos en los que los clones heteroplásmicos mostraron un comportamiento distinto a los clones control.

La ausencia de diferencias en el potencial de membrana mitocondrial entre los clones control y el 100% mutante, podría deberse a un menor bombeo de protones por parte de los complejos I, III y IV para compensar la menor actividad del CV y mantener de esta manera la estabilidad en el potencial de membrana, evitando un aumento del potencial que de otro modo pondría en riesgo la viabilidad celular<sup>187</sup> y podría conducir a un incremento en la producción de ROS. En este sentido destaca que la fuga de protones en el ensayo de respirometría fue significativamente menor en el clon 100% mutante que en el WT, lo que apoyaría la ausencia de hiperpolarización y de incrementos en la producción de ROS por efecto de la mutación. Los resultados de los estudios bioenergéticos, en los que el clon 100% mutante mostró un menor consumo de oxígeno (y por lo tanto una menor traslocación de protones por parte de la CRM), apoyarían esta hipótesis.

Tampoco se encontraron diferencias en la generación de ROS entre los clones WT y el clon 100% mutante, aunque estudios previos sí que han descrito cambios en el potencial de membrana mitocondrial e incrementos en la producción de ROS en células humanas con mutaciones en el gen *MT-ATP6*<sup>125</sup>.

En cuanto a las consecuencias estructurales de la ausencia de la subunidad A6L en la ATP Sintasa, en el análisis por BNE utilizando anticuerpos contra la porción F<sub>1</sub> (subunidad β) se observó una acumulación de tres subcomplejos que no aparecen en los clones WT y una disminución drástica de la banda correspondiente al monómero de CV (**Figura 24**). Este patrón de bandas es similar al previamente publicado<sup>188</sup> en células ρ<sup>o</sup> (células deplecionadas de mtDNA), al realizar en condiciones similares una BNE en el que no se expresan, por tanto, las dos subunidades codificadas por el mtDNA (subunidades a y A6L). En este estudio se identificaron los componentes de los tres subcomplejos de CV de acuerdo a su decreciente tamaño molecular como la porción F<sub>1</sub> unida al anillo de subunidades c<sub>8</sub>, la porción F<sub>1</sub> unida a la proteína inhibitoria IF1 y la porción F<sub>1</sub> aislada. En el análisis BNE en las líneas de híbridos m.8391G>A estos subcomplejos únicamente aparecen cuando se utilizan anticuerpos contra la porción F<sub>1</sub> y no al usar anticuerpos contra subunidades del tallo periférico (OSCP y subunidad d), lo que confirma que los subcomplejos que aparecen en los clones mutantes m.8391G>A carecen de tallo periférico. La presencia de estos subcomplejos de CV podría ser debida o bien a un ensamblaje incompleto del CV, o a la degradación del CV mutante en las condiciones de solubilidad de la BNE a causa de una menor estabilidad del mismo. Estos resultados parecen indicar que los subcomplejos se originarían por una menor estabilidad del CV portador de la mutación m.8391G>A en el gen *MT-ATP8*, pues la banda correspondiente al monómero de CV también aparece en el clon mutante, aunque con una intensidad significativamente menor que en los clones WT, lo que podría indicar que el monómero también puede llegar a ensamblarse en este clon. Existen trabajos que apoyan esta hipótesis, por ejemplo, Wittig *et al.*<sup>189</sup> al estudiar el ensamblaje de la ATP Sintasa en células humanas ρ<sup>o</sup> utilizando la técnica Clear Native Electrophoresis, que utiliza condiciones más suaves de solubilización que la BNE, observaron que incluso en estas células carentes de las subunidades a y A6L, también se puede formar el monómero de CV prácticamente íntegro. De hecho, la acumulación de intermediarios de ensamblaje en células carentes de estas dos subunidades del CV codificadas por el mtDNA no es esperable, puesto que se ha descrito que homólogos de estas subunidades en otros organismos están entre las últimas en incorporarse al monómero en el proceso de biogénesis de este complejo<sup>190,191</sup>. En el estudio de He *et al.*<sup>46</sup>, en el que se estudia el ensamblaje del CV humano, también se concluye que las subunidades a y A6L son, junto con la subunidad DAPIT, las últimas en incorporarse al monómero. En resumen, los resultados obtenidos sugieren que el CV del clon m.8391G>A-mutante, el cual no expresa la subunidad A6L, es más inestable que el clon WT y tiende a perder los componentes del tallo periférico, lo que



enfatisa que la subunidad A6L, por si misma, juega un importante papel en la integridad estructural del CV, lo que es consistente con estudios previos<sup>123,124</sup> en los que se indica que la región C-terminal de la subunidad A6L interactúa con las subunidades d y b del tallo periférico, contribuyendo a su estabilización.

En cuanto a la estabilidad de los oligómeros del CV (dímero y tetrámero) la ausencia de la subunidad A6L también causó un efecto desestabilizador de los mismos. No se observó en ninguno de los estudios de BNE realizados las bandas correspondientes al dímero o tetrámero del CV en el clon mutante, mientras que en los clones WT se identificaron claramente las bandas correspondientes a estos oligómeros cuando se utilizaron las condiciones suaves de solubilización de digitonina en los estudios de BNE realizados (**Figura 24**). En las BNE realizadas bajo condiciones fuertes de digitonina no se observaron bandas de oligómeros en ningún clon, ni siquiera en los WT, poniendo de manifiesto como la integridad de CV y sus oligómeros depende también de las condiciones en las que se ha realizado la BNE. Diferentes estudios han considerado la posible implicación de la subunidad A6L en la formación de los oligómeros de CV. He *et al.*<sup>46</sup> sugieren que el proceso de dimerización comenzaría inmediatamente después de la inserción de las subunidades a y A6L, mientras que Wittig *et al.*<sup>192</sup> indican que la subunidad A6L podría tener un papel en la estabilización de la interfase monómero-monómero de los oligómeros. Los resultados del modelo celular de este trabajo de tesis apoyan esta posible implicación de la subunidad A6L en la formación o estabilización de los oligómeros del CV. Esta menor estabilidad de los oligómeros, o menor capacidad para su formación, observada en el clon mutante también contribuiría a la menor actividad enzimática del CV, ya que se ha descrito que aunque el monómero de CV es capaz de sintetizar ATP la organización en oligómeros es beneficiosa para su actividad gracias a que estabiliza la enzima, que de otro modo estaría sujeta a un mayor estrés debido a las interacciones entre sus partes móviles y estáticas<sup>52</sup>.

El efecto de la variante m.8391G>A más destacable sobre el resto de complejos OXPHOS fue una marcada reducción de los niveles de respirasoma (SC I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>) en el clon mutante en comparación con los clones WT (**Figura 25**). Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna publicación en la que se muestre una disminución de los niveles de respirasoma en pacientes con mutaciones en genes estructurales del CV. Sin embargo, se ha descrito una disminución análoga en los SC de otros organismos como *Drosophila*<sup>193</sup>. Como posible explicación se ha propuesto que la integridad de las crestas mitocondriales podría afectar a la estabilidad de los SC<sup>194</sup> y puesto que la formación de las crestas se encuentra estrechamente relacionada con la dimerización de la ATP Sintasa<sup>62,67,195</sup>, la limitación en la capacidad de formar dímeros que presentan los clones mutantes podría explicar esta disminución en los niveles de SC. Además, como se expondrá en el siguiente epígrafe, también se observaron anomalías en las crestas mitocondriales del clon mutante.

Por último, el análisis morfológico ultraestructural mediante microscopía electrónica reveló una disminución en el número de crestas mitocondriales en el clon mutante en comparación a los clones WT, sin encontrarse otras diferencias en el resto de los análisis morfológicos relativos a la mitocondria (**Figura 28**). Se ha descrito en la literatura<sup>62,65,121</sup> la implicación del CV en la formación de crestas mitocondriales y se ha propuesto que los dímeros, que forman un ángulo en forma de “V” de 70° a 90°<sup>62</sup> y se encuentran en los ápices de las crestas mitocondriales, contribuyen a la formación de las invaginaciones que dan lugar a las crestas mitocondriales de la membrana mitocondrial interna. También se ha estudiado el efecto que causa la eliminación de las subunidades necesarias para la dimerización del CV en líneas celulares de *S.cerevisiae*, describiéndose en este caso cambios estructurales en la membrana de las crestas<sup>195</sup>. En el clon m.8391G>A-mutante no se encontró una alteración significativa en la forma de las crestas, pero sí una disminución en el número de las mismas. Esta disminución podría estar relacionada con la limitación para formar oligómeros en el clon mutante que se evidenció en los experimentos de BNE. De forma análoga también se ha descrito un descenso en el número de crestas mitocondriales en fibroblastos de un paciente con mutaciones bialélicas en el gen nuclear *ATP5F1D*, que codifica la subunidad  $\delta$  del tallo central del CV<sup>151</sup>.

### 3. Caracterización bioquímica, molecular y funcional de la variante m.8424T>C en el gen *MT-ATP8*

La variante m.8424T>C, que se identificó en el paciente 2, predice un cambio aminoacídico en el residuo Leu-20 que conduce a su sustitución por prolina (p.Leu20Pro). Este aminoácido se encuentra en el interior de una  $\alpha$ -hélice en la región N-terminal de la proteína y la predicción *in-silico* realizada reveló una probable alteración estructural en la región donde se encuentra el aminoácido (**Figura 29**). Adicionalmente, como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que el cambio de leucina por prolina en una estructura de  $\alpha$ -hélice podría interrumpir su formación<sup>177,178</sup>.

La heteroplasmia de la variante se estudió en varios familiares afectados del paciente 2 (dos hermanos, madre, abuela y tía materna) y una sobrina (asintomática). Los resultados se muestran en la **Tabla 20**, mientras que el resumen clínico de cada miembro de la familia se indica en su árbol genealógico (**Figura 8**). La gravedad y tipo de sintomatología está relacionada con el nivel de heteroplasmia de la variante, siendo en general más o menos leves en función del nivel de heteroplasmia. Al igual que sucedía en la paciente 1, el fenotipo de varios miembros de esta familia (encefalopatía MELAS-like, con ataxia, retinitis pigmentosa y epilepsia en el paciente 2 o insuficiencia renal crónica en uno de sus hermanos) no se habían asociado previamente a mutaciones en el gen *MT-ATP8*, incluyendo un paciente que también portaba la mutación

m.8424T>C en homoplasma<sup>144</sup>, lo que pone de manifiesto la variabilidad clínica que puede encontrarse asociada a este gen, de forma similar a la mayoría de genes causantes de patología mitocondrial.

Para estudiar las consecuencias funcionales y estructurales de esta variante se generó una línea de híbridos a partir de plaquetas del hermano varón del paciente 2 (42% de heteroplasma para la variante m.8424T>C en sangre), y se seleccionaron 3 clones WT (controles isogénicos) y 3 clones 100% mutantes (homoplásmicos). A diferencia de lo que se observó en la línea de híbridos de la Paciente 1 (variante m.8391G>A), el análisis por RT-PCR del número de copias de mtDNA de los diferentes clones una vez transcurrido el periodo necesario para su estabilización no mostró diferencias significativas (**Figura 30**). En general, en la mayoría de experimentos realizados se observa un impacto funcional o estructural menor en esta línea de híbridos que en la variante m.8391G>A, como era de esperar *a priori* debido al tipo de mutación entre ambas líneas de híbridos (*nonsense vs missense*).

En el estudio de proliferación celular se apreció un menor crecimiento de los clones mutantes, que reveló su menor capacidad de producción de ATP mitocondrial (**Figura 31**). Los estudios bioenergéticos de respirometría también revelaron una menor tasa de consumo de oxígeno basal y sensible a oligomicina, y un incremento en la glucólisis basal de los clones mutantes, lo que demuestra una menor capacidad para producir ATP mitocondrial en estos clones (**Figura 33 y Figura 34**). En el estudio de actividad enzimática de los complejos OXPHOS solo se vio afectado el CV, hallazgo que junto a la menor respiración sensible a oligomicina, señalan a este complejo como el responsable del déficit (**Figura 32**). No se apreciaron alteraciones ni en el potencial de membrana mitocondrial (**Figura 40**) ni en la producción de ROS (**Figura 39**), de forma similar a lo observado en la línea de híbridos con la variante m.8391G>A.

En cuanto a las consecuencias estructurales en la ATP Sintasa provocadas por la alteración de la subunidad A6L los análisis por BNE también mostraron la acumulación de los tres subcomplejos que se observaron en la línea de híbridos con la variante m.8391G>A (**Figura 37**), y cuyo origen e interpretación estructural ya se ha discutido en el apartado correspondiente de la mencionada línea de híbridos. Sin embargo, hay que destacar que la proporción subcomplejos/monómero en la línea de híbridos con mutación m.8424T>C es mucho menor, indicando una mayor estabilidad e integridad del monómero que incluiría a la subunidad A6L con la mutación (p.Leu20Pro) en comparación con la línea de híbridos m.8391G>A en la que la subunidad A6L está ausente, demostrando que la presencia de la subunidad A6L en el complejo, a pesar de estar alterada por la mutación, es capaz de estabilizar el tallo periférico en el monómero del CV. Hay que destacar que la mutación p.Leu20Pro no está localizada en el extremo C-terminal, que es la región que interactúa con el tallo periférico, sino en el extremo N-terminal que es la región de A6L que

interactúa con la subunidad  $\alpha$ <sup>196</sup>, por lo que el efecto patogénico de la mutación podría deberse a una interacción defectuosa entre ambas subunidades (A6L y  $\alpha$ ) en lugar de al efecto destabilizador sobre el tallo periférico.

La estabilidad de los oligómeros del CV también se vio afectada en los clones mutantes, pues en el análisis por BNE solo mostraron una ligera banda, correspondiente al dímero, de menor intensidad a la mostrada por los clones WT y ausencia de la banda correspondiente al tetrámero. Aunque la capacidad de formar multímeros o la estabilidad de los mismos está afectada en esta línea celular, este efecto también es menor que en la línea de híbridos m.8391G>A con la subunidad A6L ausente, confirmando la implicación de esta subunidad en la formación o estabilización de oligómeros pues la integridad de los oligómeros es mayor cuando la subunidad está presente, aunque alterada por la mutación, que cuando está totalmente ausente.

Respecto al efecto causado en el resto de complejos OXPHOS, se observó un descenso en los niveles del respirasoma (SC I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>) en los clones mutantes en comparación con los clones WT (**Figura 38**), aunque esta disminución no resultó tan marcada como la observada con la línea de híbridos portadores de la variante m.8391G>A.

Por último, el análisis morfológico ultraestructural mediante microscopía electrónica no reveló ninguna alteración significativa (**Figura 41**). Tampoco mostró un defecto en el número de crestas mitocondriales, al contrario de lo observado con la línea de híbridos m.8391G>A. Como se discutió previamente, los dímeros contribuyen a la formación de las invaginaciones que dan lugar a las crestas mitocondriales y aunque la formación de oligómeros se encuentra alterada por la presencia de la variante p.Leu20Pro, ésta no se encuentra totalmente impedida por lo que el efecto deletéreo sobre las crestas mitocondriales podría no ocurrir debido a la mayor estabilidad que confiere la presencia de la subunidad A6L a los distintos oligómeros del CV.

#### **4. Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A en el gen *MT-ATP6***

Las variantes m.9176T>C (p.Leu217Pro) y m.8959G>A (p.Glu145Lys), ambas localizadas en la subunidad  $\alpha$  del CV codificada por el gen *MT-ATP6*, fueron identificadas en el paciente 3. La variante m.9176T>C, previamente descrita en la literatura como patogénica<sup>179,180</sup> y asociada principalmente a síndrome de Leigh, ataxia y neuropatía, fue identificada en homoplasmia en el paciente, mientras que la variante m.8959G>A se encontró con elevados niveles de heteroplasmia en distintos tejidos. En el estudio de ambas variantes en varios familiares asintomáticos de la rama materna del paciente 3 (madre, abuela, tía y primo) se encontró la variante m.9176T>C en homoplasmia en todos ellos, mientras que la variante m.8959G>A fue identificada únicamente en

la madre del paciente 3 con niveles relativamente bajos de heteroplasmia (aproximadamente 35% en sangre y células uroepiteliales). La m.8959G>A, por el contrario, no se encontró presente en la abuela, tía y primo maternos. En el hermano del paciente 3, con un fenotipo clínico de ataxia y retraso psicomotor leve, se identificó la variante m.9176T>C en homoplasmia y la variante m.8959G>A con un elevado nivel de heteroplasmia (>90%) en sangre (**Tabla 21** y **Figura 9**). En su conjunto, los hallazgos de segregación de las dos variantes en la familia parecen sugerir como principal responsable del fenotipo del paciente 3 y su hermano a la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys).

La modelización estructural realizada para la variante m.9176T>C (p.Leu217Pro) (**Figura 42**, Panel A) predijo una alteración en la  $\alpha$ -hélice en la que se localiza, ubicada en el extremo C-terminal de la proteína. En el caso de la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys) (**Figura 42**, Panel B) la predicción no mostró ningún efecto estructural destacable sobre la  $\alpha$ -hélice en la que se localiza la variante. Sin embargo, sí que se aprecia que el mayor tamaño del residuo mutante en comparación con el WT puede interferir con regiones cercanas por efecto estérico. Dado que el residuo 145 se localiza en una región central de la proteína estas interacciones estéricas podrían tener efectos importantes sobre la estructura tridimensional de la proteína. De hecho, este aminoácido se encuentra en una posición cercana a la de la mutación más común en el gen *MT-ATP6*, la m.8993T>G (p.Leu156Arg)<sup>125</sup>, de la cual, como se mencionó en el primer apartado de esta discusión, se ha descrito<sup>125,137</sup> que está ubicada en una región crítica de la proteína que interviene en la formación del canal a través del cual pasan los protones durante el ciclo catalítico de la ATP sintasa. La hipótesis de que el residuo afectado por la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys) esté involucrado en la traslocación de protones a través de la MMI también la apoya el trabajo de Guo *et al.*<sup>197</sup> en el que se resuelve mediante criomicroscopía electrónica la estructura de la ATP Sintasa de *S. cerevisiae* y estudian como los protones viajan a través del complejo F<sub>0</sub> durante el ciclo catalítico de la enzima. En el mencionado artículo mencionan varios aminoácidos de la subunidad a que participan en la traslocación de protones a través de la MMI mediante un mecanismo de donación y aceptación de protones, incluyendo el residuo Glu162 de *S. cerevisiae*. Este residuo Glu162 en la subunidad a de *S. cerevisiae* es el equivalente al residuo Glu145 en la proteína homóloga de *H. Sapiens*<sup>198</sup>, que es el aminoácido afectado por la variante m.8959G>A (p.Glu145Lys). La región donde se ubica este aminoácido se encuentra muy conservada entre diferentes especies, incluyendo *S. cerevisiae* y *H. Sapiens*<sup>198</sup>, por lo que es de esperar que también en humanos el aminoácido Glu145 conserve esa función en la traslocación de protones que parece tener en *S. cerevisiae*.

Para estudiar la contribución de las dos variantes al fenotipo de los miembros afectados en esta familia y las consecuencias funcionales y estructurales en el CV de ambas variantes se generó una línea de cíbridos a partir de plaquetas de la madre de los pacientes (que tenía un 100% de

heteroplasmia para la variante m.9176T>C y un 34% de heteroplasmia para la variante m.8959G>A en sangre). Además, dado que los clones obtenidos son portadores o bien de la variante m.9176T>C o de ambas (m.9176T>C/m.8959G>A) también se incluyó en estos estudios un híbrido WT perteneciente al haplogrupo H del mtDNA (el mismo haplogrupo que el de esta familia) como control en algunos de los análisis realizados.

No se apreciaron diferencias en el número de copias de mtDNA entre los clones portadores de la variante m.9176T>C en homoplasmia y los dobles mutantes m.9176T>C/m.8959G>A (ambas también en homoplasmia, **Figura 43**). Sin embargo, el estudio de la tasa de proliferación celular (**Figura 44**), los estudios bioenergéticos de respirometría (**Figura 46**) y el análisis de la actividad enzimática de los complejos OXPHOS (**Figura 45**) reveló un mayor impacto funcional, debido a un déficit enzimático del CV, en los híbridos con la doble mutación m.9176T>C/m.8959G>A en comparación con los portadores de la mutación m.9176T>C, de consecuencias similares a las observadas en las mutaciones anteriormente discutidas en esta memoria. Los híbridos portadores únicamente de la mutación m.9176T>C no mostraron diferencias significativas con los controles WT de haplogrupo H en ninguna de las variables analizadas. Estos resultados plantean dos posibilidades: que la variante m.8959G>A sea la principal contribuyente al fenotipo celular o que las dos variantes, m.8959G>A y m.9176T>C, estén contribuyendo al fenotipo. Dado que no se dispone de un clon que solo presente la variante m.8959G>A para su análisis no se puede confirmar un efecto neutro de la variante m.9176T>C o descartar que exista un efecto sinérgico y que únicamente cuando coexisten las dos se observe un claro efecto patogénico.

En cuanto a las consecuencias estructurales sobre la ATP Sintasa provocadas por ambas mutaciones los análisis mediante BNE también mostraron una afectación en la estabilidad del monómero portador de las dos mutaciones m.9176T>C/m.8959G>A en comparación con el monómero portador de la mutación m.9176T>C (**Figura 50**), pues en las dos condiciones (suaves y fuertes) en las que se realizaron los experimentos se observó un acúmulo de los 3 subcomplejos ya descritos en apartados previos en los híbridos m.9176T>C/m.8959G>A, mientras que los híbridos m.9176T>C solo mostraron el monómero íntegro sin observarse la presencia de los subcomplejos de forma análoga a lo que sucede con los clones control WT.

La estabilidad de los oligómeros del CV también se vio afectada en los clones m.9176T>C/m.8959G>A, pues se observó una ligera disminución en la banda correspondiente al dímero en comparación con los clones con la mutación m.9176T>C y los clones WT, que no mostraron diferencias entre ellos. Como ocurría con los ensayos funcionales es complejo llegar a discernir si la principal responsable de los efectos estructurales observados sobre el monómero y dímero de CV es la variante m.8959G>A o si existe una contribución al fenotipo de las dos variantes, puesto que no se dispone de células que solo porten la mutación m.8959G>A para

realizar una comparación de ambas mutaciones de forma aislada. En cualquier caso, si comparamos los resultados obtenidos en esta línea de cíbridos con las que portaban la mutación *missense* en el gen *MT-ATP8* parece que, al menos a nivel estructural, la alteración de la subunidad codificada por *MT-ATP6* afecta de una forma menos grave a la estabilidad de los oligómeros que cuando está afectada la subunidad A6L, dado que la disminución de los niveles del dímero es menor en esta línea con dos mutaciones en *MT-ATP6* que en la línea con la variante p.Leu20Pro en *MT-ATP8*. Sin embargo, en cuanto a la estabilidad del monómero de CV no se encontraron diferencias apreciables entre las dos líneas mencionadas ya que la acumulación de subcomplejos y la proporción monómero/subcomplejos es similar en ambos casos (**Figura 37** y **Figura 50**) indicando que las subunidades a y A6L tendrían una contribución similar en la estabilización del tallo periférico.

Como se comentó en el apartado de la discusión relativo a los resultados de la cohorte de pacientes, la variante m.9176T>C fue la que pareció tener un menor efecto patogénico en esta cohorte, pues se encontraba con mayor frecuencia en el grupo de individuos asintomáticos que en el grupo de pacientes sintomáticos y además tenía el mayor porcentaje de heteroplasmia promedio en el grupo de asintomáticos. Los resultados de los ensayos funcionales realizados con esta línea de cíbridos apoyan una menor capacidad patogénica de la variante m.9176T>C en comparación con otras variantes en el gen *MT-ATP6*.

## **CONCLUSIONES**



- 1. Las mutaciones m.8993T>G y m.9176T>C en el gen *MT-ATP6* son las más frecuentes en pacientes con defectos del complejo V.** Se identificaron un total de 67 pacientes portadores de variantes patogénicas en los genes *MT-ATP6* y *MT-ATP8* durante el periodo 1994-2020, de los cuales 42 (63% del total de la cohorte) portaban las mutaciones comunes m.8993T>G y m.9176T>C en el gen *MT-ATP6*.
- 2. La variante genética m.9176T>C tiene un carácter patogénico más leve que otras variantes en el gen *MT-ATP6*.** El estudio de la cohorte indica que la variante m.9176T>C presenta un menor potencial patogénico que otras variantes descritas en el gen *MT-ATP6*, incluyendo la mutación común m.8993T>G.
- 3. Se han identificado dos mutaciones en el gen *MT-ATP8* asociadas a nuevos fenotipos clínicos.** Se identificaron varios pacientes con mutaciones en el gen *MT-ATP8* con fenotipos no descritos previamente asociados a dicho gen: i) Síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), ii) síndrome similar a encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ictus (MELAS-like), con ataxia, retinitis pigmentosa y epilepsia, y iii) insuficiencia renal crónica.
- 4. Se observó un papel destacado de la proteína A6L en la biogénesis o estabilidad de la ATP sintasa y sus formas macromoleculares,** utilizando dos modelos celulares de cíbridos transmitocondriales portadores de las variantes genéticas m.8391G>A (p.Trp9Ter) y m.8424T>C (p.Leu20Pro) en el gen *MT-ATP8*.
  - 4.1. Tanto la actividad ATPasa como la síntesis de ATP por la ATP Sintasa están disminuidas, y el potencial de membrana está preservado.
  - 4.2. La estabilidad del monómero de la ATP sintasa está comprometida debida a una mayor labilidad de los componentes del tallo periférico.
  - 4.3. Existe una menor estabilidad o menor capacidad para la formación de oligómeros de la ATP sintasa en forma de dímeros, tetrameros y otros oligómeros superiores.
  - 4.4. La comparación de estas dos líneas de cíbridos demostró que la presencia de la subunidad A6L en el complejo, aunque esté alterada estructuralmente por la presencia de una mutación, es capaz de estabilizar el tallo periférico en el monómero del CV y la implicación de esta subunidad en la formación o estabilización de sus oligómeros.

**5. La variante relativamente común m.9176T>C no parece tener ninguna implicación funcional ni estructural sobre el complejo V y la mutación m.8959G>A es la variante que contribuye prioritariamente al fenotipo,** utilizando un modelo celular de cíbridos portador de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A en el gen *MT-ATP6*.

5.1. No existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros de función mitocondrial analizados entre las células portadoras únicamente de la variante m.9176T>C y células control con el mismo haplogrupo (H) mitocondrial.

5.2. La presencia conjunta de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A produce una disminución tanto de la actividad ATPasa como de la síntesis de ATP por la ATP Sintasa, y el potencial de membrana está preservado.

5.3. disminución de la actividad enzimática en forma de ATPasa del complejo V, disminución de la respiración celular y preservación del potencial de membrana mitocondrial.

5.4. La presencia conjunta de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A conduce a una menor estabilidad del monómero de complejo V, y una ligera disminución de la estabilidad de sus oligómeros.

**6. Se observó un papel destacado de la subunidad a en la biogénesis o estabilidad de la ATP sintasa,** utilizando un modelo celular de cíbridos portador de las variantes m.9176T>C y m.8959G>A en el gen *MT-ATP6*.

En conclusión, los hallazgos de este trabajo de tesis doctoral han permitido profundizar en el conocimiento clínico, genético y molecular de los defectos de complejo V, al asociar nuevos fenotipos clínicos al gen *MT-ATP8* (un gen menos estudiado en patología mitocondrial que el gen *MT-ATP6*), fomentar el debate sobre la patogenicidad de la variante relativamente frecuente asociada a defectos del complejo V *MT-ATP6*:m.9176T>C, y poner de manifiesto la relevancia de la subunidad a y la subunidad A6L de la ATP sintasa en la formación o estabilidad de las formas monoméricas y oligoméricas del complejo V del sistema OXPHOS, a través de modelos celulares derivados de muestras de pacientes portadores de mutaciones en ambas subunidades.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014; **505**: 335–43.
- 2 Allen CA, Van Der Giezen M, Allen JF. Origin, Function, and Transmission of Mitochondria. In: Martin WF, Müller M, eds. *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2007: 39–56.
- 3 Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature* 2010; **467**: 929–34.
- 4 Martin W, Müller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 1998; **392**: 37–41.
- 5 Palade GE. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* 1952; **114**: 427–51.
- 6 Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1555**: 196–203.
- 7 Walther DM, Rapaport D. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2009; **1793**: 42–51.
- 8 Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 2003; **546**: 355–8.
- 9 Castellanos E, Lanning NJ. Phosphorylation of OXPHOS Machinery Subunits: Functional Implications in Cell Biology and Disease. *Yale J Biol Med* 2019; **92**: 523–31.
- 10 Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 878–90.
- 11 O'Donnell JM, Alpert NM, White LT, Lewandowski ED. Coupling of mitochondrial fatty acid uptake to oxidative flux in the intact heart. *Biophys J* 2002; **82**: 11–8.
- 12 Mazunin IO, Levitskii SA, Patrushev MV, Kamenski PA. Mitochondrial Matrix Processes. *Biochemistry (Mosc)* 2015; **80**: 1418–28.
- 13 El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; **1863**: 1539–55.
- 14 Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial protein organization: from biogenesis to networks and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; **20**: 267–84.
- 15 Atamna H, Killilea DW, Killilea AN, Ames BN. Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 14807–12.
- 16 Stumpf DA, Parks JK. Urea cycle regulation: I. Coupling of ornithine metabolism to mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neurology* 1980; **30**: 178–83.
- 17 Zhang P, Lehmann BD, Samuels DC, *et al*. Estimating relative mitochondrial DNA copy number using high throughput sequencing data. *Genomics* 2017; **109**: 457–62.
- 18 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**: 457–65.
- 19 DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; **37**: 222–32.

- 20 Rath S, Sharma R, Gupta R, *et al.* MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res* 2021; **49**: D1541–7.
- 21 McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep* 2018; **6**: 52–61.
- 22 Zinovkina LA. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry (Mosc)* 2018; **83**: 233–49.
- 23 Barrell BG, Bankier AT, Drouin J. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 1979; **282**: 189–94.
- 24 Protasoni M, Zeviani M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. DOI:10.3390/ijms22020586.
- 25 Krebs HA, Kornberg HL, Burton K. A survey of the energy transformations in living matter. *Ergeb Physiol* 1957; **49**: 212–98.
- 26 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; **191**: 144–8.
- 27 Smith RAJ, Hartley RC, Cochemé HM, Murphy MP. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2012; **33**: 341–52.
- 28 Kampjut D, Sazanov LA. The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science* 2020; **370**. DOI:10.1126/science.abc4209.
- 29 Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, *et al.* The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab* 2017; **25**: 128–39.
- 30 Zickermann V, Wirth C, Nasiri H, *et al.* Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* 2015; **347**: 44–9.
- 31 Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 2006; **75**: 69–92.
- 32 Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 2013; **82**: 551–75.
- 33 Dröse S, Brandt U. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. In: Kadenbach B, ed. *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Nuclear-Encoded Genes, Enzyme Regulation, and Pathophysiology*. New York, NY: Springer, 2012: 145–69.
- 34 Devasagayam TPA, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004; **52**: 794–804.
- 35 Nouws J, Nijtmans LGJ, Smeitink JA, Vogel RO. Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options. *Brain* 2012; **135**: 12–22.

- 36 Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Letters*; **n/a**. DOI:<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13995>.
- 37 Sun F, Huo X, Zhai Y, *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 2005; **121**: 1043–57.
- 38 Iwata S, Lee JW, Okada K, *et al.* Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 1998; **281**: 64–71.
- 39 Cooper GM. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. *The Cell: A Molecular Approach 2nd edition* 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/> (accessed April 22, 2021).
- 40 Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, *et al.* The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 1996; **272**: 1136–44.
- 41 Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D, Van den Bogert C. Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem* 1998; **254**: 389–94.
- 42 Galber C, Carissimi S, Baracca A, Giorgio V. The ATP Synthase Deficiency in Human Diseases. *Life* 2021; **11**: 325.
- 43 Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJW. The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, 2008: 1–58.
- 44 Stock D. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science* 1999; **286**: 1700–5.
- 45 Hahn A, Vonck J, Mills DJ, Meier T, Kühlbrandt W. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science* 2018; **360**. DOI:10.1126/science.aat4318.
- 46 He J, Ford HC, Carroll J, *et al.* Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *PNAS* 2018; **115**: 2988–93.
- 47 Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans* 2013; **41**: 1–16.
- 48 Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nat Chem Biol* 2014; **10**: 930–6.
- 49 Cabezon E, Butler PJ, Runswick MJ, Walker JE. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25460–4.
- 50 Song J, Pfanner N, Becker T. Assembling the mitochondrial ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**: 2850–2.
- 51 Kucharczyk R, Zick M, Bietenhader M, *et al.* Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 186–99.
- 52 Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 2012; **35**: 211–25.

- 53 Wittig I, Meyer B, Heide H, *et al.* Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1797**: 1004–11.
- 54 Mayr JA, Havlíčková V, Zimmermann F, *et al.* Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 3430–9.
- 55 Ackerman SH, Tzagoloff A. Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005; **80**: 95–133.
- 56 Thompson K, Mai N, Oláhová M, *et al.* OXA1L mutations cause mitochondrial encephalopathy and a combined oxidative phosphorylation defect. *EMBO Mol Med* 2018; **10**. DOI:10.15252/emmm.201809060.
- 57 Carroll J, He J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. TMEM70 and TMEM242 help to assemble the rotor ring of human ATP synthase and interact with assembly factors for complex I. *PNAS* 2021; **118**. DOI:10.1073/pnas.2100558118.
- 58 Ackerman SH. Atp11p and Atp12p are chaperones for F(1)-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1555**: 101–5.
- 59 Wang ZG, White PS, Ackerman SH. Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria. *J Biol Chem* 2001; **276**: 30773–8.
- 60 Cízková A, Stránecký V, Mayr JA, *et al.* TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Nat Genet* 2008; **40**: 1288–90.
- 61 Vrbacký M, Kovalčíková J, Chawengsaksophak K, *et al.* Knockout of Tmem70 alters biogenesis of ATP synthase and leads to embryonal lethality in mice. *Hum Mol Genet* 2016; **25**: 4674–85.
- 62 Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 2008; **27**: 1154–60.
- 63 Wittig I, Schägger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 2005; **5**: 4338–46.
- 64 Nesci S, Pagliarani A. Emerging Roles for the Mitochondrial ATP Synthase Supercomplexes. *Trends Biochem Sci* 2019; **44**: 821–3.
- 65 Blum TB, Hahn A, Meier T, Davies KM, Kühlbrandt W. Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *PNAS* 2019; **116**: 4250–5.
- 66 Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J* 2018; **41**: 9–20.
- 67 Davies KM, Strauss M, Daum B, *et al.* Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 14121–6.
- 68 Lobo-Jarne T, Pérez-Pérez R, Fontanesi F, *et al.* Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes. *EMBO J* 2020; **39**: e103912.

- 69 Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37861–7.
- 70 Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 2016; **537**: 644–8.
- 71 Gu J, Wu M, Guo R, *et al.* The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 2016; **537**: 639–43.
- 72 Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 1991; **199**: 223–31.
- 73 Timón-Gómez A, Pérez-Pérez R, Nyvltova E, Ugalde C, Fontanesi F, Barrientos A. Protocol for the Analysis of Yeast and Human Mitochondrial Respiratory Chain Complexes and Supercomplexes by Blue Native Electrophoresis. *STAR Protoc* 2020; **1**. DOI:10.1016/j.xpro.2020.100089.
- 74 Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 36562–9.
- 75 Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, *et al.* Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 2013; **340**: 1567–70.
- 76 Hirst J. Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biol* 2018; **16**: 111.
- 77 Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2004; **279**: 36349–53.
- 78 Moreno-Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, *et al.* Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 2012; **15**: 324–35.
- 79 Lopez-Fabuel I, Douce JL, Logan A, *et al.* Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *PNAS* 2016; published online Oct 31. DOI:10.1073/pnas.1613701113.
- 80 Ugalde C, Morán M, Blázquez A, Arenas J, Martín MA. Mitochondrial disorders due to nuclear OXPHOS gene defects. *Adv Exp Med Biol* 2009; **652**: 85–116.
- 81 Craven L, Alston CL, Taylor RW, Turnbull DM. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2017; **18**: 257–75.
- 82 Bannwarth S, Procaccio V, Lebre AS, *et al.* Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *J Med Genet* 2013; **50**: 704–14.
- 83 Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, *et al.* Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2016; **2**: 16080.



- 84 Castro-Gago M, Blanco-Barca MO, Campos-González Y, Arenas-Barbero J, Pintos-Martínez E, Eirís-Puñal J. Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in northwest Spain. *Pediatr Neurol* 2006; **34**: 204–11.
- 85 Diogo L, Grazina M, Garcia P, *et al.* Pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in the Centro region of Portugal. *Pediatr Neurol* 2009; **40**: 351–6.
- 86 Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001; **49**: 377–83.
- 87 Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, *et al.* Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics* 2000; **105**: 598–603.
- 88 Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* 2015; **77**: 753–9.
- 89 Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet* 2018; **391**: 2560–74.
- 90 Franco LVR, Bremner L, Barros MH. Human Mitochondrial Pathologies of the Respiratory Chain and ATP Synthase: Contributions from Studies of *Saccharomyces cerevisiae*. *Life (Basel)* 2020; **10**. DOI:10.3390/life10110304.
- 91 Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999; **52**: 1255–64.
- 92 Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet* 2012; **49**: 578–90.
- 93 Jurkute N, Yu-Wai-Man P. Leber hereditary optic neuropathy: bridging the translational gap. *Curr Opin Ophthalmol* 2017; **28**: 403–9.
- 94 Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, *et al.* Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1659**: 136–47.
- 95 Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F, *et al.* Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy. *Brain* 2007; **130**: 1894–904.
- 96 Distelmaier F, Koopman WJH, van den Heuvel LP, *et al.* Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 2009; **132**: 833–42.
- 97 Reinson K, Kovacs-Nagy R, Öiglanc-Shlik E, *et al.* Diverse phenotype in patients with complex I deficiency due to mutations in NDUFB11. *Eur J Med Genet* 2019; **62**: 103572.
- 98 Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine* 2020; **56**: 102784.
- 99 Ghezzi D, Zeviani M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. *Essays Biochem* 2018; **62**: 271–86.

- 100 Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, *et al.* Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; **11**: 144–9.
- 101 Parfait B, Chretien D, Rötig A, Marsac C, Munnich A, Rustin P. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum Genet* 2000; **106**: 236–43.
- 102 Alston CL, Davison JE, Meloni F, *et al.* Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* 2012; **49**: 569–77.
- 103 Jackson CB, Nuoffer J-M, Hahn D, *et al.* Mutations in SDHD lead to autosomal recessive encephalomyopathy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* 2014; **51**: 170–5.
- 104 Gill AJ. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology* 2018; **72**: 106–16.
- 105 Ohlenbusch A, Edvardson S, Skorpen J, *et al.* Leukoencephalopathy with accumulated succinate is indicative of SDHAF1 related complex II deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2012; **7**: 69.
- 106 Andreu AL, Bruno C, Shanske S, *et al.* Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 1998; **51**: 1444–7.
- 107 Andreu AL, Bruno C, Dunne TC, *et al.* A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol* 1999; **45**: 127–30.
- 108 Haut S, Brivet M, Touati G, *et al.* A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet* 2003; **113**: 118–22.
- 109 Barel O, Shorer Z, Flusser H, *et al.* Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRQ. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 1211–6.
- 110 Baker RA, Priestley JRC, Wilstermann AM, Reese KJ, Mark PR. Clinical spectrum of BCS1L Mitopathies and their underlying structural relationships. *Am J Med Genet A* 2019; **179**: 373–80.
- 111 Visapää I, Fellman V, Vesa J, *et al.* GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 863–76.
- 112 Hinson JT, Fantin VR, Schönberger J, *et al.* Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N Engl J Med* 2007; **356**: 809–19.
- 113 Morán M, Marín-Buera L, Gil-Borlado MC, *et al.* Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat* 2010; **31**: 930–41.
- 114 Rak M, Bénit P, Chrétien D, *et al.* Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Clin Sci (Lond)* 2016; **130**: 393–407.

- 115 DiMauro S, Tanji K, Schon EA. The many clinical faces of cytochrome c oxidase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 2012; **748**: 341–57.
- 116 Zhu Z, Yao J, Johns T, *et al.* SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998; **20**: 337–43.
- 117 Echaniz-Laguna A, Ghezzi D, Chassagne M, *et al.* SURF1 deficiency causes demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 2013; **81**: 1523–30.
- 118 Rodenburg RJT. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 2011; **34**: 283–92.
- 119 Dautant A, Meier T, Hahn A, Tribouillard-Tanvier D, di Rago J-P, Kucharczyk R. ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Front Physiol* 2018; **9**. DOI:10.3389/fphys.2018.00329.
- 120 Rak M, Su CH, Xu JT, Azpiroz R, Singh AM, Tzagoloff A. Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 mRNA by Smt1p. *Mol Biol Cell* 2016; **27**: 919–29.
- 121 Spikes TE, Montgomery MG, Walker JE. Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 23519–26.
- 122 Kühlbrandt W, Davies KM. Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine. *Trends Biochem Sci* 2016; **41**: 106–16.
- 123 Lee J, Ding S, Walpole TB, *et al.* Organization of Subunits in the Membrane Domain of the Bovine F-ATPase Revealed by Covalent Cross-linking. *J Biol Chem* 2015; **290**: 13308–20.
- 124 Gu J, Zhang L, Zong S, *et al.* Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF. 2019; : 9.
- 125 Ganetzky RD, Stendel C, McCormick EM, *et al.* MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. *Hum Mutat* 2019; **40**: 499–515.
- 126 Uziel G, Moroni I, Lamantea E, *et al.* Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; **63**: 16–22.
- 127 Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, *et al.* Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 1992; **50**: 852–8.
- 128 Castagna AE, Addis J, McInnes RR, *et al.* Late onset Leigh syndrome and ataxia due to a T to C mutation at bp 9,185 of mitochondrial DNA. *Am J Med Genet A* 2007; **143A**: 808–16.
- 129 Kabala AM, Lasserre J-P, Ackerman SH, di Rago J-P, Kucharczyk R. Defining the impact on yeast ATP synthase of two pathogenic human mitochondrial DNA mutations, T9185C and T9191C. *Biochimie* 2014; **100**: 200–6.
- 130 Burrage LC, Tang S, Wang J, *et al.* Mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia (MLASA) plus associated with a novel de novo mutation (m.8969G>A) in the mitochondrial encoded ATP6 gene. *Mol Genet Metab* 2014; **113**: 207–12.

- 131 De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, Schoentjes E, Desprechins B. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol* 1995; **13**: 242–6.
- 132 López-Gallardo E, Emperador S, Solano A, *et al.* Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum Mol Genet* 2014; **23**: 6191–200.
- 133 Felhi R, Mkaouar-Rebai E, Sfaihi-Ben Mansour L, *et al.* Mutational analysis in patients with neuromuscular disorders: Detection of mitochondrial deletion and double mutations in the MT-ATP6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; **473**: 61–6.
- 134 Jesina P, Tesarová M, Fornůsková D, *et al.* Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206. *Biochem J* 2004; **383**: 561–71.
- 135 Tang S, Batra A, Zhang Y, Ebenroth ES, Huang T. Left ventricular noncompaction is associated with mutations in the mitochondrial genome. *Mitochondrion* 2010; **10**: 350–7.
- 136 Morava E, Rodenburg RJ, Hol F, *et al.* Clinical and biochemical characteristics in patients with a high mutant load of the mitochondrial T8993G/C mutations. *Am J Med Genet A* 2006; **140**: 863–8.
- 137 Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem* 2000; **275**: 4177–82.
- 138 Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, *et al.* mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Curr Protoc Bioinformatics* 2013; **44**: 1.23.1-26.
- 139 Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: D41–7.
- 140 Jonckheere AI, Renkema GH, Bras M, *et al.* A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy. *Brain* 2013; **136**: 1544–54.
- 141 Perucca-Lostanlen D, Narbonne H, Hernandez JB, *et al.* Mitochondrial DNA variations in patients with maternally inherited diabetes and deafness syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **277**: 771–5.
- 142 Auré K, Dubourg O, Jardel C, *et al.* Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology* 2013; **81**: 1810–8.
- 143 Mkaouar-Rebai E, Kammoun F, Chamkha I, *et al.* A de novo mutation in the adenosine triphosphatase (ATPase) 8 gene in a patient with mitochondrial disorder. *J Child Neurol* 2010; **25**: 770–5.
- 144 Rucheton B, Jardel C, Filaut S, *et al.* Homoplasmic deleterious MT-ATP6/8 mutations in adult patients. *Mitochondrion* 2020; **55**: 64–77.
- 145 Tansel T, Paçal F, Ustek D. A novel ATP8 gene mutation in an infant with tetralogy of Fallot. *Cardiol Young* 2014; **24**: 531–3.

- 146 Ware SM, El-Hassan N, Kahler SG, *et al.* Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J Med Genet* 2009; **46**: 308–14.
- 147 Imai A, Fujita S, Kishita Y, *et al.* Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein. *Int J Cardiol* 2016; **207**: 203–5.
- 148 Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LGJ, *et al.* A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet* 2008; **45**: 129–33.
- 149 Kytövuori L, Lipponen J, Rusanen H, Komulainen T, Martikainen MH, Majamaa K. A novel mutation m.8561C>G in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *J Neurol* 2016; **263**: 2188–95.
- 150 Fragaki K, Chaussenot A, Serre V, *et al.* A novel variant m.8561C>T in the overlapping region of MT-ATP6 and MT-ATP8 in a child with early-onset severe neurological signs. *Mol Genet Metab Rep* 2019; **21**. DOI:10.1016/j.ymgmr.2019.100543.
- 151 Oláhová M, Yoon WH, Thompson K, *et al.* Biallelic Mutations in ATP5F1D, which Encodes a Subunit of ATP Synthase, Cause a Metabolic Disorder. *Am J Hum Genet* 2018; **102**: 494–504.
- 152 Barca E, Ganetzky RD, Potluri P, *et al.* USMG5 Ashkenazi Jewish founder mutation impairs mitochondrial complex V dimerization and ATP synthesis. *Hum Mol Genet* 2018; **27**: 3305–12.
- 153 De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, *et al.* Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet* 2004; **41**: 120–4.
- 154 Diodato D, Invernizzi F, Lamantea E, *et al.* Common and Novel TMEM70 Mutations in a Cohort of Italian Patients with Mitochondrial Encephalocardiomyopathy. *JIMD Rep* 2015; **15**: 71–8.
- 155 Pallotti F, Baracca A, Hernandez-Rosa E, *et al.* Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 2004; **384**: 287–93.
- 156 King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; **246**: 500–3.
- 157 Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ. Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 6562–6.
- 158 Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialopathies. *Redox Biol* 2014; **2**: 619–31.
- 159 Desjardins P, Frost E, Morais R. Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 1163–9.
- 160 Moraes CT, Dey R, Barrientos A. Transmitochondrial technology in animal cells. *Methods Cell Biol* 2001; **65**: 397–412.

- 161 Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, *et al.* Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996; **40**: 663–71.
- 162 Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012; **13**: 134.
- 163 Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, *et al.* The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021; **49**: D1207–17.
- 164 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 5463–7.
- 165 Lentz BR, Lee JK. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol Membr Biol* 1999; **16**: 279–96.
- 166 Andreu AL, Martinez R, Marti R, García-Arumí E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors. *Mitochondrion* 2009; **9**: 242–6.
- 167 Blanco-Grau A, Bonaventura-Ibars I, Coll-Cantí J, *et al.* Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes Brain Behav* 2013; **12**: 812–20.
- 168 Medja F, Allouche S, Frachon P, *et al.* Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 2009; **9**: 331–9.
- 169 Haraux F, Lombès A. Kinetic analysis of ATP hydrolysis by complex V in four murine tissues: Towards an assay suitable for clinical diagnosis. *PLoS One* 2019; **14**: e0221886.
- 170 Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 1983; **130**: 1910–7.
- 171 Davidson SM, Yellon D, Duchon MR. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 2007; **372**: 421–30.
- 172 Picard M, White K, Turnbull DM. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol (1985)* 2013; **114**: 161–71.
- 173 Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- 174 Wickham H, Averick M, Bryan J, *et al.* Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 2019; **4**: 1686.
- 175 Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer-Verlag, 2009 DOI:10.1007/978-0-387-98141-3.
- 176 Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: W296–303.

- 177 Li SC, Goto NK, Williams KA, Deber CM. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6676–81.
- 178 Gray TM, Arnoys EJ, Blankespoor S, *et al.* Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. *Protein Sci* 1996; **5**: 742–51.
- 179 Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, De Vivo D, DiMauro S. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 1995; **38**: 468–72.
- 180 Campos Y, Martín MA, Rubio JC, *et al.* Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology* 1997; **49**: 595–7.
- 181 Larson AA, Balasubramaniam S, Christodoulou J, *et al.* Biochemical signatures mimicking multiple carboxylase deficiency in children with mutations in MT-ATP6. *Mitochondrion* 2019; **44**: 58–64.
- 182 Ng YS, Martikainen MH, Gorman GS, *et al.* Pathogenic variants in MT-ATP6: A United Kingdom-based mitochondrial disease cohort study. *Ann Neurol* 2019; **86**: 310–5.
- 183 Finsterer J, Stöllberger C, Schubert B. Acquired left ventricular hypertrabeculation/noncompaction in mitochondriopathy. *Cardiology* 2004; **102**: 228–30.
- 184 Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LGJ, *et al.* A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *Journal of Medical Genetics* 2007; **45**: 129–33.
- 185 Starikovskaya E, Shalaurova S, Dryomov S, *et al.* Mitochondrial DNA Variation of Leber's Hereditary Optic Neuropathy in Western Siberia. *Cells* 2019; **8**. DOI:10.3390/cells8121574.
- 186 Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Part B, Volume 264 - 1st Edition. <https://www.elsevier.com/books/mitochondrial-biogenesis-and-genetics-part-b/abelson/978-0-12-182165-4> (accessed April 29, 2021).
- 187 Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 2018; **552**: 50–9.
- 188 Carrozzo R, Wittig I, Santorelli FM, *et al.* Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Ann Neurol* 2006; **59**: 265–75.
- 189 Wittig I, Meyer B, Heide H, *et al.* Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2010; **1797**: 1004–11.
- 190 Hermolin J, Fillingame RH. Assembly of F<sub>0</sub> sector of Escherichia coli H<sup>+</sup> ATP synthase. Interdependence of subunit insertion into the membrane. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2815–7.
- 191 Tzagoloff A, Barrientos A, Neupert W, Herrmann JM. Atp10p assists assembly of Atp6p into the F<sub>0</sub> unit of the yeast mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 19775–80.
- 192 Wittig I, Schagger H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1777**: 592–8.

- 193 Celotto AM, Chiu WK, Van Voorhies W, Palladino MJ. Modes of metabolic compensation during mitochondrial disease using the *Drosophila* model of ATP6 dysfunction. *PLoS One* 2011; **6**: e25823.
- 194 Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, *et al.* Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 2013; **155**: 160–71.
- 195 Paumard P, Vaillier J, Couлары B, *et al.* The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 2002; **21**: 221–30.
- 196 Hahn A, Parey K, Bublitz M, *et al.* Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell* 2016; **63**: 445–56.
- 197 Guo H, Bueler SA, Rubinstein JL. Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase. *Science* 2017; **358**: 936–40.
- 198 Skoczeń N, Dautant A, Binko K, *et al.* Molecular basis of diseases caused by the mtDNA mutation m.8969G>A in the subunit a of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2018; **1859**: 602–11.