

Paula Gaudó Pardo

Mutaciones nucleares que afectan al sistema de fosforilación oxidativa

Director/es

Bayona Bafaluy, María Pilar
Montoya Villarroya, Julio

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



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**MUTACIONES NUCLEARES QUE AFECTAN AL
SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

Autor

Paula Gaudó Pardo

Director/es

Bayona Bafaluy, María Pilar
Montoya Villarroja, Julio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Mutaciones nucleares que afectan al sistema de fosforilación oxidativa

Memoria presentada por **Paula Gaudó Pardo**

Graduada en Biotecnología
para optar al Grado de Doctor

Tesis Doctoral dirigida por la Dra. Pilar Bayona Bafaluy
y el Dr. Julio Montoya Villarroya

Zaragoza, septiembre de 2021



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

Dña. Pilar Bayona Bafaluy, Profesora Titular del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

y

D. Julio Montoya Villarroya, Catedrático Emérito del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral **“Mutaciones nucleares que afectan al sistema de fosforilación oxidativa”**, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela, y que ésta se ajusta al plan de investigación y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Zaragoza, Septiembre de 2021

Fdo.: Pilar Bayona Bafaluy

Fdo.: Julio Montoya Villarroya



Este trabajo ha sido financiado con fondos de los proyectos de investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI17/00021, PI17/00166, y PI/1700109), de la Fundación Mutua Madrileña, del Gobierno de Aragón (Grupos Consolidados B33_17R), del programa de crowdfunding (PR194) Precipita-FECYT, FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”, y de la Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI).

La doctoranda ha disfrutado de un contrato como investigadora en proyecto de investigación “Confirmación de patogenicidad de mutaciones en el DNA nuclear asociadas a patología mitocondrial” (212-403) de la Universidad de Zaragoza gracias a la donación de la Asociación de Enfermos con Patología Mitocondrial.

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

Baide-Mairena, H., Gaudó, P., Marti-Sánchez, L., Emperador, S., Sánchez-Montanez, A., Alonso-Luengo, O., Correa, M., Grau, A. M., Ortigoza-Escobar, J. D., Artuch, R., Vázquez, E., Del Toro, M., Garrido-Pérez, N., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Bayona-Bafaluy, M. P., & Pérez-Dueñas, B. (2019). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF6 cause isolated bilateral striatal necrosis and progressive dystonia in childhood. *Molecular genetics and metabolism*, 126(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.01.001>

Iglesias, E., Bayona-Bafaluy, M. P., Pesini, A., Garrido-Pérez, N., Meade, P., Gaudó, P., Jiménez-Salvador, I., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2019). Uridine Prevents Negative Effects of OXPHOS Xenobiotics on Dopaminergic Neuronal Differentiation. *Cells*, 8(11), 1407. <https://doi.org/10.3390/cells8111407>

Pesini, A., Iglesias, E., Bayona-Bafaluy, M. P., Garrido-Pérez, N., Meade, P., Gaudó, P., Jiménez-Salvador, I., Andrés-Benito, P., Montoya, J., Ferrer, I., Pesini, P., & Ruiz-Pesini, E. (2019). Brain pyrimidine nucleotide synthesis and Alzheimer disease. *Aging*, 11(19), 8433–8462. <https://doi.org/10.18632/aging.102328>

Emperador, S., Garrido-Pérez, N., Amezcua-Gil, J., Gaudó, P., Andrés-Sanz, J. A., Yubero, D., Fernández-Marmiesse, A., O'Callaghan, M. M., Ortigoza-Escobar, J. D., Iriondo, M., Ruiz-Pesini, E., García-Cazorla, A., Gil-Campos, M., Artuch, R., Montoya, J., & Bayona-Bafaluy, M. P. (2020). Molecular Characterization of New FBXL4 Mutations in Patients With mtDNA Depletion Syndrome. *Frontiers in genetics*, 10, 1300. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01300>

Gaudó, P., Emperador, S., Garrido-Pérez, N., Ruiz-Pesini, E., Yubero, D., García-Cazorla, A., Artuch, R., Montoya, J., & Bayona-Bafaluy, M. P. (2020). Infectious stress triggers a POLG-related mitochondrial disease. *Neurogenetics*, 21(1), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s10048-019-00593-2>

RESUMEN

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que albergan rutas metabólicas esenciales para la vida. Entre ellas, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que proporciona la mayor parte de la energía útil a las células del cuerpo. Los defectos en su funcionamiento generan las enfermedades de la cadena respiratoria, difíciles de diagnosticar debido a la gran heterogeneidad clínica que presentan los pacientes. La utilización de las técnicas modernas de secuenciación masiva ha permitido identificar variaciones genéticas en el genoma de muchos pacientes. Esto no siempre lleva a un diagnóstico molecular porque la interpretación de las variaciones en el DNA puede resultar muy compleja. En algunos casos afectan a proteínas cuya función no se conoce o no se relaciona con la ruta biológica afectada.

En este trabajo se han estudiado los defectos moleculares causados por mutaciones encontradas en genes nucleares de pacientes diagnosticados con enfermedad mitocondrial, siendo el objetivo principal la obtención de un diagnóstico genético-molecular de estos pacientes. Se han analizado fibroblastos derivados de tres pacientes con mutaciones en los genes *POLG*, *NDUFAF6* y *ATAD3C* respectivamente.

Se describe el caso de una paciente, diagnosticada con enfermedad mitocondrial, con dos mutaciones en heterocigosis compuesta en *POLG*. El estudio clínico, junto con las diferencias in vitro en la cinética de recuperación del mtDNA de las células de control y de paciente, sugieren que los síntomas de enfermedad mitocondrial fueron precipitados por una infección por *Borrelia* y, posiblemente, empeoraron por el tratamiento farmacológico. Este estudio demuestra la importancia de diagnósticos genéticos tempranos de los pacientes y la necesidad de considerar los riesgos y beneficios en la selección de tratamientos farmacológicos para pacientes con sospecha de desórdenes mitocondriales.

A continuación, se describen tres hermanos diagnosticados con el Síndrome de Leigh con dos mutaciones en heterocigosis compuesta en *NDUFAF6*, factor esencial para la maduración y actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones. Los ensayos funcionales de complementación genética permitieron obtener la evidencia conclusiva de la patogenicidad en esta familia.

Por último, se describe el estudio del primer caso de mutaciones en el gen *ATAD3C* en un paciente diagnosticado con enfermedad mitocondrial. La asociación de su fenotipo con las mutaciones es un reto, debido a que existe muy poca información sobre *ATAD3C* en la literatura, podría ser un pseudogén y no hay casos previos descritos. En este trabajo, se ha confirmado que

ATAD3C genera una proteína mitocondrial que se localiza en la membrana mitocondrial interna, que es capaz de oligomerizar de la misma manera que *ATAD3A*, y que puede interaccionar con el complejo que forma *ATAD3A* regulando su función. Estos hallazgos proporcionan un posible mecanismo por el que mutaciones en *ATAD3C* puedan llevar a patología en humanos.

ABREVIATURAS

ADP: adenosín difosfato

ANS: espectro de neuropatía atáxica

APS: persulfato amónico

ATAD3: proteína 3 de la familia ATPasa con dominio AAA

ATP: adenosín trifosfato

AZT: azidotimidina

BSA: albúmina sérica bovina

Ca²⁺: Calcio divalente

CC: dominios de hélice superenrollada

cDNA: DNA complementario

CI: complejo I

CIAP: fosfatasa alcalina

CII: complejo II

CIII: complejo III

CIV: COX, citocromo c oxidasa, complejo IV

CFT: ceftriaxone disodium salt hemi(heptahydrate)

CoQ: coenzima Q, ubiquinona

CS: citrato sintasa

CsCl: cloruro de cesio

CV: ATP sintasa, complejo V

Cyt c: citocromo c

CYC1: citocromo c1, también UQCR4

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DDM: dodecil maltósido

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: deoxinucleósido trifosfato

DT: tiempo de duplicación

DTSSP: 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilo propionato)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ER: retículo endoplasmático

EtBr: bromuro de etidio

FAD: dinucleótido de flavina y adenina oxidado

FADH₂: dinucleótido de flavina y adenina reducido

FBS: suero fetal bovino

FMN: flavin mononucleótido

F₁ y F₀: dominios periférico (F₁) y de membrana (F₀) del complejo V o ATP sintasa.

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GTPasas: guanosina trifosfatasa o trifosfatasas de guanosina

gRNA: guía de RNA

H⁺: protones

H₂O: agua

HDR: sistema de reparación directa

HEK293T: células embrionarias de riñón humano

IMM: membrana mitocondrial interna

IMS: espacio intermembrana

KCN: cianuro de potasio

LB: medio Luria-Bertani

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas

MAM: Membrana de ER Asociada a Mitocondria

MEMSA: ataxia sensorial con miopatía epiléptica mioclónica

mRNA: RNA mensajero

MT-ATP6 y 8: genes mitocondriales que codifican para las subunidades 6 y 8 del complejo V, respectivamente

MT-CO1-3: genes mitocondriales que codifican para las subunidades 1 a 3 del complejo IV

MT-CYB: gen mitocondrial que codifica para el citocromo b (complejo III)

mtDNA: DNA mitocondrial

MT-ND 1-6: genes mitocondriales que codifican para las subunidades 1 a 6 del complejo I

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

NAHR: recombinación homóloga no alélica

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCR: región no codificante

nDNA: DNA nuclear

NDUFAF6 o C8orf38: factor de ensamblaje 6 del complejo de ubiquinona oxidoreductasa

NGR: secuenciación de última generación (next generation sequencing)

NHEJ: sistema de recombinación no homóloga

NTB: Nitro Blue tetrazolium chloride

NTRIs: nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa

O₂: oxígeno

O_H y O_L: orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera, respectivamente

OMM: membrana mitocondrial externa

OXPHOS: sistema de fosforilación oxidativa

pb: pares de bases

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEO: oftalmoplejía externa progresiva

POLG, pol γ: DNA polimerasa γ

PVDF: polifluoruro de vinilideno

qPCR: PCR cuantitativa

RCD: enfermedades de la cadena respiratoria

ROS: especies reactivas de oxígeno

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribosómico

tRNA: RNA de transferencia

RNP: ribonucleoproteínas

RPMI 8826: Células humanas de mieloma múltiple

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

SD: desviación estándar

SDHA-E: subunidades A-E del complejo de succinato deshidrogenasa

SDS: dodecilsulfato sódico

SH-SY5Y: línea celular derivada de un neuroblastoma

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TM: dominio transmembrana

TPK: tampón fosfato

UQCRFS1: Ubiquinol-citocromo c reductase, proteína del hierro azufre, Rieske 1.

UNG: Uracil-N glicosilasa

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABREVIATURAS	III
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Las mitocondrias y su función	3
1.2 El DNA mitocondrial	5
1.3 Los complejos de la cadena de transporte de electrones y su organización	7
1.3.1 Complejo I	7
1.3.2 Complejo II	8
1.3.3 Complejo III	9
1.3.4 Complejo IV	9
1.3.5 Complejo V	10
1.4 Ensamblaje de los supercomplejos respiratorios	10
1.5 Las enfermedades mitocondriales	12
1.5.1 Diagnóstico genético de enfermedad mitocondrial y pruebas de patogenicidad	14
1.6 Estudio de genes nucleares asociados a enfermedad mitocondrial	16
1.6.1 El gen <i>POLG</i> y su asociación con enfermedad mitocondrial	17
1.6.2 El gen <i>NDUFAF6</i> y su asociación con enfermedad mitocondrial	20
1.6.3 El locus génico <i>ATAD3</i> y la enfermedad mitocondrial	23
1.6.4 Terapia para enfermedades mitocondriales	31
2 OBJETIVOS	35
3 CAPITULO I – ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN <i>POLG</i>	39
3.1 Caso clínico	39
3.2 Análisis genético	39
3.3 Estudio del efecto funcional de las mutaciones en <i>POLG</i>	41
3.3.1 Medida de la expresión de transcrito de <i>POLG</i>	41
3.4 Medida de los niveles de DNA mitocondrial	41
3.5.1. Medida de la actividad enzimática del Complejo IV	43
3.6. Estudios de complementación funcional	44

3.6.1.	Medida de la expresión de transcrito de <i>POLG</i> en las líneas generadas	44
3.6.2.	Medida de expresión de <i>POLG</i> mediante Western Blot	45
3.6.3.	Medida de los niveles de DNA mitocondrial	46
3.6.4.	Medida de la cinética de recuperación del DNA mitocondrial tras una depleción severa en fibroblastos de la paciente	47
3.7.	Efecto del AZT sobre la viabilidad celular	48
3.8.	Efectos de la lidocaína y la ceftriaxona en el consumo de oxígeno y la proliferación celular	49
3.9.	Discusión	52
3.10.	Conclusiones	55
4.	CAPITULO II – ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN <i>NDUFAF6</i>	59
4.1.	Caso clínico	59
4.2.	Análisis genético	59
4.3.	Estudio del efecto funcional de las mutaciones en <i>NDUFAF6</i>	60
4.3.1.	Medida de los niveles de ATP mitocondrial	60
4.3.2.	Medida de los niveles de expresión de <i>NDUFAF6</i>	61
4.3.3.	Medida de la actividad y cantidad de complejo I mediante Blue Native	62
4.4.	Estudios de complementación funcional	63
4.4.1.	Medida de los niveles de expresión de <i>NDUFAF6</i>	64
4.4.2.	Determinación de la actividad y la cantidad de complejo I maduro mediante Blue Native-PAGE	65
4.5.	Discusión	67
4.6.	Conclusiones	69
5.	CAPITULO III – ESTUDIO DEL GEN <i>ATAD3C</i>	73
5.1.	Caso clínico	73
5.2.	Análisis genético	73
5.3.	Estudio de la expresión de <i>ATAD3C</i> y comparación con la de <i>ATAD3B</i> y <i>ATAD3A</i>	74
5.3.1.	Expresión de genes <i>ATAD3</i> humanos en tejidos	75
5.3.2.	Medida de la expresión de los transcritos de <i>ATAD3A</i> , <i>ATAD3B</i> y <i>ATAD3C</i> mediante qPCR	75

5.3.3.	Cuantificación de los niveles de expresión de los genes <i>ATAD3A</i> , <i>ATAD3B</i> y <i>ATAD3C</i> en líneas celulares	77
5.4.	Estudio de la expresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C	80
5.4.1.	Estructura primaria de la proteína ATAD3C y analogía con sus parálogos ATAD3A y ATAD3B	83
5.4.2.	Predicción de la estructura terciaria de la proteína ATAD3C y comparación con sus parálogos	85
5.5.	Estudio de la localización subcelular de la proteína ATAD3C en células HEK293T	87
5.5.1.	Determinación de la localización subcelular de ATAD3C	87
5.5.2.	Determinación de la localización submitocondrial de ATAD3C: Mediante rotura por sonicación y mediante extracción alcalina	88
5.5.3.	Determinación de la topología de ATAD3C: Tratamientos con tripsina y proteinasa K	90
5.6.	Detección de ATAD3C mediante LC-MS/MS	95
5.7.	Estudio de las interacciones entre las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C	98
5.7.1.	Estudio de las interacciones entre las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante inmunoprecipitación	98
5.8.	Estudio de interacciones de oligómeros ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en condiciones nativas	103
5.8.1.	Sobreexpresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en fibroblastos	103
5.8.2.	Efecto funcional de la sobreexpresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C	105
5.8.3.	Estudio de la formación de oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante SDS-PAGE	107
5.8.4.	Estudio de la formación de oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante Blue Native-PAGE	110
5.8.5.	Efecto de la sobreexpresión de ATAD3C sobre otros complejos de la membrana mitocondrial, utilizando Blue Native-PAGE	114
5.8.6.	Análisis de la formación de complejos en membrana mediante electroforesis bidimensional	115
5.9.	Estudio de la función mitocondrial en fibroblastos del paciente con mutaciones en ATAD3C	119
5.9.1.	Estudio de la morfología mitocondrial mediante microscopía electrónica	119

5.9.2.	Medida del crecimiento en cultivo y consumo de oxígeno	120
5.9.3.	Medida de los niveles de DNA mitocondrial	122
5.9.4.	Estudio de la expresión de las proteínas ATAD3A y ATAD3B en fibroblastos	123
5.9.5.	Estudio de los complejos de ATAD3A y ATAD3B y de los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial, utilizando Blue Native-PAGE	124
5.10.	Discusión	127
5.11.	Conclusiones	132
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	135
6.1.	Edición del genoma por CRISPR-Cas9	135
6.2.	Estudio de la función mitocondrial de iPSCs derivadas de fibroblastos	135
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	139
7.1.	Cultivos celulares	139
7.1.1.	Líneas celulares	139
7.1.2.	Materiales y medios de cultivo celulares	140
7.1.3.	Siembra y cultivo celular	140
7.1.4.	Mantenimiento de los cultivos celulares	141
7.1.5.	Congelación y descongelación celular	141
7.1.6.	Recuento celular	142
7.1.7.	Tratamiento con fármacos	142
7.1.8.	Análisis y tratamiento de contaminación por <i>Mycoplasma sp.</i>	142
7.1.9.	Estudios de proliferación celular: curvas de crecimiento	143
7.1.10.	Inmunocitoquímica	143
7.1.11.	Fijación de células en cultivo para microscopía electrónica	145
7.1.12.	Generación de partículas virales y transducción de líneas celulares	145
7.1.13.	Inmortalización de cultivo primario	147
7.2.	Cultivos bacterianos	147
7.2.1.	Cultivos bacterianos	147
7.2.2.	Medios de cultivo	148
7.2.3.	Preparación de bacterias competentes	148
7.2.4.	Transformación de bacterias DH5α por choque térmico	148

7.2.5.	PCR de comprobación	149
7.3.	Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos	149
7.3.1.	Aislamiento de DNA total a partir de cultivos celulares	149
7.3.2.	Aislamiento de RNA total a partir de cultivos celulares	150
7.3.3.	Cuantificación de material genético	151
7.3.4.	Retrotranscripción de RNA total	151
7.3.5.	Diseño de oligonucleótidos para amplificaciones por PCR	152
7.3.6.	Amplificación de DNA mediante PCR	153
7.3.7.	Separación electroforética de ácidos nucleicos	154
7.3.8.	Clonaje de productos de PCR	155
7.3.9.	Clonaje de insertos en vector lentiviral	157
7.3.10.	Preparación de muestras para la secuenciación	159
7.3.11.	Mutagénesis dirigida	159
7.3.12.	Sistema <i>Alt-R CRISPR-Cas9</i>	160
7.3.13.	Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real	163
7.3.14.	Cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial por qPCR	168
7.3.15.	Medida de depleción del DNA mitocondrial y cinética de repoblación	169
7.4.	Análisis de proteínas	170
7.4.1.	Preparación de extractos celulares totales	170
7.4.2.	Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método Bradford	170
7.4.3.	Purificación de fracción mitocondrial	171
7.4.4.	Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA	176
7.4.5.	Electroforesis de proteínas	177
7.4.6.	Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	181
7.4.7.	Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot	181
7.4.8.	Tinción de geles con azul de Coomassie	183
7.5.	Análisis de la interacción de proteínas mediante proteómica	183
7.5.1.	Preparación de las muestras	183
7.5.2.	Cromatografía líquida y análisis de espectrómetros de masas	183
7.5.3.	Identificación de proteínas	184

7.6. Estudio funcional del sistema de fosforilación oxidativa	185
7.6.1. Medida de niveles de ATP mitocondrial	185
7.6.2. Medida de actividades enzimáticas de los complejos en espectrofotómetro	186
7.6.3. Medida de actividades enzimáticas de los complejos en gel	188
7.6.4. Consumo de oxígeno en electrodo de alta resolución en células intactas	188
7.7. Análisis estadístico	189
8. BIBLIOGRAFÍA	193
9. ANEXO I – EXTENSIÓN DEL ESTUDIO DEL GEN <i>ATAD3C</i>	217
10. ANEXO II – EXTENSIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS	233

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las mitocondrias y su función

Las mitocondrias, también conocidas como “las centrales energéticas de la célula”, son orgánulos intracelulares cuya principal función es la producción de la mayor parte del adenosín trifosfato (ATP) que necesita la célula y que se utiliza como fuente de energía química (Montoya, 2010). Las mitocondrias se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas, siendo más abundantes en aquellas con mayor requerimiento energético (Cavalier-Smith, 1987). Tienen un origen endosimbiótico y conservan muchos vestigios de sus antepasados bacterianos (Nunnari & Suomalainen, 2012).

Mediante microscopía electrónica se determinó que la mitocondria presenta dos membranas (Palade, 1953): la membrana mitocondrial externa (OMM), que la separa del citoplasma y que es permeable a todas aquellas moléculas inferiores a 10 kDa; y la membrana mitocondrial interna (IMM), que tiene un alto contenido en proteínas y constituye una barrera muy selectiva para el paso de moléculas (Figura 1.1). Esto permite el mantenimiento del gradiente electroquímico de protones, originado por la cadena de transporte de electrones, necesario para la síntesis de ATP.

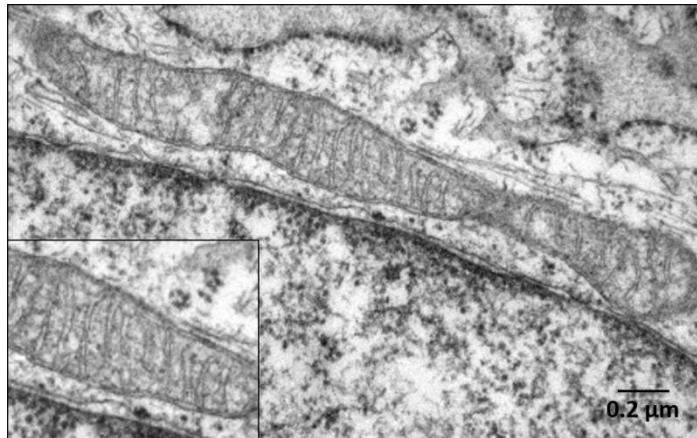


Figura 1.1 Imagen de una mitocondria de fibroblastos humanos de un individuo control (3 años) cultivado en el laboratorio, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.

La membrana mitocondrial externa puede asociarse físicamente al retículo endoplasmático (ER) a través de estrechos contactos llamados MAM (Membrana de ER Asociada a Mitocondria). La distancia mínima descrita entre ambos es de 10-25 nm, y se estima que sólo un 12 % de la superficie de la membrana externa mitocondrial participa en estas asociaciones, que regulan los niveles de calcio en la mitocondria y el transporte lipídico (Giorgi et al., 2009).

La membrana mitocondrial interna posee numerosos pliegues o crestas donde se sitúa el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (*Apartado 1.4*). Asimismo, la membrana interna define dos espacios, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (interior de la IMM). En la matriz mitocondrial se localizan las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA), las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas necesarios en la traducción de las proteínas codificadas en el mtDNA, así como enzimas implicados en otros procesos metabólicos como el ciclo de Krebs o la β -oxidación de los ácidos grasos.

Las mitocondrias poseen un sistema genético propio (DNA mitocondrial, mtDNA), descubierto en los años 60 (Nass & Nass, 1963, Schatz et al., 1964, Sagan, 1967, Schwartz & Dayhoff, 1978), con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene en proteínas funcionales. Sin embargo, éstas no son del todo autónomas, ya que dependen en gran medida del sistema genético nuclear (DNA nuclear, nDNA), tanto para la formación del orgánulo como para su expresión. La mayoría de las proteínas que componen la mitocondria están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma, generalmente en forma de precursores, y finalmente se importan y procesan en el interior de la mitocondria. Por el contrario, el genoma mitocondrial codifica solamente un pequeño número de polipéptidos componentes del sistema OXPHOS y los RNA necesarios para la síntesis de éstos. Así, la biogénesis de las mitocondrias, y en concreto del sistema OXPHOS, representa un caso muy particular en la célula, ya que su formación depende de la contribución de los sistemas genéticos, nuclear y mitocondrial (Montoya, 2010).

Además, la mitocondria interviene en la biosíntesis de otros componentes celulares como pirimidinas, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, grupo hemo y urea (Attardi & Schatz, 1988). También desempeña un papel central en varios procesos celulares, como la diferenciación celular, crecimiento celular (Saxton & Hollenbeck, 2012), la muerte celular programada (apoptosis), la señalización intracelular mediada por calcio (Bianchi et al., 2005) y por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Turrens, 2003).

El sistema OXPHOS es el encargado de la producción del ATP dentro de la mitocondria. Este sistema está localizado en la membrana mitocondrial interna y formado por los complejos multiproteicos (complejo I, II, III y IV), la ATP sintasa y los transportadores móviles de electrones (coenzima Q y citocromo c). En el metabolismo catabólico de la célula se producen NADH y FADH₂ que son oxidados por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El NADH cede electrones al complejo I mediante la reducción de la ubiquinona (CoQ) a ubiquinol, mientras que el complejo II usa FAD como cofactor liberando electrones directamente a la CoQ para formar ubiquinol. El

ubiquinol es reoxidado por el complejo III, el cual manda electrones al citocromo c, que los cede al complejo IV que reduce el oxígeno molecular para obtener H₂O como producto final.

Los complejos I, III y IV usan la energía liberada por el flujo de electrones para translocar protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (IMS). De este modo, se genera un gradiente electroquímico, el cual también se conoce como fuerza protón motriz, que se utiliza para importar proteínas y Ca²⁺ a la mitocondria, para generar calor y para sintetizar ATP dentro de la matriz mitocondrial, partiendo de ADP + Pi mediante la ATP sintetasa (complejo V) (D. C. Wallace et al., 2010).

Las mitocondrias son altamente dinámicas. En la célula, forman una red tubular que varía bastante en los diferentes organismos y tejidos. A diferencia de otros orgánulos de la célula, las mitocondrias no pueden ser generadas *de novo*, sino que proliferan por el crecimiento y la división de los orgánulos preexistentes. En las mitocondrias son habituales las dinámicas de fusión y fisión, mecanismos estrechamente controlados para procurar un equilibrio correcto y mantener la morfología mitocondrial o para adaptar estos orgánulos a las condiciones fisiológicas cambiantes. Estos procesos son dirigidos por GTPasas (H. Lee & Yoon, 2016; Sugiura et al., 2014).

1.2 El DNA mitocondrial

Las mitocondrias, aparte del núcleo, son los únicos orgánulos en la célula animal que poseen su propio material genético, el DNA mitocondrial. El mtDNA humano es una molécula circular de doble cadena, cerrada y superenrollada de 16569 pares de bases (pb) (Anderson et al., 1981), que se localiza en la matriz mitocondrial. Las moléculas de DNA mitocondrial están asociadas a proteínas con las que forman unos complejos denominados nucleoides (Garrido et al., 2002; Legros et al., 2004). Además, el mtDNA es un genoma multicopia, con un rango de 100 copias en el esperma a más de 100000 copias en los ovocitos maduros (Craven et al., 2017). Sin embargo, el mtDNA constituye solamente entre un 0,3 y un 0,5 % del DNA celular total.

El DNA mitocondrial en humanos contiene información para solamente 37 genes: 2 de RNA ribosómico (rRNA 12S y 16S), 22 de RNA de transferencia (tRNA), y 13 genes que codifican para proteínas del sistema OXPHOS (siete polipéptidos del CI, uno del CIII, tres del CIV y dos del CV). Estos genes se distribuyen heterogéneamente entre las dos cadenas del mtDNA, que por su diferente contenido en bases guanina y timina pueden separarse utilizando gradientes alcalinos de CsCl (cloruro de cesio) (Kasamatsu & Vinograd, 1974), dando lugar a la cadena pesada (*heavy*, H) y ligera (*light*, L). La cadena pesada contiene información para los dos rRNAs, 14 tRNAs y 12 polipéptidos, mientras que la cadena ligera sólo contiene 9 genes: 8 tRNAs y la subunidad ND6 del complejo I

(Figura 1.2). El resto de proteínas requeridas para mantener y expresar el mtDNA son codificadas por el genoma nuclear, son traducidas por ribosomas citoplasmáticos y transportadas a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas (D. Wallace, 2005). El DNA mitocondrial contiene una región no codificante (*non-coding region*, NCR), pequeña zona de unas 1100 pb en la que se localiza el origen de replicación de la hebra pesada (O_H), e incluye secuencias importantes para la regulación de su replicación y transcripción (Craven et al., 2017; Nicholls & Minczuk, 2014).

Una de las características más llamativas del mtDNA es la organización extremadamente compacta de los genes que codifica, en la cadena pesada los genes se disponen uno a continuación del otro sin, o con solo de 1 a 3, nucleótidos intermediarios.

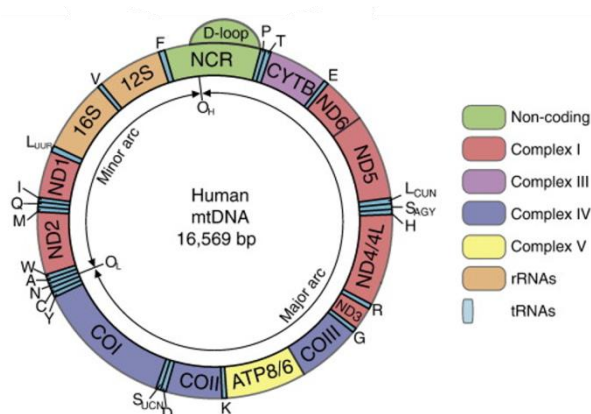


Figura 1.2 Organización del genoma mitocondrial humano, figura modificada de (Nicholls & Minczuk, 2014). Los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera, O_H y O_L , respectivamente, dividen el genoma en regiones designadas como el “arco principal” (“major arc”) y el “arco menor” (“minor arc”). Muchas moléculas de mtDNA incorporan una tercera hebra lineal que cubre una gran porción de la región no codificante (NCR, en verde), formando una estructura de triple cadena, conocido como bucle de desplazamiento (D-loop). En rojo, morado, azul y amarillo se observan los genes que codifican para las 13 proteínas del sistema OXPHOS. En naranja, los genes de los dos rRNAs (12S y 16S). En azul celeste, se pueden observar los genes de los 22 tRNAs mitocondriales.

El mtDNA presenta una tasa de mutación espontánea que es entre 10 y 20 veces superior a la del DNA nuclear. Este hecho se podría explicar por la elevada producción de radicales de oxígeno que se originan constantemente en la mitocondria y que dañan a un DNA con información genética muy compacta, que no está protegido por histonas, y en el que los mecanismos de reparación parecen ser insuficientes (Montoya et al., 2009). La carga acumulativa de múltiples mutaciones raras adquiridas que afectan la mayoría del mtDNA podrían perjudicar la función mitocondrial (Smigrodzki et al., 2004).

Además, se han descrito numerosos genes nucleares implicados en el mantenimiento del mtDNA. Como el gen que codifica para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa γ (*POLG*), enzima encargada de replicar el DNA mitocondrial (Montoya et al., 2012).

1.3 Los complejos de la cadena de transporte de electrones y su organización

El sistema de fosforilación oxidativa está situado en la membrana interna de la mitocondria y consta de dos procesos. Uno de ellos es el transporte de electrones que llevan a cabo los complejos multiproteicos que forman la cadena respiratoria. El otro proceso es la síntesis de ATP por quimiósmosis, que está acoplada al primero, y es realizado por la ATP sintasa.

1.3.1 Complejo I

La NADH-ubiquinona oxidorreductasa o complejo I (CI) es el primer complejo enzimático y el mayor punto de entrada de electrones a la cadena de transporte de electrones, que se encarga de catalizar la oxidación de NADH para reducir ubiquinona a ubiquinol. Por cada dos electrones transferidos de NADH a ubiquinona, cuatro protones son expulsados de la matriz mitocondrial, de este modo contribuyen a la generación de la fuerza protón motriz a través de la membrana interna necesaria para sintetizar ATP en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Perales-Clemente et al., 2010, Baradaran et al., 2013).

En mitocondrias de mamíferos, el complejo I mitocondrial tiene 44 subunidades (Rodenburg, 2016) y nueve grupos prostéticos, un flavin mononucleótido (FMN) y ocho grupos de hierro-azufre. Siete subunidades integrales de membrana están codificadas por el DNA mitocondrial y son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales (Christian & Spremulli, 2012). Las 37 subunidades restantes están codificadas por el DNA nuclear, y son sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos e importadas al orgánulo (Wiedemann et al., 2004).

La masa molecular del complejo I es de 1 MDa. La NADH ubiquinona oxidorreductasa tiene una estructura en forma de L con un brazo hidrofóbico embebido en la membrana interna y el otro orientado hacia la matriz (Hofhaus et al., 1991; Vinothkumar et al., 2014). El ensamblaje del complejo I ocurre de manera modular con la participación de numerosos factores de ensamblaje. Brevemente y siguiendo la Figura 1.3, el módulo Q se integra con el módulo ND1 y ambos se asocian con el módulo ND2. Los módulos ND4 y ND5 se asocian e integran a continuación con los módulos Q/ND1/ND2 para formar el estado intermediario tardío. Después, el módulo N y NDUFAF2 se asocian con el estado intermediario tardío para formar el complejo I totalmente ensamblado. El factor de ensamblaje NDUFAF6 participa en las primeras etapas del ensamblaje del complejo I, regulando la biogénesis de la subunidad mitocondrial ND1 (Andrews et al., 2013; Formosa et al., 2018; Guerrero-Castillo et al., 2017; Signes & Fernandez-Vizarra, 2018).

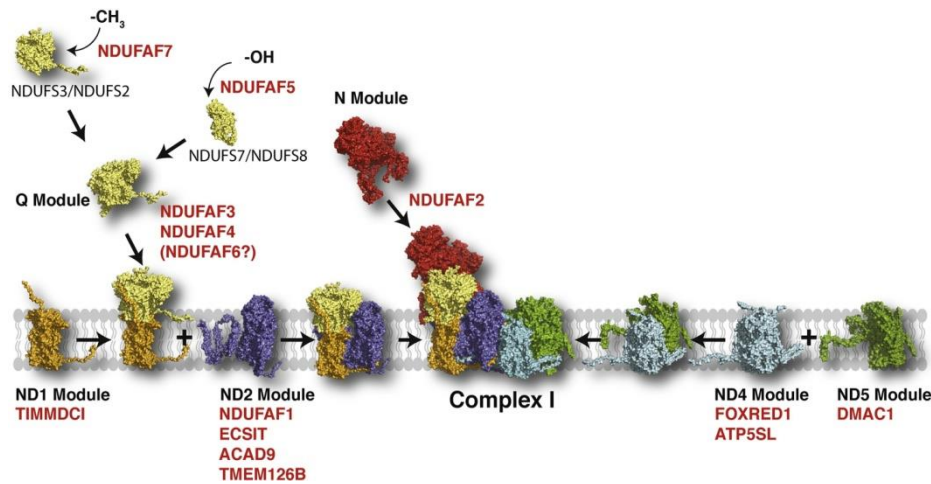


Figura 1.3 El ensamblaje del complejo I mitocondrial, figura de (Formosa et al., 2018). Las subunidades del complejo I se ensamblan en módulos antes de unirse para formar el complejo funcional en asociación con los complejos III y IV.

1.3.2 Complejo II

El complejo II, o succinato deshidrogenasa, es un enzima del ciclo de Krebs que cataliza la oxidación del succinato a fumarato. Éste transfiere electrones desde FADH₂ a la ubiquinona. La succinato deshidrogenasa se localiza en la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembrana y está compuesta por cuatro subunidades: SDHA, SDHB (ambas forman el sitio catalítico), SDHC y SDHD (permiten que se localice en la IMM) (Hägerhäll, 1997). Este complejo no bombea protones y, es el único que no contiene ninguna subunidad codificada por el mtDNA (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018) (Figura 1.4).

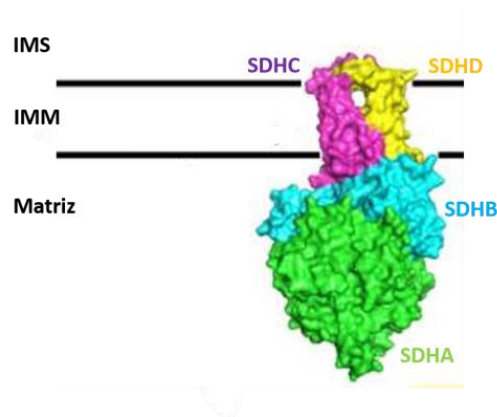


Figura 1.4 Estructura del complejo II de la cadena de transporte de electrones, modificada de (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018). El complejo II está formado por las subunidades SDHA, SDHB, SDHC y SDHD. IMS: espacio Intermembrana. IMM: membrana mitocondrial interna.

1.3.3 Complejo III

El complejo III, citocromo c reductasa o ubiquinol-citocromo-c oxidorreductasa, transfiere electrones desde la ubiquinona al citocromo c. Este proceso se lleva a cabo con el bombeo de cuatro protones al espacio intermembrana. Estructuralmente el complejo III es un dímero simétrico ($CIII_2$), cada monómero está compuesto por tres subunidades catalíticas *MT-CYB* (citocromo b), *CYC1* y *UQCRFS1* (proteína Fe-S Rieske) y siete subunidades adicionales. Solamente la subunidad *MT-CYB* está codificada por el DNA mitocondrial (Iwata et al., 1998) (Figura 1.5).

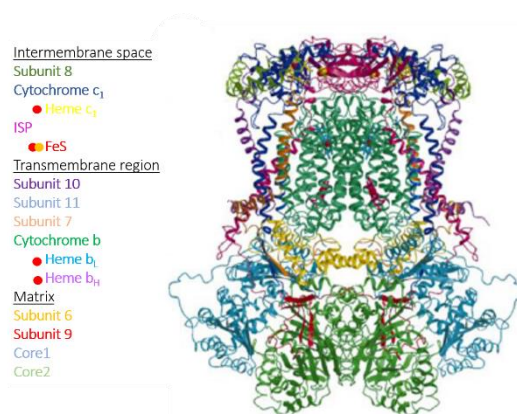


Figura 1.5 Estructura dimérica del complejo respiratorio mitocondrial III de corazón bovino de (Iwata, 1998). En la columna de la izquierda se enumeran las subunidades que forman parte del $CIII_2$.

1.3.4 Complejo IV

El complejo IV, o citocromo c oxidasa, es el último complejo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y cataliza la oxidación del citocromo c y la reducción de oxígeno a agua, acoplado con la translocación de cuatro protones. Este complejo está formado por 14 subunidades, tres de ellas forman el centro catalítico y están codificadas por el mtDNA, *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3* (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018) (Figura 1.6).

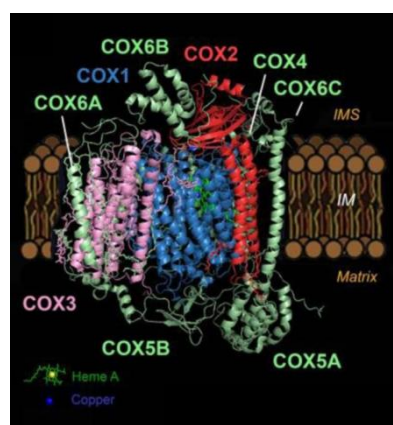


Figura 1.6 Estructura del citocromo c oxidasa mitocondrial, modificada de (Timón-Gómez et al., 2017). El CIV se encuentra anclado a la membrana mitocondrial interna. Se indican las subunidades que lo componen.

1.3.5 Complejo V

El complejo V, o ATP sintasa, es un complejo enzimático multímero, que utiliza el gradiente electroquímico de protones generado por la cadena de transporte de electrones entre el espacio intermembrana y la matriz, para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi).

El complejo consiste en dos dominios funcionales (F_1 y F_0) que están conectados por un tallo. El dominio F_0 de la ATP sintasa, embebido en la membrana, actúa como un poro de protones que los transporta desde el espacio intermembrana a la matriz y dirige la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico al dominio F_1 que es donde se forma el ATP. La energía se transfiere de una parte a otra mediante un mecanismo de motor rotatorio (Stock et al., 1999).

Como se representa en la Figura 1.7, para formar este complejo se necesita el ensamblaje de tres módulos preformados: el dominio F_1 (formado por varias subunidades, entre ellas 3 subunidades α), el anillo c_8 (anillo compuesto por ocho copias de la subunidad c, y que forma parte del dominio F_0) y el tallo periférico (formado por las subunidades OSCP, F_6 , b, y d). Dos de las subunidades que forman el dominio F_0 están codificadas por el mtDNA, *MT-ATP6* y *MT-ATP8*. El resto de los componentes del complejo V están codificados en el nDNA (Jonckheere et al., 2012).

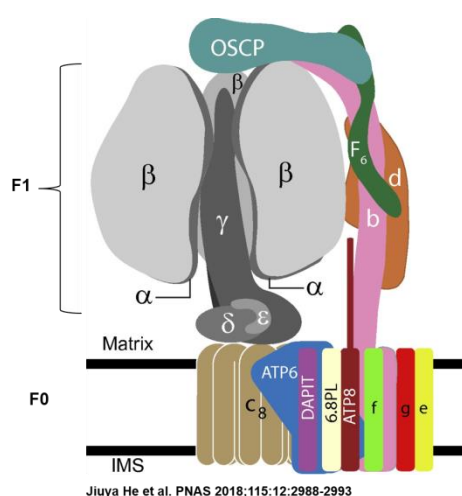


Figura 1.7 Organización de las subunidades en la ATP sintasa monomérica en la mitocondria de mamíferos, modificada de (He et al., 2018). IMS: espacio intermembrana.

1.4 Ensamblaje de los supercomplejos respiratorios

Los complejos de la cadena respiratoria se asocian entre ellos formando estructuras superiores ordenadas, las cuales se han denominado supercomplejos. El respirasoma se define como la asociación de los complejos I, III₂ y IV, y es la unidad funcional capaz de transferir electrones del NADH al O₂. Aparte del respirasoma, otros supercomplejos que se encuentran en células y tejidos

humanos, cuando se solubilizan las membranas mitocondriales con detergentes suaves, son el I + III₂ y III₂ + IV. La asociación de los complejos en supercomplejos hace que sea más eficiente el transporte de electrones. Originalmente esto se explicaba a través de la canalización de sustrato y mediante la segregación de la cadena respiratoria mitocondrial en dos grupos distintos de CoQ. Sin embargo, estas hipótesis se han cuestionado repetidamente. Otra ventaja funcional propuesta incluye la reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y el uso de los supercomplejos como plataformas para el ensamblaje y estabilización de los complejos de la cadena respiratoria I, III₂ y IV (Acín-Pérez et al., 2008; Fernández-Vizarra et al., 2021; Fernandez-Vizarra & Zeviani, 2020; Lapuente-Brun et al., 2013).

Como se ha mencionado previamente, los complejos de la cadena respiratoria, incluyendo la ATP sintasa, se localizan a lo largo de los pliegues o crestas presentes en la membrana mitocondrial interna con un perfil de distribución solapada. La morfología de las crestas mitocondriales es importante desde un punto de vista bioenergético, debido a que las crestas incrementan la superficie de la IMM y la cantidad de cadena de transporte de electrones mitocondrial, aumentando la capacidad de producción de ATP por la fosforilación oxidativa (Enríquez, 2016), además se cree que este aumento se da por la disminución de la distancia entre la translocación de ADP/ATP y el sitio de síntesis de ATP (Cogliati et al., 2016). La disposición de la ATP sintasa en la zona en la que se curva la cresta dentro de la matriz con los otros complejos localizados a lo largo de ambos lados de las crestas parece fundamental para la creación del gradiente de protones, el cual acumula protones en el lado cóncavo de la cresta (Cogliati et al., 2016) (Figura 1.8).

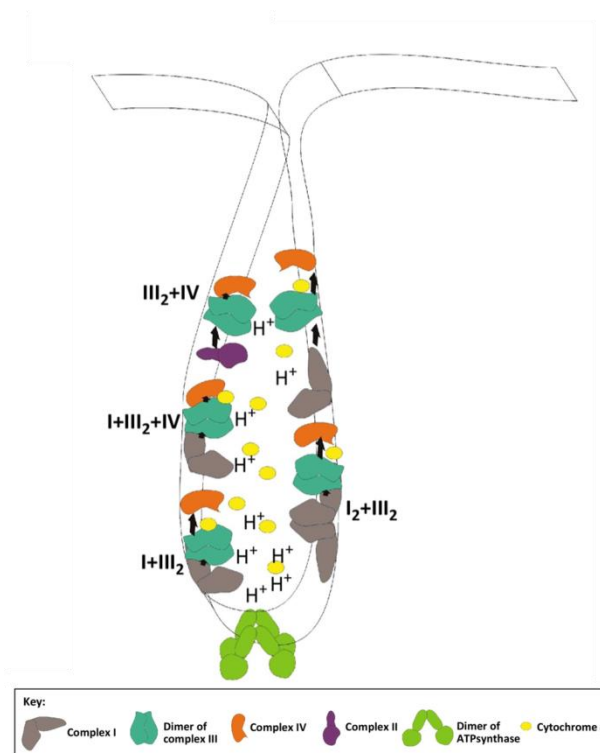


Figura 1.8 Representación esquemática del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) organizada en una cresta, adaptada de (Cogliati et al., 2016). Los diferentes complejos están ensamblados en diferentes supercomplejos con posiciones muy dinámicas a lo largo de la membrana de la cresta. Los dímeros de la ATP sintasa están organizados en la zona en que se curva la cresta a continuación del resto de complejos de la cadena y el citocromo c que se mantienen dentro de la cresta. En esta situación, la cadena de transporte de electrones trabaja eficientemente y el gradiente de protones se acumula en la curvatura de la cresta, donde la ATP sintasa lo puede usar.

1.5 Las enfermedades mitocondriales

El término enfermedad mitocondrial se refiere a un grupo clínicamente heterogéneo de desórdenes mitocondriales. Debido a que las mitocondrias están presentes en todas las células del organismo a excepción de los glóbulos rojos, los síntomas clínicos resultantes pueden presentarse en órganos aislados o en múltiples órganos (enfermedad multisistémica); muy a menudo ocurre en órganos con una gran demanda de energía, como son el cerebro, los músculos esqueléticos y el corazón. Los síntomas clínicos pueden aparecer en la fase neonatal, en la infancia o en la edad adulta (Craven et al., 2017). El diagnóstico es complicado debido a que numerosos desórdenes mitocondriales carecen de correlación entre genotipo-fenotipo (Alston et al., 2017). Además, muchos fenotipos pueden ser causados por defectos que involucran numerosos genes, como ocurre con el Síndrome de Leigh, que es un desorden neurodegenerativo progresivo que aparece en la infancia y es el fenotipo clínico más común visto en enfermedades mitocondriales pediátricas, el cual puede ser causado por mutaciones en al menos 80 genes diferentes (Craven et al., 2017).

Los dos genomas (nDNA y mtDNA) pueden contribuir a la aparición de la patología de las enfermedades mitocondriales. Se estima que aproximadamente 1136 proteínas son requeridas para la función mitocondrial (Rath et al., 2021), la mayor parte de ellas están codificadas por el DNA nuclear (son traducidas en ribosomas citosólicos y posteriormente importadas a la mitocondria), y solamente 13 están codificadas por el DNA mitocondrial. Aproximadamente 150 proteínas mitocondriales están directamente involucradas en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP; otros componentes del mitoproteoma que afectan al sistema OXPHOS, incluyen proteínas involucradas en el ensamblaje de complejos, el mantenimiento y la expresión del mtDNA, la síntesis de proteínas en el organelo, y la dinámica mitocondrial (Craven et al., 2017) (Figura 1.9).

Las mutaciones en genes codificados en el DNA mitocondrial siguen una herencia estrictamente materna, debido a que el mtDNA paterno se elimina activamente después de la fertilización del ovocito mediante una endonucleasa mitocondrial (Sutovsky et al., 2002). Frecuentemente, las mutaciones patogénicas en el DNA mitocondrial afectan a una porción de moléculas de mtDNA, una condición llamada heteroplasmia (Alston et al., 2017). El nivel de heteroplasmia puede variar en los tejidos afectados, e incluso, entre las células de un mismo tejido (Naviaux, 2000) y, en algunos casos, puede cambiar con el tiempo (Larsson & Clayton, 1995). Las mutaciones más severas, en general, se encuentran en estado heteroplásmico, ya que un estado homoplásmico mutante podría ser letal (cuando todas las moléculas del mtDNA tienen el mismo genotipo) (Leonard & Schapira, 2000). Igualmente, pueden aparecer patologías por una disminución considerable de los niveles del mtDNA (depleción de mtDNA) (Morten et al., 2007).

Por otra parte, se ha descrito que mutaciones en genes nucleares pueden causar enfermedad mitocondrial con patrones de herencia autosómicos dominantes, autosómicos recesivos o ligados al cromosoma X. Las consecuencias patológicas de las mutaciones en el nDNA que afectan la mitocondria son variadas e incluyen defectos en el mantenimiento del mtDNA, la traducción del mtDNA y en la homeostasis mitocondrial. Los defectos en el mantenimiento del mtDNA pueden deberse a mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas involucradas en la replicación del mtDNA o en genes que codifican proteínas que controlan la replicación o la síntesis de los dNTP. Como consecuencia, pueden desarrollarse anomalías del mtDNA, como una disminución en el número de copias del mtDNA (depleción mitocondrial) o múltiples deleciones del mtDNA. Las mutaciones en genes nucleares que codifican para proteínas con un papel esencial en procesos mitocondriales manifiestan una gran variedad de síndromes clínicos similares a los desórdenes mitocondriales relacionados con el mtDNA (Gorman et al., 2016).

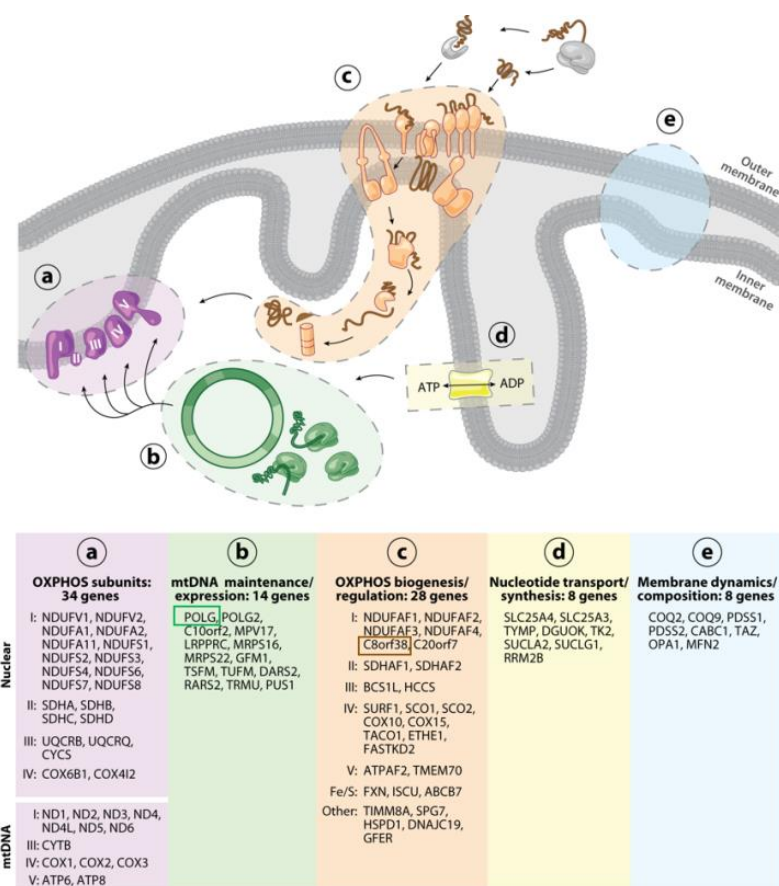


Figura 1.9 Rutas biológicas de enfermedades de la cadena respiratoria, de (Calvo & Mootha, 2010). En la tabla se recoge una lista de genes que codifican para 92 proteínas que se ha demostrado que son causa de alguna enfermedad en la cadena respiratoria, se incluyen 79 genes codificados por el núcleo (entre ellos POLG y C8orf38 (NDUF16)) y 13 codificados por el mtDNA. Son genes asociados con los complejos específicos (I-V) o la biogénesis de Fe/S. No se han añadido a la lista los 2 genes rRNA y los 22 tRNA que también están relacionados con enfermedades relacionadas con la cadena respiratoria.

1.5.1 Diagnóstico genético de enfermedad mitocondrial y pruebas de patogenicidad

Los trastornos de la fosforilación oxidativa actualmente carecen de terapias curativas que modifiquen la enfermedad. La falta de opciones terapéuticas para los pacientes se debe, en parte, a la complejidad de estas enfermedades. No hay un gran entendimiento de los mecanismos patogénicos de las enfermedades y, tampoco existen modelos de enfermedad adecuados. Por lo tanto, una comprensión mucho más profunda de los mecanismos fisiopatológicos es absolutamente necesaria para desarrollar enfoques terapéuticos racionales (Pitceathly et al., 2021).

Diversas mutaciones en diferentes genes relacionados con el sistema de fosforilación oxidativa pueden causar el mismo fenotipo, sin embargo, la misma mutación puede causar un rango de fenotipos diferentes. A pesar de que mutaciones en genes relacionados con el sistema OXPHOS básicamente comprometen su función, los mecanismos de enfermedad son mucho más complejos, haciendo confusa la relación entre el genotipo y el fenotipo (Schon et al., 2020).

Una biopsia de músculo esquelético puede ser extremadamente útil para realizar análisis histoquímicos y bioquímicos. A partir de una biopsia de la piel, se pueden aislar los fibroblastos, que en cultivo pueden recapitular la deficiencia identificada en la fosforilación oxidativa en el músculo esquelético, y pueden ser una fuente vital para asignar patogenicidad a nuevas mutaciones. En el caso del diagnóstico de enfermedad mitocondrial de aparición en etapa adulta, el estudio mediante la histoquímica de músculo esquelético y la valoración de las actividades del complejo IV y la succinato deshidrogenasa (complejo II) son de gran utilidad. Dependiendo de los resultados de los análisis, se pueden realizar investigaciones genéticas más profundas que involucren la secuenciación de genes específicos (Gorman et al., 2016). Una vez que se ha estudiado al paciente, se debería testar a los familiares de una manera menos invasiva, usando muestras de DNA bucales, de orina o sangre.

Por otro lado, los biomarcadores convencionales usados para apoyar el diagnóstico de enfermedad mitocondrial en la clínica son mayormente intermediarios metabólicos, enzimas específicos o productos del final del metabolismo anaeróbico de la glucosa, resultado de la deficiencia de la fosforilación oxidativa. Entre esos marcadores se encuentran, el lactato, piruvato, la creatina quinasa, alanina, timidina y desoxiuridina, acilcarnitinas y ácidos orgánicos (Gorman et al., 2016). También se incluyen en la lista de marcadores, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) y el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) (Montero et al., 2016).

Actualmente, el diagnóstico genético de los desórdenes OXPHOS se realiza aplicando las técnicas de secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), que son particularmente efectivas para condiciones heterogéneas porque permiten examinar simultáneamente un gran número de genes. Debido al pequeño tamaño del genoma mitocondrial, normalmente se secuencian en pacientes con un diagnóstico clínico de enfermedad mitocondrial y así se excluyen defectos en el mtDNA antes de analizar los genes nucleares. Estas técnicas no sólo identifican defectos en el mtDNA sino que también dan una medida aproximada de la heteroplasmia (Craven et al., 2017). Sin embargo, a pesar de las ventajas de utilizar NGS, mediante análisis masivo de exomas se ha visto que algunas variantes genéticas detectadas mediante NGS, que supuestamente causan enfermedad, son demasiado comunes en la población para ser la causa de la patología (Lek et al., 2016).

Numerosas variantes causantes de enfermedad son muy raras o solamente están presentes en un paciente o en una familia, por tanto, un análisis estadístico de frecuencia relativa carece de suficiente poder para probar definitivamente una relación causal. En estos casos, la interpretación depende de la evidencia de múltiples fuentes como son el tipo de variante, la localización de la variante en el gen, el estudio de la familia, el estudio funcional, y la predicción informática. Si a una

variante que no causa enfermedad se le asigna como causante en un paciente, se impedirá la oportunidad futura de identificar la causa real de la enfermedad, y como resultado, el paciente podría no recibir nunca un diagnóstico correcto. Los diagnósticos falsos tienen un gran impacto en los pacientes, en otros miembros de la familia, y en la planificación familiar (Jian Wang & Shen, 2014). Se han desarrollado diversas herramientas de predicción de variantes funcionales para distinguir variantes patogénicas de las variantes benignas, pero todavía están lejos de ser perfectas (Jun Wang et al., 2021).

Por lo tanto, además de la secuenciación de última generación, se requiere de una validación funcional significativa para confirmar la patogenicidad. La conexión entre el diagnóstico y la investigación es fundamental para continuar expandiendo la lista de variantes patogénicas conocidas y, simultáneamente, mejorar el conocimiento de la biología mitocondrial (Thompson et al., 2020). Por ejemplo, las pruebas funcionales que resultan concluyentes son las obtenidas de modelos celulares que comparten el mismo ambiente y fondo genético que el modelo con la mutación patológica (Bayona-Bafaluy et al., 2020). Otras formas de evaluar una mutación concreta en el DNA nuclear en un fondo genético controlado son la sobreexpresión de un gen mutante en células controles para generar el fenotipo patológico, o la sobreexpresión de un gen silvestre en células mutantes para corregir el fenotipo patológico (complementación genética). Estos experimentos son las pruebas de referencia para confirmar patogenicidad (Thompson et al., 2020).

A pesar de esto, todavía existen pacientes, como los que tienen un inicio tardío de la enfermedad, o condiciones autosómicas dominantes, cuyo diagnóstico es un reto. Y la variación clínica de las enfermedades mitocondriales, todavía lo hace más difícil. Por tanto, un entendimiento más profundo de los mecanismos fisiopatológicos es absolutamente necesario con el fin de desarrollar alcances terapéuticos racionales y, además, ser capaces de luchar contra este grupo de desórdenes que, a pesar de ser individualmente raros, colectivamente afectan a uno de cada 5000 individuos de la población (Schon et al., 2020). También, el intercambio de competencias y conocimientos entre médicos, genetistas y bioquímicos es un prerrequisito para obtener un diagnóstico válido (Sperl et al., 2020).

1.6 Estudio de genes nucleares asociados a enfermedad mitocondrial

En esta tesis se han estudiado los defectos moleculares causados por mutaciones encontradas en genes nucleares en pacientes diagnosticados con enfermedad mitocondrial, siendo el objetivo principal la obtención de un diagnóstico genético-molecular para estos pacientes. Se han estudiado fibroblastos derivados de tres pacientes con mutaciones en los genes *POLG*, *NDUFA6* y *ATAD3C* respectivamente.

1.6.1 El gen *POLG* y su asociación con enfermedad mitocondrial

Numerosas mutaciones en el gen *POLG*, que codifica para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa gamma mitocondrial, se han asociado con enfermedad mitocondrial.

1.6.1.1 Estructura y función de la DNA polimerasa γ

La DNA polimerasa gamma (pol γ) es la responsable de replicar el DNA mitocondrial en la mitocondria, por tanto, es importante en el mantenimiento del mtDNA y para el suministro de energía a la célula. La reducción de sus actividades conduce a la depleción del mtDNA y a la deficiencia del metabolismo celular.

La pol γ de mamíferos es un complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad catalítica de 140 kDa (codificada por *POLG* en el locus cromosomal 15q25), que posee actividad polimerasa y actividad correctora de errores, y dos subunidades accesorias de 55 kDa que forman un dímero (codificadas por *POLG2* en el locus cromosomal 17q24.1), el cual incrementa la procesividad de la enzima y la unión al DNA (Y. S. Lee et al., 2009). La subunidad catalítica contiene un dominio exonucleasa en el extremo N-terminal, con motivos esenciales para su actividad, conectado por una región de enlace con un dominio polimerasa en el extremo C-terminal, que se compone de tres subdominios, el pulgar, la palma y los dedos (Kasiviswanathan et al., 2009) (Figura 1.10).

El gen *POLG* se transcribe en el núcleo celular, se traduce en el citosol, y la enzima resultante se transporta a través de las membranas mitocondriales externa e interna hasta la matriz donde, junto con otras proteínas, forma parte de la maquinaria de replicación del DNA mitocondrial (Saneto & Naviaux, 2010).

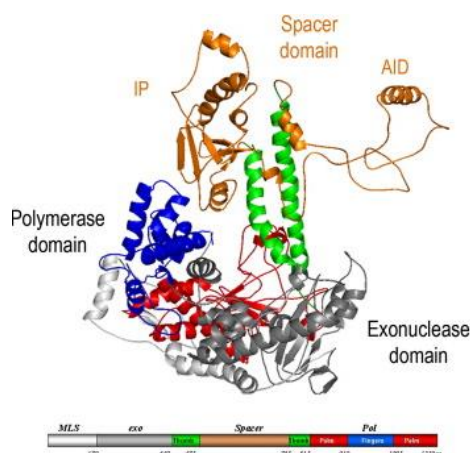


Figura 1.10 Estructura de la DNA polimerasa gamma (POLG), imagen de (Y. S. Lee et al., 2009). El dominio polimerasa muestra una configuración de “mano derecha” con los dominios del dedo pulgar (verde), la palma (rojo) y los dedos (azul) y el dominio exonucleasa (gris). El dominio espaciador (naranja) presenta una única estructura que está dividida en dos subdominios. Además, los dominios se muestran en una forma lineal donde el dominio N-terminal contiene los residuos 1-170; el dominio exonucleasa (exo), 171-440; el dominio espaciador (spacer), 476-785; y el dominio polimerasa (pol), 441-475 y 786-123.

1.6.1.2 Enfermedad causada por mutaciones en *POLG*

Las primeras mutaciones en *POLG* causantes de enfermedad se identificaron en 2001. El primer caso fue una oftalmoplejía externa progresiva (PEO, OMIM 258450, 157640) (Van Goethem et al., 2001). Desde entonces, se han identificado más de 200 mutaciones en el gen *POLG* asociadas a enfermedad mitocondrial (<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>) (Figura 1.11). Entre estas enfermedades mitocondriales se encuentran el espectro de miocerebrohepatopatía infantil (MCHS), el síndrome de Alpers-Huttenlocher (OMIM 203700), la ataxia sensorial con miopatía epiléptica mioclónica (MEMSA) y el espectro de neuropatía atáxica (ANS, OMIM 607459) (Cohen & Naviaux, 2010; Saneto & Naviaux, 2010; Stumpf et al., 2013).

Las mutaciones patogénicas pueden afectar la actividad de la polimerasa, la fidelidad de la replicación y la formación del holoenzima (Y. S. Lee et al., 2009). Entre estas se incluyen mutaciones que causan enfermedad con una herencia autosómica dominante o recesiva que siguen la genética Mendeliana clásica (Saneto & Naviaux, 2010).

Un ejemplo de mutación autosómica dominante en *POLG* es la sustitución Y955C en *POLG*, que afecta al dominio polimerasa, es responsable del desarrollo de la oftalmoplejía externa progresiva (PEO). A pesar de darse en heterocigosis, esta sustitución causa una presentación clínica severa. La enzima defectuosa que porta esta mutación conserva menos del 1 % de la actividad de la polimerasa, mostrando una disminución severa en la procesividad (Stumpf et al., 2013).

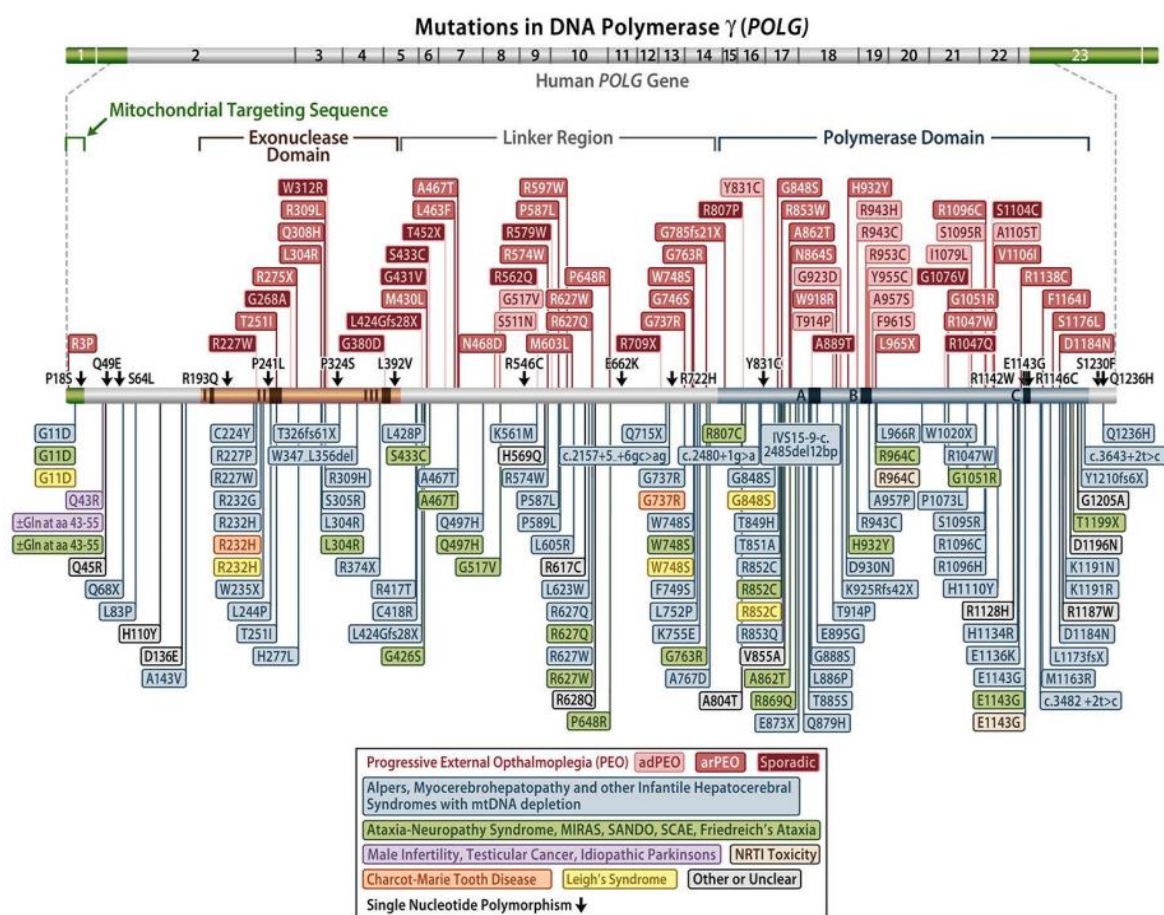


Figura 1.11 Mutaciones patológicas en POLG (de <http://tools.niehs.nih.gov/polg/>).

1.6.1.3 Diagnóstico y ecogenética de la enfermedad de POLG

La identificación de las mutaciones en *POLG* que causan enfermedad es compleja porque el locus del gen *POLG* es altamente polimórfico. Los pacientes presentan un rango de solapamiento de síntomas con múltiples órganos involucrados, el fenotipo clínico habitualmente se expresa en los sistemas nerviosos central y periférico, musculoesquelético y gastrointestinal (Saneto & Naviaux, 2010; Stumpf et al., 2013; Tang et al., 2011). Los síntomas tienen diferentes grados de severidad y momento de aparición, siendo la etapa más frecuente la infancia o adolescencia. También, pueden ser dependientes de la epigenética o de factores ambientales (Stumpf et al., 2013). Bajo ciertas condiciones, un genotipo particular de *POLG* puede permanecer silenciado por largos periodos o hasta de por vida. Sin embargo, si cambian las condiciones, el genotipo puede llevar a enfermedad (Saneto & Naviaux, 2010; Stewart et al., 2011).

Por tanto, los factores ambientales, como infecciones o tratamientos farmacológicos, pueden precipitar la aparición de la enfermedad relacionada con mutaciones en *POLG*, situación

conocida con el término “ecogenética”. La enfermedad puede verse desencadenada por una infección, como ejemplo, se ha descrito que la infección por el Herpesvirus 6 desenmascará el fenotipo de una mutación en *POLG* en dos niños, contribuyendo potencialmente a un deterioro clínico más rápido (Al-Zubeidi et al., 2014). O también puede verse desencadenada por el uso de fármacos, como las terapias antivirales basadas en los análogos de los deoxinucleótidos que se administran para inhibir la síntesis del DNA viral por su transcriptasa reversa (NRTIs), pero que, como efecto secundario, inhiben a la pol y mitocondrial. Un tipo de NRTIs es la azidotimidina (AZT) que induce la depleción del mtDNA (Arnaudo et al., 1991; Lewis & Dalakas, 1995; Lim & Copeland, 2001). La polimerasa y humana es más susceptible que las DNA polimerasas nucleares por la inhibición de ciertos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTIs) (Y. S. Lee et al., 2009).

Por lo tanto, se necesita un diagnóstico adecuado para identificar enfermedades relacionadas con *POLG*, que evalúe la edad de presentación, la asociación bioquímica, los análisis de neuroimagen y se confirme su patogenicidad con estudios de complementación genética (Stumpf et al., 2013).

1.6.2 El gen *NDUFAF6* y su asociación con enfermedad mitocondrial

1.6.2.1 *Función y localización de NDUFAF6*

La proteína *NDUFAF6* (codificada por *NDUFAF6* o *C8orf38*) es un factor de ensamblaje esencial para la maduración y la actividad del complejo I. Participa en las primeras etapas del ensamblaje, cuando se ensamblan el módulo Q con el ND1 y, se ha asociado con la biogénesis de la subunidad codificada por el mtDNA, p.MT-ND1. La disminución de su expresión mediante RNAi lleva a reducir hasta un 80 % los niveles de actividad del complejo I (Pagliarini et al., 2008). La proteína *NDUFAF6* humana está asociada a la membrana mitocondrial interna localizándose en la cara de la matriz de la mitocondria (McKenzie et al., 2011).

1.6.2.2 *Mutaciones en NDUFAF6 y síndrome de Leigh*

El complejo I tiene un papel importante en las reacciones redox. También es la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno en la célula (Brand et al., 2004). La deficiencia del complejo I es el desorden más frecuente en el sistema OXPHOS, causado por mutaciones en subunidades codificadas por el DNA nuclear o mitocondrial (Nouws et al., 2011). Las patologías más comunes asociadas a mutaciones en genes del complejo I son la neuropatía óptica hereditaria Leber (OMIM 535000), miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios como derrame cerebral (OMIM 540000) y el síndrome de Leigh (OMIM 256000; Loeffen et al., 2000) (Mitchell et al., 2006).

Hasta la fecha se han descrito 25 pacientes (18 no relacionados) con mutaciones en el gen *NDUFAF6* (Johnstone et al., 2020). 14 pacientes (10 no relacionados) de ellos fueron diagnosticados con el Síndrome de Leigh (Tabla 1.1). Por consiguiente, el gen *NDUFAF6* se ha establecido como un gen asociado al Síndrome de Leigh.

La primera mutación encontrada en *NDUFAF6* se detectó en dos hermanos (un niño y una niña) nacidos de padres consanguíneos y diagnosticados con el Síndrome de Leigh (McKenzie et al., 2011; Pagliarini et al., 2008). Ambos pacientes portaban la mutación c.296A>G (p. Gln99Arg) en homocigosis. Con 7 y 10 meses de edad respectivamente, comenzaron a mostrar crisis localizadas en la mano derecha, disminución en los movimientos y fuerza, ataxia y un incremento de la rigidez. La niña falleció con tres años por un paro cardiorrespiratorio, mientras que el niño cumplió los 22 meses de edad (Pagliarini et al., 2008). En mitocondrias aisladas de fibroblastos de la niña, los niveles de complejo I fueron prácticamente indetectables y se mostró una biogénesis defectuosa de la subunidad p.MT-ND1 codificada por el mtDNA. La complementación con la versión silvestre de *NDUFAF6* recuperó los niveles del complejo I y los niveles de la subunidad p.MT-ND1, confirmando que la mutación en *NDUFAF6* era la causa del defecto en el complejo I en la paciente (McKenzie et al., 2011).

El síndrome de Leigh es una enfermedad neurodegenerativa devastadora. En muchos de los casos, en los primeros dos años de vida se presenta retardo psicomotor en combinación con signos de disfunción del bulbo raquídeo o extrapiramidal y acidemia láctica, usualmente en un período de aumento de estrés, como una infección. Otras manifestaciones incluyen síntomas neurológicos (atrofia óptica, ataxia, disfagia, distonía, deficiencia respiratoria, apatía y polineuropatía) en combinación o no con características dismórficas, anomalías endocrinas, hipertricosis, poca estatura, anomalías cardíacas o problemas gastrointestinales, diabetes, vómitos, anemia o problemas renales. Los pacientes fallecen normalmente en los primeros años de vida, como consecuencia de un fallo respiratorio causado por una disfunción en el bulbo raquídeo, que puede ir acompañada de un aumento de la debilidad muscular (Josef Finsterer, 2008). Hasta la actualidad, el síndrome de Leigh se ha asociado con mutaciones en al menos 80 genes, tanto mitocondriales como nucleares, demostrando su heterogeneidad genética (Craven et al., 2017). De momento, no se ha encontrado ningún tratamiento disponible para este desorden devastador, aunque varios estudios han descrito posibles tratamientos para algunos pacientes (Pfeffer et al., 2013). El diagnóstico genético es esencial para este desorden genéticamente heterogéneo, para conseguir un futuro tratamiento personalizado basado en el gen afectado (Bianciardi et al., 2016).

Tabla 1.1 Agrupamiento de los pacientes publicados hasta la fecha en función del tipo de mutación que presentan en *NDUFAF6*. AD: herencia autosómica dominante, AR: herencia autosómica recesiva; +/-: bialélico (homocigoto o heterocigoto compuesto). SL: Síndrome de Leigh. MC: citopatología mitocondrial. SF: Síndrome de Fanconi. Fb: fibroblastos.

Pacientes no relacionados	Mutaciones	Herencia	Deficiencia CI	Edad en la publicación/Diagnóstico	Cita
1 (consanguinidad)	c.296A>G (p.Gln99Arg) c.296A>G (p.Gln99Arg)	AR	P1: reducción del 36 % en músculo, 14 % en Fb y 20 % en hígado P2: reducción 14 % en Fb	P1 † 34 meses P2 1,8 años SL	(McKenzie et al., 2011; Pagliarini et al., 2008)
1	c.226T>C (p.Ser76Pro) c.805C>G (p.His269Asp)	AR	Reducción, < 30% en Fb	Días; SL	(Kohda et al., 2016)
1	c.371T>C (p.Ile124Thr) c.206A>T (p.Asp69Val)	AR	Reducción, < 30% en Fb	2 meses; SL	
1	c.805C>GC (p.His269Asp) c.371T>C (p.Ile124Thr)	AR	Reducción, < 40% en Fb	6 años; SL	
1	c.820A>G (p.Arg274Gly) c.820A>G (p.Arg274Gly)	AR	Reducción, < 30% en Fb	17 meses; MC	
3	c.532G>C (p.Ala178Pro) C.420+784C>T (p.?.; retención de intrón 124 nucleótidos)	AR	A1: reducción, 42 % en músculo y 38 % en Fb. A2: niveles normales B: reducción, 25 % en Fb. C: niveles normales	Entre 3 – 11 años; SL	(Bianciardi et al., 2016; Catania et al., 2018)
1	c.337C>T c.265G>A	AR	No disponible	48 meses; SL	(F. Fang et al., 2017)
1	c.371T>C (p.Ile124Thr) c.554_558delTTCTT (p.Tyr187AsnfsTer65)	AR	P1 y P2: Reducción en músculo, no cuantificada P3: reducción en Fb, no cuantificada	Entre 6 – 11 años; SL	(Baide-Mairena et al., 2019)
1	c.371T>C (p.Ile124Thr) c.420+2dup	AR	No hay reducción: 126 % de actividad CI en Fb	Adulto; SL	(Johnstone et al., 2020)
7	c.298-768T>C c.298-768T>C	AR	Reducción de CI en pulmón y Fb en dos pacientes analizados	22-56 años († 5/10 pacientes); SF	(Hartmannová et al., 2016)

1.6.3 El locus génico *ATAD3* y la enfermedad mitocondrial

El gen *ATAD3* (*ATPase family AAA domain containing 3*) está altamente conservado en eucariotas superiores. En la mayoría de los organismos se encuentra una única copia de este gen. Sin embargo, en primates, la familia del gen *ATAD3* incluye tres parálogos: *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C*, que han evolucionado recientemente por duplicación de un ancestro común. En el genoma humano, los tres genes están situados en tándem en el cromosoma 1p36.33 (Figura 1.12) (Harel et al., 2016).

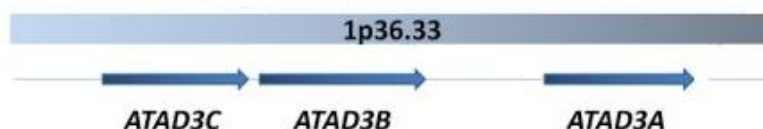


Figura 1.12 *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* están codificados por diferentes genes localizados en regiones que no se solapan en el cromosoma 1 (1p36.33). Figura modificada de (Harel et al., 2016).

Tanto *ATAD3A* como *ATAD3B* contienen 16 exones, mientras que, *ATAD3C* presenta 12 exones. La falta de los primeros cuatro exones hace que *ATAD3C* carezca de los primeros 70 aminoácidos de la forma ancestral *ATAD3A*, sin embargo, el resto de la secuencia tiene una homología del 87 % con la de *ATAD3A*. *ATAD3B* es un parólogo muy cercano de *ATAD3A*, la mayor diferencia con la secuencia de *ATAD3A* es una extensión en el extremo carboxilo de 62 aminoácidos, enriquecido en aminoácidos hidrofóbicos y residuos de cisteína; el resto de la secuencia de *ATAD3B* tiene una homología con *ATAD3A* del 93 % (H. Y. Fang et al., 2010; Li & Rousseau, 2012; Merle et al., 2012).

La ausencia de 4 exones en *ATAD3C* respecto a *ATAD3A*, y la baja expresión detectada del gen, ha llevado a considerarlo un pseudogén (Harel et al., 2016, Yap et al., 2021). Sin embargo, la proteína *ATAD3C* se ha detectado mediante proteómica dirigida en la línea celular HEK293T (Garin-Muga et al., 2016), y mediante proteómica cuantitativa en tejido pulmonar y amígdala dentro de un estudio masivo incluyendo 29 tejidos humanos (D. Wang et al., 2019).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia y sub-fraccionamiento celular, en diferentes tipos celulares, se ha descrito la localización de las proteínas *ATAD3A* y *ATAD3B* en la membrana mitocondrial interna. En el caso de *ATAD3A*, la región amino terminal está localizada en el espacio intermembrana, mientras que la región carboxilo terminal está en la matriz. La gran homología de las secuencias primarias de *ATAD3A* y *ATAD3B* (93 %) sugiere que tengan la misma localización en la membrana. Sin embargo, *ATAD3B* contiene una secuencia rica en cisteínas en el extremo carboxilo terminal que podría conferirle diferentes propiedades bioquímicas (Merle et al., 2012). La localización subcelular de la proteína *ATAD3C* no se ha estudiado hasta la fecha. A pesar de que se caracteriza por carecer de los primeros aminoácidos del dominio amino terminal que contienen sus

parálogos, sí que comparte con ellos un dominio transmembrana además del dominio AAA⁺ ATPasa (H. Y. Fang et al., 2010).

En cuanto a la función de *ATAD3*, se ha comprobado que es esencial para el desarrollo embrionario en *C. elegans*, *Drosophila* y ratón, indicando que está asociado a la proliferación y diferenciación (Hoffmann et al., 2009). También se ha visto que *ATAD3* está implicado en muchas funciones celulares, incluyendo la actividad mitocondrial (Gilquin, Taillebourg, et al., 2010), la biosíntesis lipídica, el crecimiento celular y, también se ha relacionado con cáncer (Peralta et al., 2018). Además, la sobreexpresión del ortólogo en *Drosophila* de *Atad3 (bor)* resulta en un incremento del número de mitocondrias elongadas, sugiriendo un papel en la fusión y fisión mitocondrial (Harel et al., 2016). *ATAD3* se acumula en los contactos retículo endoplasmático-mitocondria de células esteroideogénicas, donde parece que *ATAD3* regula el suministro y transporte del colesterol a la mitocondria (Baudier, 2018; Issop et al., 2015).

En humanos, la función de *ATAD3A* se ha estudiado más que en el resto de sus parálogos. Hay evidencias de que *ATAD3A* juega un papel en el mantenimiento de las crestas mitocondriales y en la replicación y segregación del mtDNA. Estudios in vitro relacionan *ATAD3A* con el mantenimiento del DNA mitocondrial (Gerhold et al., 2015; Holt et al., 2007), la biosíntesis y el mantenimiento de los lípidos, la dinámica mitocondrial y la preservación de los contactos retículo endoplasmático con la mitocondria (Peralta et al., 2019). Distintas estrategias de purificación de nucleoides han encontrado *ATAD3A*, e incluso *ATAD3B*, entre las proteínas asociadas (Bogenhagen et al., 2008; He et al., 2007).

1.6.3.1 Estructura de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C*

ATAD3A, *ATAD3B* y *ATAD3C* se caracterizan por presentar un dominio AAA⁺ ATPasa en su extremo carboxilo (Gilquin, Taillebourg, et al., 2010) formado por varios motivos conservados que se explicarán, en términos generales, a continuación.

- El dominio AAA⁺ ATPasa

En la célula se encuentran numerosas proteínas pertenecientes a la familia de las AAA⁺ ATPasas (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares), que son proteínas capaces de unir e hidrolizar nucleósidos trifosfato y, transformar la energía obtenida en actividades biológicas. Éstas forman parte las ATPasas tipo Walker, definidas por sus motivos conservados Walker A (o bucle P) y Walker B, los cuales median la unión de ATP y su hidrólisis.

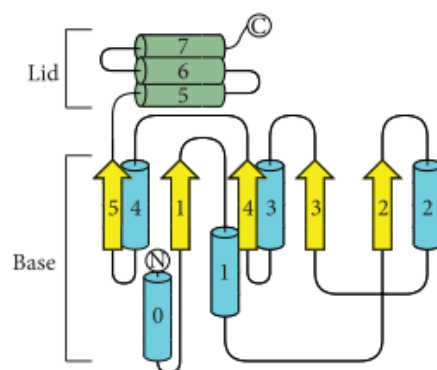


Figura 1.13 Dominio AAA+ caracterizado por una topología de α - β - α con un dominio carboxilo formado por una cubierta de hélices α . Las hélices y las láminas del dominio se muestran en cilindros azules y en flechas amarillas, respectivamente, y el dominio de hélices de la cubierta se representa en cilindros verdes. Figura de (Miller & Enemark, 2016).

Los dominios AAA⁺ ATPasa abarcan de 200 a 250 aminoácidos con una estructura secundaria formada por hélices α y láminas β . Su estructura central está constituida por láminas β en el orden de $\beta_5 - \beta_1 - \beta_4 - \beta_3 - \beta_2$, rodeadas de hélices α a ambos lados. Muchas proteínas AAA⁺ ATPasas tienen varias hélices α en el extremo carboxilo del dominio, que forman una tapa o cubierta sobre el sitio de unión de nucleótidos e intervienen en la mediación de interacciones de subunidades en complejos de proteínas oligoméricas (Figura 1.13). La posición y el plegamiento de esta cubierta de hélices α es, a menudo, dependiente de nucleótido (Miller & Enemark, 2016).

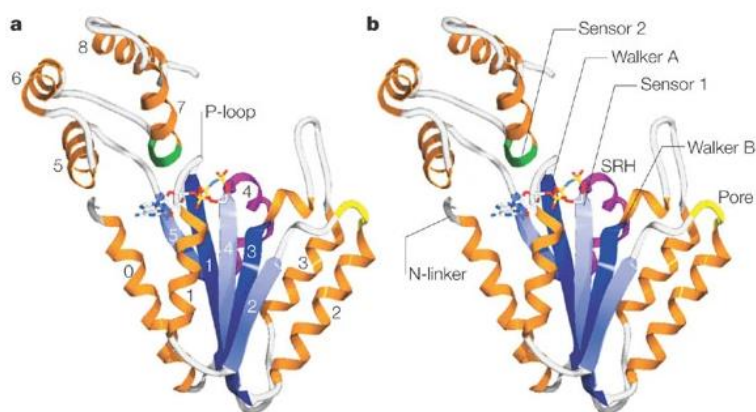
El dominio AAA⁺ contiene elementos clave en la secuencia primaria que establecen la familia AAA⁺ ATPasa (Figura 1.14).

- **Motivos Walker A y Walker B:** Se trata de dos secuencias (Walker et al., 1982), cuyos residuos son fundamentales para la unión e hidrólisis del ATP. El motivo Walker A interacciona directamente con el fosfato γ de una molécula de ATP y, está compuesto por los residuos GXXXXGK[T/S], donde X es cualquier aminoácido y el residuo localizado en el extremo carboxilo del motivo es una treonina (T) o una serina (S). Además, la lisina (K) es un residuo esencial de la secuencia del Walker A; se ha comprobado que mutaciones en esta posición eliminan la unión al nucleótido e inactivan la proteína AAA⁺. Por su parte, el motivo Walker B forma contactos con nucleótidos, está involucrado en la unión de metales y en la catálisis de ATP. Está caracterizado por la secuencia hhhhD[D/E], donde h representa cualquier residuo hidrofóbico y los dos aminoácidos del extremo carboxilo son un aspartato (D), que coordina al magnesio requerido para la hidrólisis del ATP y, un glutamato (E), que es la base catalítica que activa la molécula de agua para el ataque nucleofílico del fosfato γ del ATP durante su hidrólisis (Hanson & Whiteheart, 2005).

- **Segunda región de homología (SRH).** Las proteínas AAA ATPasas son una subfamilia de la familia AAA⁺ ATPasas, caracterizadas por la presencia de un motivo muy conservado en el dominio ATPasa

denominado como la segunda región de homología (SRH). La SRH está formada por el elemento estructural **sensor 1**, que incluye una posición conservada de un residuo polar, predominantemente de asparagina o treonina. Debido a la conformación del dominio, está físicamente localizado entre los motivos Walker A y Walker B y, se ha descrito que trabaja junto con el Walker B para promover el ataque nucleofílico en el fosfato γ del ATP mediante una molécula de agua; también podría coordinar los cambios conformacionales entre subunidades. La mayoría de las proteínas AAA⁺ conservan un residuo de arginina, denominado **dedo de arginina**, que se localiza orientado hacia el bolsillo de unión a ATP del monómero adyacente en un anillo hexamérico, ayudando a estabilizar el ATP durante la hidrólisis. Se ha demostrado que las mutaciones en el residuo de arginina afectan la hidrólisis de nucleótidos y/o la propagación de los cambios conformacionales dependientes de la hidrólisis en hexámeros. Además, las proteínas de la subfamilia AAA también tienen conservados dos residuos más de arginina, una justo después del Walker B y otra en la SHR. En el extremo carboxilo terminal, la mayor parte de las proteínas AAA⁺ tienen un subdominio formado por hélices α adicionales que funciona como una cubierta en el bolsillo de unión a ATP y que media la interacción entre los monómeros de la proteína. En este subdominio, se localiza el **sensor 2**, normalmente se trata de un residuo de arginina que interacciona directamente con el γ -fosfato de ATP (Erzberger & Berger, 2006; Hanson & Whiteheart, 2005; Miller & Enemark, 2016; Neuwald et al., 1999). Curiosamente este aminoácido no se conserva en las subfamilia AAA (Teru Ogura et al., 2004).

- **N-linker:** En el extremo amino terminal del dominio AAA⁺ se localiza la hélice α_0 , que presenta una secuencia conservada llamada N-linker. Esta región forma parte del bolsillo de unión de nucleótidos y conecta el dominio AAA⁺ ATPasa a otros dominios de una proteína. Se trata de un dominio flexible y podría, por tanto, originar los cambios dependientes de nucleótido a otras partes de la proteína AAA⁺ (Hanson & Whiteheart, 2005; Miller & Enemark, 2016).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.14 Representación de la estructura de cristal del dominio AAA⁺ de NSF103 (Código de acceso de Protein Data Bank 1D2N) (Figura de (Hanson & Whiteheart, 2005)). **A.** Las posiciones de los elementos estructurales se muestran utilizando el sistema de (Erzberger & Berger, 2006), y se indica la posición del bucle P. **B.** Se representan las posiciones aproximadas de los elementos clave en la misma estructura que se muestra en el apartado A. Se sitúa un análogo de nucleótido (AMP-PNP) coordinado por el Mg²⁺.

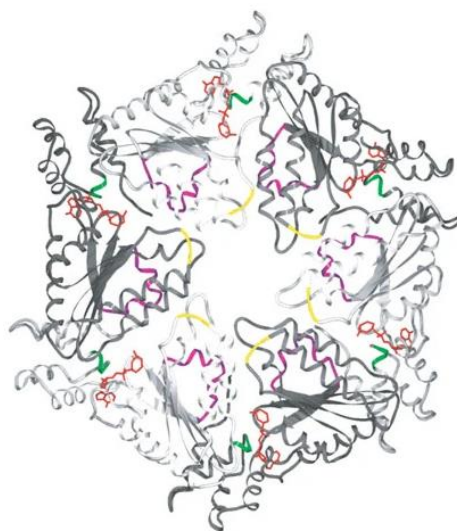
El dominio Walker A se localiza entre la lámina $\beta 1$ y la hélice $\alpha 1$, el dominio Walker B desde la $\beta 3$ hasta el comienzo de la hélice $\alpha 1$. El dedo de arginina se puede encontrar desde el principio de la hélice $\alpha 4$ a la lámina $\beta 5$. El sensor 1 se sitúa en el giro conectando la lámina $\beta 4$ y la hélice $\alpha 4$, y el sensor 2 en el dominio de hélices α , cerca del comienzo de la hélice $\alpha 7$. Por último, el N-linker se ubica en la hélice $\alpha 0$.

1.6.3.2 Oligomerización de proteínas con dominios AAA⁺ ATPasa

Una característica común de todas las proteínas AAA⁺ ATPasas descritas es que se ensamblan en oligómeros, generalmente en hexámeros, descritos como su forma biológicamente activa. Las moléculas de ATP interaccionan con interdominios formados por dos monómeros adyacentes (Erzberger & Berger, 2006; T Ogura & Wilkinson, 2001). La unión de ATP es necesaria para que pueda unirse la molécula sustrato de la AAA⁺ ATPasa (Hanson & Whiteheart, 2005).

La configuración hexamérica proporciona características únicas a las proteínas AAA⁺. Por tanto, el posicionamiento de los sitios de unión a ATP en la interrelación entre subunidades del holoenzima permite uniones directas (por la segunda región de homología) o indirectas (por el sensor 2) entre los sitios de unión de nucleótidos de subunidades adyacentes. Además, todas las proteínas AAA⁺ hexaméricas tienen una cavidad central o poro que está formado por residuos de cada subunidad; siendo de gran interés porque los sustratos se translocan a través de él. El giro entre la lámina $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$ proporciona la mayor parte de la superficie del poro y, los tres aminoácidos conservados en este giro (aromático-hidrofóbico-glicina) tienen un papel en la función de numerosas proteínas de esta familia. Específicamente, mutaciones en estos residuos afectan la unión de los sustratos y el proceso, sin perturbar la oligomerización o, en muchos casos, la actividad ATPasa (Hanson & Whiteheart, 2005) (Figura 1.15).

La oligomerización de las ATPasas se ha estudiado mediante diferentes técnicas bioquímicas. La proteasa Lon, la metaloproteasa Fts, la chaperona ClpA y la activasa Rubisco se detectaron en forma de dímero, tetrámero y hexámero (Lee et al., 2004; Bieniossek et al., 2006; Kress et al., 2007; Serban et al., 2018). En el estudio de la chaperona ClpA observaron un equilibrio entre monómeros y dímeros, sin embargo, en presencia de un nucleósido trifosfato, los dímeros formaron tetrámeros y éstos se asociaron con otros dímeros para formar un hexámero, se consideró por tanto que el estado tetramérico era un intermediario transitorio en el camino a formar hexámeros (Kress et al., 2007). Para la activasa Rubisco se observó un equilibrio similar, propuesto como el ciclo de la ATPasa, donde la asociación de dímeros con tetrámeros genera un hexámero que forma un anillo cerrado a elevados niveles de ATP y magnesio. Tras la hidrólisis y la liberación del producto, el anillo se rompe y se disocia en un dímero y un tetrámero (Serban et al., 2018).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.15 Estructura de un oligómero de AAA⁺ ATPasa, figura de (Hanson and Whiteheart, 2005). La figura muestra la disposición de las subunidades en hexámeros que se forma por el dominio AAA⁺ de NSF103 (código de acceso de Protein Data Bank 1D2N). Las posiciones de los monómeros se resaltan alternativamente por gris claro y gris oscuro. Se representa un análogo de nucleótido (AMP-PNP, en color rojo) que ocupa el sitio de unión en el punto de contacto entre las subunidades vecinas. La segunda región de homología se muestra en morado, el sensor 2 en verde y el poro en amarillo.

Algunos estudios indican que ATAD3A se asocia en oligómeros (Gilquin, Taillebourg, et al., 2010). Mediante experimentos de entrecruzamiento con DTSSP (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilo propionato) seguido de Western Blot se confirmó que ATAD3A se asocia en un hexámero (Baudier, 2018). Mediante co-inmunoprecipitación en extractos celulares de células H1299 se estudió la interacción entre ATAD3A y ATAD3B y, se propuso que ATAD3A también forma hetero oligómeros con ATAD3B. Los dominios de hélice superenrollada (CC) parecen ser claves en la oligomerización de ATAD3A (Merle et al., 2012).

1.6.3.3 Enfermedad causada por mutaciones en el locus que incluye los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C*

Hasta la fecha, se han descrito 59 pacientes (46 no relacionados) con mutaciones en el locus *ATAD3* asociadas a patología mitocondrial (al Madhoun et al., 2019; Azova et al., 2021; Cooper et al., 2017; Desai et al., 2017; Frazier et al., 2021; Gunning et al., 2020; Harel et al., 2016; Peeters-Scholte et al., 2017; Peralta et al., 2019; Yap et al., 2021). El locus *ATAD3* se ha considerado una de las cinco causas más comunes de enfermedad mitocondrial pediátrica relacionada con el DNA nuclear (Frazier et al., 2021).

Al igual que el resto de las enfermedades mitocondriales, sus síntomas, la heterogeneidad y la variabilidad de la edad de comienzo de la enfermedad hacen que sea difícil el diagnóstico y desarrollo de la terapia. Los fenotipos más comunes en enfermedad causada por mutaciones en el locus *ATAD3* incluyen hipoplasia cerebelar leve, retraso del desarrollo global, hipotonía, paraplegia espástica hereditaria, neuropatía axonal, atrofia óptica o cardiomiopatía hipertrófica (Cooper et al., 2017; Harel et al., 2016; Peralta et al., 2019).

Se han descrito mutaciones en *ATAD3A* en numerosos pacientes (al Madhoun et al., 2019; Cooper et al., 2017; Harel et al., 2016; Peeters-Scholte et al., 2017; Peralta et al., 2019; Yap et al., 2021). Además de casos de deleciones o duplicaciones en el locus *ATAD3* (Azova et al., 2021; Desai et al., 2017; Frazier et al., 2021; Gunning et al., 2020; Peeters-Scholte et al., 2017; Yap et al., 2021), provocadas por la alta homología existente entre los tres genes del locus *ATAD3*, que confiere inestabilidad a la zona y facilita el fenómeno de recombinación homóloga no alélica (NAHR), desencadenando fenotipos muy graves en los pacientes. En todos los casos se ve afectado el gen *ATAD3A*, aunque en algunos casos en combinación con el gen *ATAD3B* o los genes *ATAD3C* y *ATAD3B*. Las duplicaciones que se han descrito dan lugar a un gen recombinante *ATAD3A/ATAD3C*, que genera una proteína que altera la oligomerización de *ATAD3A* (Frazier et al., 2021; Gunning et al., 2020).

En la Tabla 1.2 se recogen los pacientes con mutaciones en el locus *ATAD3* publicados hasta la fecha, indicando el tipo de mutación que presentan.

Tabla 1.2 Agrupamiento de los pacientes de cada estudio publicado hasta la fecha en función del tipo de mutación que presentan en el locus ATAD3. D: mutación dominante; R: mutación recesiva. +/-: heterocigoto.

Pacientes no relacionados	Reagrupamientos/Mutaciones		D/R	Edad en la publicación	Cita
8	Grandes reagrupamientos (deleción)	Del (ATAD3B-ATAD3A); Del (ATAD3B-ATAD3A) (~38 kb)	R	† (entre 1 día – 7 meses)	(Desai et al., 2017) (Peeters-Scholte et al., 2017) (Yap et al., 2021)
1		Del (ATAD3B-ATAD3A) (38 kb); Del (ATAD3C-ATAD3A) (67 kb)	R	† (13 días)	(Harel et al., 2016; Yap et al., 2021)
1		Del (ATAD3B-ATAD3A) / Del (ATAD3C-ATAD3B-ATAD3A?)		30 años	(Desai et al., 2017)
1		L77V; Del (ATAD3B-ATAD3A)	R	† (2 años)	(Yap et al., 2021)
21	Grandes reagrupamientos (duplicación)	Dup (ATAD3C/ATAD3A) (+/-)	D	† (entre muerte fetal –2 meses)	(Gunning et al., 2020) (Frazier et al., 2021)
1		Dup (ATAD3C/ATAD3A) (+/-) (~47 kDa)		5 años	(Azova et al., 2021)
5	Mutaciones puntuales en ATAD3A	R528W (+/-)	D	Entre 23 meses – 9 años	(Harel et al., 2016)
1		G355D (+/-)		Entre 3,5 – 35 años	(Cooper et al., 2017)
1		T531I; T531I	R	Entre 24 – 26 años	(Harel et al., 2016)
1		Gln212*; L77R		† (entre 3 - 6 días)	(Peeters-Scholte et al., 2017)
1		L406R; L406R		† (entre 3 - 30 días)	(Peralta et al., 2018)
1		R327P; R327P		† (entre 6 - 7 meses)	(Yap et al., 2021)
1		F50L; Del (Ex3-4 c.(282+1_283-1)_ (444+1_445-1))		† horas	
1		R170W; Dup (Val381Glyfs*17)		Entre 17-19 años	
1		G236V; Del (his472fs)		3 meses	
1		F50L; K568del		15 años	
1 (consanguíneos)		T84M; (c.206-12C>T)		4,5 años	(al Madhoun et al., 2019)

1.6.4 Terapia para enfermedades mitocondriales

Por el momento, no existen muchas opciones para tratar las enfermedades mitocondriales.

Se están investigando agentes que incrementen la biogénesis mitocondrial, como una estrategia terapéutica potencial en las enfermedades mitocondriales primarias, con la cual se podría recuperar potencialmente la función mitocondrial en pacientes (Pitceathly et al., 2021). El contenido mitocondrial de la célula corresponde con los requerimientos energéticos del tejido donde se encuentra. La biogénesis mitocondrial se refiere al incremento de la masa mitocondrial, que es activada por un gran número de estímulos fisiológicos que incluyen el ayuno, la exposición al frío y el ejercicio, con el último objetivo de combinar el suministro y la demanda de energía (Filograna et al., 2020).

Hasta ahora, los suplementos en la dieta les han proporcionado pequeños beneficios a los pacientes a pesar de que son sólo terapias paliativas. Esto se debe a que incrementan el flujo de la cadena respiratoria (CoQ10, riboflavina), son antioxidantes (CoQ10, ácido alfa lipoico, vitamina C y E), actúan como cofactores (riboflavina, tiamina), o funcionan como sustratos mitocondriales (L-carnitina) (Hirano et al., 2018). La dieta cetogénica, caracterizada por un consumo de comida rica en grasas y baja en carbohidratos, podría beneficiar a pacientes de enfermedades mitocondriales que presentan desórdenes neurológicos mejorando la función mitocondrial y estimulando la biogénesis mitocondrial. Además, se ha visto que reduce la producción de especies reactivas de oxígeno y aumenta la producción de ATP (al Madhoun et al., 2019; Emperador et al., 2019; Martin et al., 2016).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis es la obtención de un diagnóstico genético-molecular de pacientes con mutaciones en genes nucleares diagnosticados con enfermedad mitocondrial.

Los objetivos específicos (divididos en capítulos) son:

1. CAPÍTULO I: Estudio de fibroblastos de una paciente con mutaciones en el gen *POLG*.
 - 1.1. Estudio del efecto de las mutaciones p.Asn864Ser y p.Ala1217Pro en el gen *POLG* en la función mitocondrial.
 - 1.2. Confirmación de la patogenicidad de las mutaciones mediante complementación funcional.
 - 1.3. Estudio del efecto de fármacos (Ceftriaxona/Lidocaina y Azidotimidina) sobre la viabilidad y proliferación celular.
2. CAPÍTULO II: Estudio de fibroblastos de un paciente con mutaciones en el gen *NDUFAF6*.
 - 2.1. Estudio del efecto de las mutaciones p.Ile124Thr y p.Tyr187AsnfsTer65 en el gen *NDUFAF6* en la función mitocondrial.
 - 2.2. Confirmación de la patogenicidad de las mutaciones mediante complementación funcional.
3. CAPÍTULO III: Estudio del gen *ATAD3C* y su posible implicación en la patología de un paciente con mutaciones en heterocigosis compuesta en *ATAD3C*.
 - 3.1. Medida de la expresión de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* en líneas celulares y comparación con bases de datos que recogen la expresión génica medida mediante RNA-Seq en líneas celulares y tejidos.
 - 3.2. Estudio de la localización subcelular de la proteína ATAD3C.
 - 3.3. Estudio de las interacciones entre las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas.
 - 3.4. Estudio de la formación de oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante SDS-PAGE y Blue Native-PAGE.
 - 3.5. Estudio del efecto de las mutaciones p.Leu231Pro y c.152+1G>A en *ATAD3C* en la función mitocondrial de fibroblastos derivados del paciente.

CAPITULO I – Estudio de mutaciones en el gen *POLG*

3 CAPITULO I – Estudio de mutaciones en el gen *POLG*

3.1 Caso clínico

La paciente es una niña de 4 años de padres rusos sanos no consanguíneos que a los 19 meses de edad presentó su primer evento de epilepsia. A pesar de que no fue tratada, se mostró asintomática durante año y medio. Tras este tiempo, cuando tenía 3 años, presentó episodios de epilepsia (más de 10 por día) y comenzó con el tratamiento de valproato. Seguidamente, se identificó una serología positiva para *Borrelia* acompañada de fiebres altas y, en la examinación física, se encontró una picadura de insecto. La paciente se trató con una inyección intramuscular de ceftriaxona/lidocaína. Tras el tratamiento, sufrió episodios de crisis convulsivas, hipertonía y mioclonías en las cuatro extremidades. Cuatro días después, fue dada de alta manteniendo un adecuado nivel de consciencia y motricidad normal. Después de la segunda inyección de ceftriaxona/lidocaína, la paciente volvió a presentar una crisis generalizada que fue refractaria al tratamiento asociándose con deterioro del nivel de consciencia y deterioro a nivel motor. También se detectó un valor alto de lactato (4,9 nmol/l: valores de referencia (RV), < 2,0 mmol/l). Los estudios de neuroimagen revelaron un incremento del espacio subaracnoideo a nivel frontoparietal y una atrofia en el hemisferio izquierdo, además, se observó un fondo de ojo pálido. A continuación, las convulsiones que padecía se controlaron mediante el tratamiento con fenobarbital, carbamazepina y leviracetam. Ocasionalmente, la paciente presentaba convulsiones focales motoras y clonía de extremidad superior. Con 4 años presentó encefalopatía y alteración de la función motora, incluyendo facies inexpresivas, hipomimia facial, hipotonía axial, hiporreflexia, incremento del tono de las extremidades distales y tetraparesia derecha, como también pérdidas de deambulación y dificultades para coger objetos. Los biomarcadores mitocondriales como FGF21 en suero/plasma, aminoácidos y lactato tuvieron valores normales. En el fluido cerebroespinal, el lactato fue normal, pero los valores de proteína total fueron altos (190 mg/dL: RV, 15-50), y se observó una deficiencia en el folato cerebral de 3 nmol/L (R.V, 35-124), apoyando el diagnóstico de desorden mitocondrial (Batllori et al., 2018).

3.2 Análisis genético

En primer lugar, se estudió el DNA mitocondrial en nuestro laboratorio, y no se encontraron ni mutaciones puntuales patológicas ni deleciones en una biopsia de músculo de la paciente.

Posteriormente, mediante análisis de secuenciación de nueva generación en el Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (Barcelona), se identificaron en el gen *POLG* (NM_002693.2) dos cambios sin sentido involucrando residuos conservados evolutivamente en el dominio polimerasa.

El estudio familiar confirmó que las mutaciones están en heterocigosis compuesta en el gen *POLG* en la paciente. La mutación c.2591A>G (p.Asn864Ser) es una mutación patológica recesiva previamente descrita en dos casos en heterocigosis (Van Goethem et al., 2003). El cambio c.3649G>C (p.Ala1217Pro) (SNP, rs569063066) no se había relacionado previamente con ninguna enfermedad y su frecuencia de aparición en la población general, *MAF* (*minor allele frequency*), es de 2.476e-5 según datos de *gnomAD* (*Genome Aggregation Database*, (Karczewski et al., 2020)) (fecha de acceso 15 Agosto 2021), que recopila 125748 exomas y 15708 genomas de individuos no relacionados (un total de 141456 individuos), secuenciados como parte de varios estudios específicos de enfermedades comunes en adulto y de estudios genéticos poblacionales, que se alinean contra el genoma humano GRCh37. Diversos predictores de patogenicidad (*PolyPhen-2*, *Pmut*, *Mutation Taster*) identificaron ambas mutaciones como probablemente patogénicas.

La presencia de las mutaciones en los fibroblastos de la paciente en heterocigosis compuesta en *POLG* se confirmó mediante extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación Sanger (Figura 3.1).

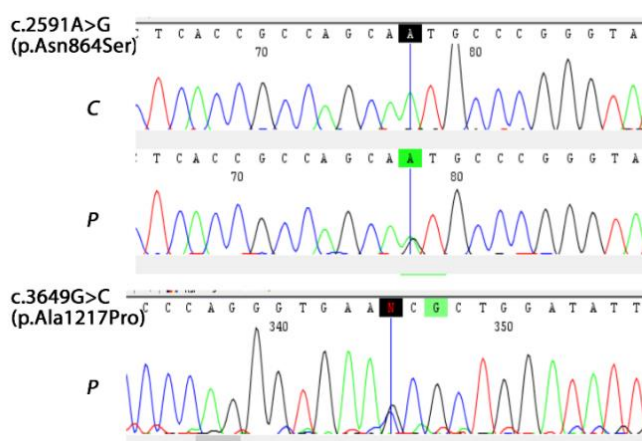


Figura 3.1 Mutaciones en el gen *POLG*. El electroferograma superior muestra la variación c.2591 A>G en heterocigosis en la paciente (P), y se compara con el electroferograma de un individuo control de 1 mes (C), en el que no se encuentra el cambio de A>G. El electroferograma inferior muestra la variación c.3649 G>C en heterocigosis en la paciente (P).

Para determinar la conservación de los residuos alterados se estimaron los índices de conservación (CIs) de los aminoácidos mutados, asparagina 864 y alanina 1217. Para ello, un total de 210 secuencias de referencia de *POLG* de diferentes animales, obtenidas de *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (entrada el 23 de Julio de 2019), se alinearon con *Clustal*

Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La asparagina localizada en la posición 864 estaba conservada un 100 % en las secuencias, y la alanina en la posición 1217, en un 98,6 %.

3.3 Estudio del efecto funcional de las mutaciones en *POLG*

3.3.1 Medida de la expresión de transcrito de *POLG*

Para estudiar el efecto de las mutaciones en *POLG* en los fibroblastos derivados de la paciente, se cuantificó la expresión de transcrito de *POLG* tanto en fibroblastos derivados de un individuo control de 1 mes (C) como en fibroblastos derivados de la paciente (P) mediante PCR cuantitativa (qPCR).

La expresión de *POLG* en los fibroblastos de la paciente disminuyó significativamente ($65,37 \pm 4,29$) respecto a la expresión en los fibroblastos derivados del control ($100 \pm 17,96$) (Figura 3.2), indicando que las mutaciones se asocian a una reducción de los niveles de expresión de *POLG* a nivel de transcrito en los fibroblastos de la paciente.

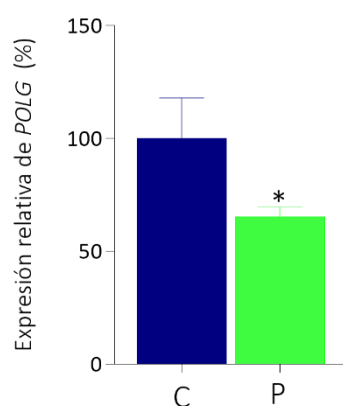


Figura 3.2 Niveles de expresión relativa del transcrito total de *POLG* en fibroblastos derivados del control (C) y derivados de la paciente (P). Los datos se presentan como la media \pm SD (desviación estándar) de la expresión del transcrito de *POLG* (n=3), *POLG*: C: $100 \pm 17,96$; P: $65,37 \pm 4,29$, y la significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05 respecto a C.

3.4 Medida de los niveles de DNA mitocondrial

Frecuentemente, las mutaciones recesivas en el dominio polimerasa de *POLG* conducen a la pérdida de DNA mitocondrial (depleción de mtDNA), que a su vez compromete la fosforilación oxidativa (Dimmock et al., 2010).

Para analizar el efecto de las mutaciones de *POLG* en la depleción del mtDNA en los tejidos de la paciente se cuantificaron los niveles del mtDNA respecto al nDNA en biopsia de músculo de la paciente y se compararon con 2 individuos controles estudiados en nuestro laboratorio, de 1 año

(C1a) y de 13 días (C13d) de edad, respectivamente. La cantidad de mtDNA detectada en la paciente fue muy similar a la de los controles (Figura 3.3).

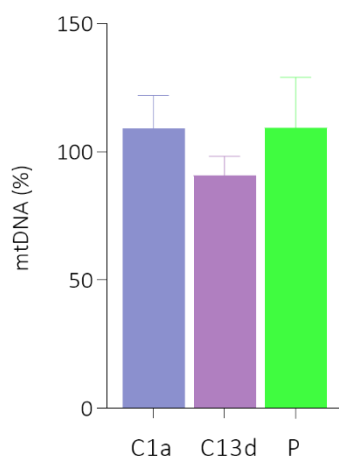


Figura 3.3 Niveles de DNA mitocondrial respecto a DNA nuclear en muestra de músculo de un individuo control de 1 año (C1a), de 13 días (C13d) y de la paciente (P). Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del contenido de mtDNA ($n=2$), *mtDNA* (%): C1y: $109 \pm 12,8$; C13d: $90,77 \pm 7,55$; P: $109,25 \pm 19,7$, y la significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, $*p < 0,05$ respecto C1a. No hubo diferencias significativas.

A continuación, se cuantificaron los niveles de mtDNA en los fibroblastos P, tanto en medio rico en glucosa como en medio en el que se reemplazó la glucosa por la galactosa. Se utilizaron ambos medios puesto que cuando las células crecen en glucosa utilizan tanto la glicólisis como la fosforilación oxidativa para producir ATP, mientras que las células que crecen en galactosa son casi totalmente dependientes de OXPHOS (Robinson, 1996).

Los fibroblastos de la paciente mostraron menor contenido de mtDNA que los fibroblastos control (reducción significativa del 20 %). Cuando se crecieron en el medio que contiene galactosa, la reducción también fue significativa (26 %) (Figura 3.4). Sin embargo, los fibroblastos no son el mejor tejido para determinar depleción, y en el caso de músculo, para que se considere que hay depleción, esta tiene que ser de al menos el 70 %. Los valores de depleción obtenidos no indican claramente que las mutaciones en el dominio polimerasa de *POLG* lleven a la disminución del contenido de DNA mitocondrial respecto al nuclear. Aun así, se estudió si la complementación funcional recuperaba los niveles de mtDNA en fibroblastos.

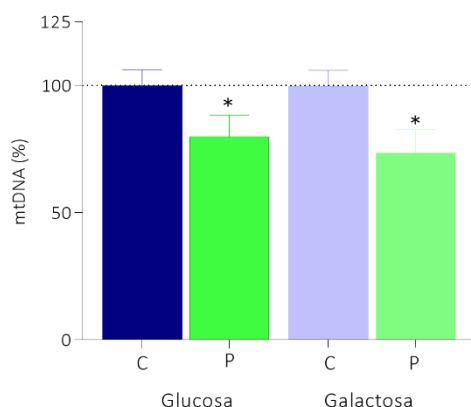


Figura 3.4 Niveles de DNA mitocondrial respecto a DNA nuclear en fibroblastos derivados de control (C), de la paciente (P) en crecimiento en medio rico en glucosa o en galactosa. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) ($n=4$) del mtDNA normalizado por los valores de DNA nuclear relativos a los valores de las células control crecidas en glucosa (línea de puntos, 100 %). *mtDNA (%)*: C glucosa: $100 \pm 6,21$; P glucosa: $79,86 \pm 8,51$; C galactosa: $100 \pm 6,20$; P galactosa: $73,46 \pm 9,19$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, $*p < 0,05$, comparando con C en el mismo medio.

3.5.1. Medida de la actividad enzimática del Complejo IV

Para valorar cuantitativamente el efecto de la depleción del mtDNA detectada en fibroblastos en la bioenergética mitocondrial, se midió la actividad enzimática del Complejo IV utilizando la actividad de la citrato sintasa para normalizar (Figura 3.5).

La actividad CIV/CS no se redujo en los fibroblastos derivados de la paciente ni en condiciones de alta glucosa en el medio, ni cuando se reemplazó por galactosa. Sin embargo, la actividad enzimática del CIV disminuyó en la línea control que sobreexpresa *POLG* con una mutación en el dominio polimerasa (c.2864A>G, p.Y955C), *POLG*-Y955C (*C^{POLG-Y955C}*), descrita como una mutación que causa depleción severa del mtDNA (Atanassova et al., 2011).

Estos resultados indican que las mutaciones en *POLG* en la paciente no son lo suficientemente severas como para reducir la actividad del complejo IV de los fibroblastos.

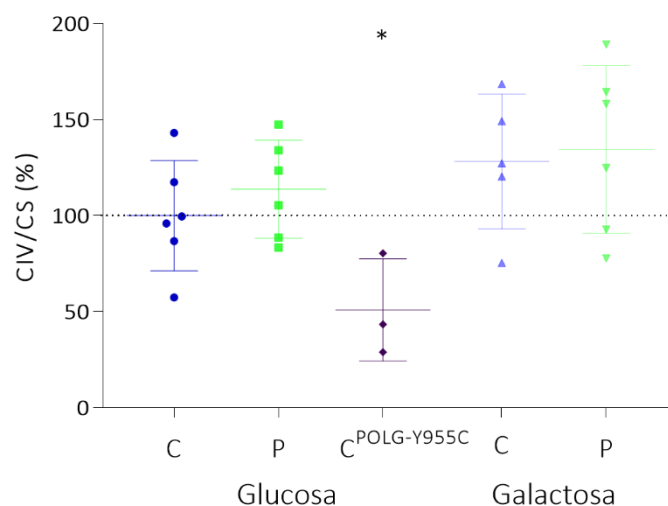


Figura 3.5 Actividad del complejo IV normalizada por la actividad de la citrato sintasa (CS) de fibroblastos control (C), fibroblastos derivados de la paciente (P), fibroblastos control sobreexpresando *POLG* mutante (C^{POLG-Y955C}) en crecimiento en medio rico en glucosa o en galactosa. El diagrama de dispersión representa la media ± SD (desviación estándar) de la actividad CIV/CS (n=3) en glucosa y seis (n=6) en galactosa, comparada con los valores de la media de los controles (línea de puntos, 100 %). CIV/CS (%): C glucosa: 100 ± 28,82, P glucosa: 113,7 ± 25,51; C^{POLG-Y955C} glucosa: 50,9 ± 26,61; C galactosa: 128,20 ± 35,05; P galactosa: 134,48 ± 43,52. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05, comparando con C en el mismo medio.

3.6. Estudios de complementación funcional

A continuación se llevó a cabo un ensayo de complementación genética (Rodenburg, 2018). Para ello, el gen *POLG* se amplificó a partir de RNA de fibroblastos derivados de un control y se expresó en los fibroblastos utilizando vectores lentivirales (Apartado 7.3.9). Se generaron así las líneas C^{POLG-WT} y P^{POLG-WT}.

3.6.1. Medida de la expresión de transcrito de *POLG* en las líneas generadas

Para determinar si se había logrado una sobreexpresión robusta del transgén, se cuantificó su expresión mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Como se muestra en la Figura 3.6, la expresión de *POLG* aumentó significativamente después de sobreexpresar *POLG*-WT en los fibroblastos control o de la paciente. La expresión de transcrito de *POLG* en fibroblastos control transducidos con la variante mutante de *POLG* (C^{POLG-Y955C}) también aumentó respecto fibroblastos derivados del control.

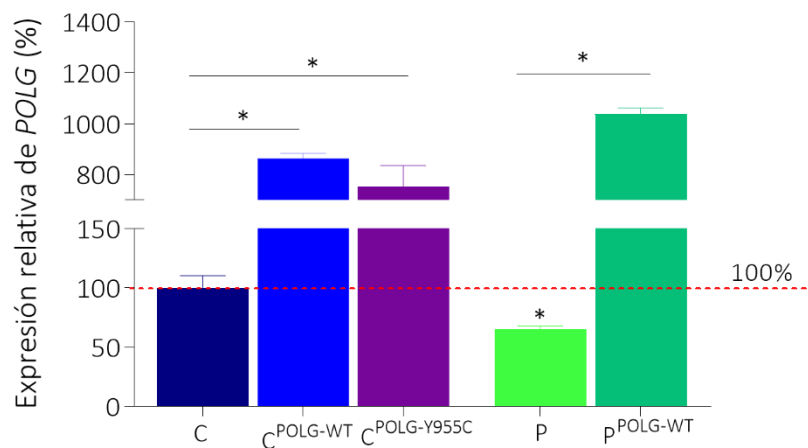


Figura 3.6 Niveles de expresión relativa del transcrito total de *POLG* en fibroblastos control (C), fibroblastos derivados de la paciente (P), sobreexpresando *POLG*-WT (C^{POLG-WT} y P^{POLG-WT}) y con la mutación Y955C (C^{POLG-Y955C}). Los datos se presentan como la media ± SD (desviación estándar) de la expresión relativa de *POLG* (n=3), *POLG*: C: 100 ± 17,96; C^{POLG-WT}: 862,74 ± 36,99; C^{POLG-Y955C}: 753,64 ± 142,58; P: 65,37 ± 4,29; P^{POLG-WT}: 1037,82 ± 41,7. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05, respecto C o P en cada caso.

3.6.2. Medida de expresión de *POLG* mediante Western Blot

A continuación, los lisados de proteínas totales extraídos de los fibroblastos se analizaron mediante Western Blot.

La concentración de proteína total por calle (20 µg) no fue suficiente para detectar la proteína *POLG* en los fibroblastos control (C) y de la paciente (P), sin embargo, la expresión de la proteína *POLG* en las nuevas células generadas (C^{POLG-WT}, P^{POLG-WT} y C^{POLG-Y955C}) aumentó en comparación con las anteriores (Figura 3.7), utilizando *SDHA* como control. Los niveles de expresión de p.MT-CO1 fueron similares en todos los fibroblastos.

La expresión de la proteína *POLG* fue menor en el caso de los fibroblastos C^{POLG-Y955C} que en C^{POLG-WT}. Además, en esta línea, la expresión de la subunidad mitocondrial del complejo IV (p.MT-CO1) se redujo, indicando que esta mutación es más severa que las mutaciones en *POLG* de la paciente.

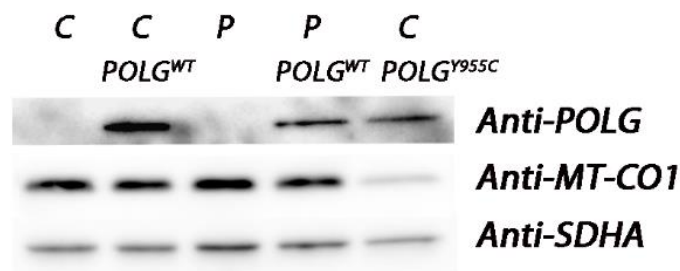


Figura 3.7 Imagen de la inmunodetección de las proteínas *POLG*, p.MT-CO1 y *SDHA* en fibroblastos control (C), fibroblastos derivados de la paciente (P), sobreexpresando *POLG*-WT (C^{POLG-WT} y P^{POLG-WT}) y con la mutación Y955C (C^{POLG-Y955C}). Se cargaron 20 µg de proteína total por calle.

3.6.3. Medida de los niveles de DNA mitocondrial

Con el objetivo de determinar si la complementación génica permitía recuperar los niveles de mtDNA normales en fibroblastos, se cuantificó la depleción del DNA mitocondrial de las nuevas células generadas y se comparó con sus controles sin transducir.

Las células derivadas de la paciente sobreexpresando la variante silvestre de *POLG* mostraron un aumento significativo de número de copias de mtDNA respecto los fibroblastos de la paciente, tanto en medio con glucosa ($79,86 \% \pm 8,51$ de mtDNA en la paciente frente a $100,88 \% \pm 20,99$ en $P^{POLG-WT}$) como en condiciones de biogénesis mitocondrial (galactosa) ($73,46 \% \pm 9,19$ mtDNA en la paciente frente a $96,08 \% \pm 34,05$ en $P^{POLG-WT}$) (Figura 3.8). Sin embargo, la sobreexpresión de la variante silvestre en la línea control no llevó a un aumento significativo en comparación con el control sin transducir (línea de puntos, 100 %) ni en medio con glucosa ($101,02 \% \pm 13,91$ de mtDNA) ni en galactosa ($121,89 \% \pm 54,98$ de mtDNA). Este resultado indica que la depleción del DNA mitocondrial en la paciente es compensada por la sobreexpresión de la proteína *POLG* silvestre.

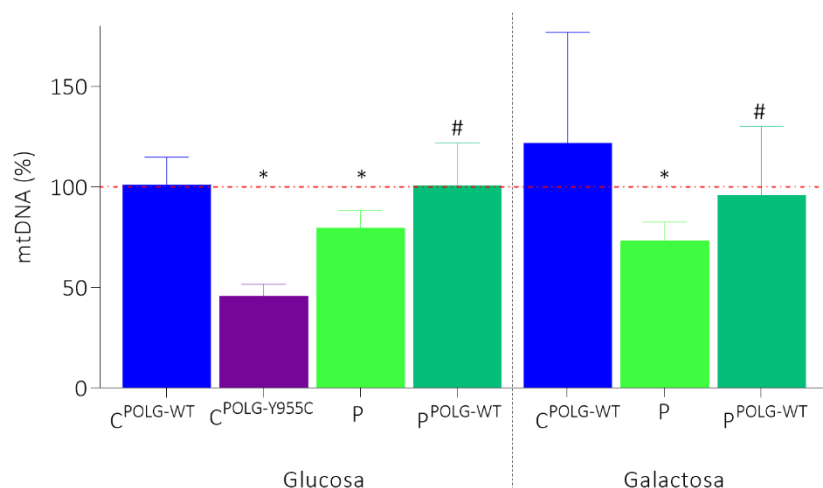


Figura 3.8 Niveles de DNA mitocondrial respecto a DNA nuclear en fibroblastos derivados de control sobreexpresando *POLG*-WT ($C^{POLG-WT}$), *POLG*-Y955C ($C^{POLG-Y955C}$), de la paciente (P), de la paciente sobreexpresando *POLG*-WT ($P^{POLG-WT}$), en crecimiento en medio rico en glucosa o en galactosa. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del mtDNA normalizado por los valores de DNA nuclear relativos a los valores de las células control crecidas en glucosa (línea de puntos, 100 %) ($n=4$). *mtDNA/nDNA* (%): C glucosa: $100 \pm 6,21$ (línea roja de puntos); $C^{POLG-WT}$ glucosa: $101,02 \pm 13,91$; $C^{POLG-Y955C}$ glucosa: $45,67 \pm 5,83$; P glucosa: $79,86 \pm 8,51$; $P^{POLG-WT}$ glucosa: $100,88 \pm 20,99$; $C^{POLG-WT}$ galactosa: $121,89 \pm 54,98$; P galactosa: $73,46 \pm 9,19$; $P^{POLG-WT}$ galactosa: $96,08 \pm 34,05$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, comparando con C cultivadas en el mismo medio, o # $p < 0,05$, comparadas con P cultivadas en el mismo medio.

Por otro lado, la sobreexpresión de la variante Y955C de *POLG* indujo depleción severa del DNA mitocondrial ($45,67 \% \pm 5,83$ de mtDNA), que podría explicar la reducción de la expresión de la subunidad mitocondrial del CIV, p.MT-CO1 en el gel SDS-PAGE (Figura 3.7), y la disminución significativa de la actividad enzimática del CIV analizada (Figura 3.5).

3.6.4. Medida de la cinética de recuperación del DNA mitocondrial tras una depleción severa en fibroblastos de la paciente

La cinética de recuperación del DNA mitocondrial se analizó mediante el estudio de la ratio de depleción y recuperación del mtDNA en los fibroblastos tras la exposición a bromuro de etidio (EtBr). Esta prueba se ha usado con éxito para determinar el efecto funcional en mutaciones en *POLG* de fibroblastos humanos (Stewart et al., 2011).

Los resultados de este experimento mostraron que el EtBr induce la depleción del mtDNA de igual manera en los fibroblastos control, en los fibroblastos de la paciente y en los fibroblastos de la paciente sobreexpresando la variante silvestre de *POLG*. Tras los 8 días de exposición, todas las células presentaron una depleción del DNA mitocondrial de aproximadamente el 90 % del contenido de DNA mitocondrial (Figura 3.9).

Sin embargo, las células de la paciente mostraron una cinética de recuperación de los niveles de DNA mitocondrial notablemente más lenta, incluso 5 días después de haber retirado el EtBr no se detectó mtDNA. Las células de la paciente transducidas con la variante silvestre de *POLG* mostraron el mismo perfil de recuperación de DNA mitocondrial que el control. A los 10 días de recuperación, las células de la paciente todavía no habían recuperado los niveles de mtDNA (11,52 % de mtDNA/nDNA), mientras que el control y la paciente transducidos con *POLG*-WT, presentaron un contenido de DNA mitocondrial superior al inicial (~160 %).

Este análisis sugiere que la capacidad de recuperación adecuada del mtDNA en la paciente está comprometida por la combinación de las mutaciones en *POLG*. Además, se muestra cómo la presencia de un agente estresante puede desenmascarar el fenotipo deficiente de *POLG*.

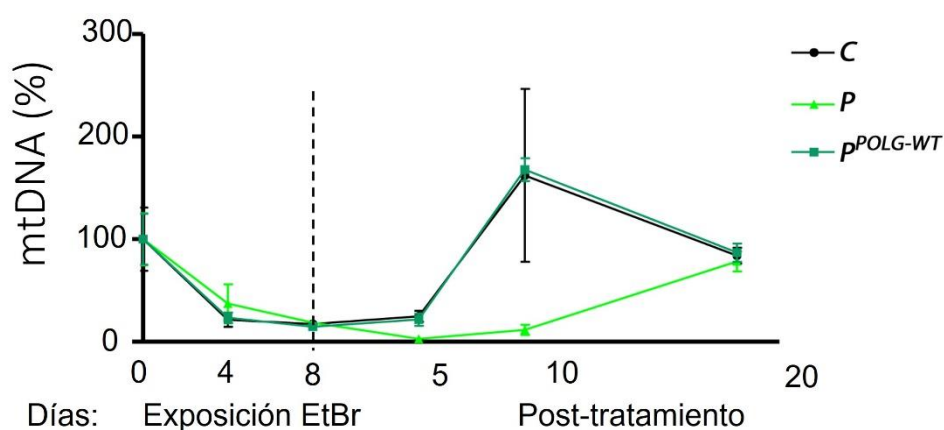


Figura 3.9 Cinéticas de depleción y repoblación del mtDNA en fibroblastos control (C), paciente (P) y paciente sobreexpresando *POLG*-WT ($P^{POLG-WT}$). Las células se trataron durante 8 días con 50 ng/ml de bromuro de etidio y se les dejó recuperar posteriormente durante 12 días. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del mtDNA normalizado por los valores de DNA nuclear (n=3).

3.7. Efecto del AZT sobre la viabilidad celular

La Azidotimidina (AZT) es un tipo de nucleósido inhibidor de la transcriptasa reversa (NRTIs) que se utiliza como tratamiento en terapias antivirales. Se determinó su efecto en el crecimiento de los fibroblastos de la paciente y del control durante 10 días. Puesto que se ha visto que algunas mutaciones en POLG aumentan la sensibilidad a este fármaco (Bailey et al., 2009; Yamanaka et al., 2007).

Como se muestra en la Figura 3.10, la presencia de 10 μ M de AZT no tuvo efecto significativo en el crecimiento de las células control (C). Sin embargo, el crecimiento de los fibroblastos derivados de la paciente (P) se redujo significativamente después de 6, 8 y 10 días en presencia de la droga (reducción del 19 %, 36 % y 47 %, respectivamente).

Una segunda línea control derivada de fibroblastos de edad y pase similar al de los fibroblastos derivados de la paciente (C3, fibroblastos derivados de un individuo control de 3 años) tampoco mostró una reducción del crecimiento cuando se expuso a 10 μ M de AZT. El tiempo de duplicación de los fibroblastos derivados de los controles tampoco aumentó al exponer a las células a AZT. Por el contrario, el tiempo de duplicación en los fibroblastos de la paciente aumentó aproximadamente un 11 % en presencia de AZT.

Este resultado muestra que las células de la paciente son susceptibles a la presencia de un agente estresante de POLG y supone una nueva indicación de que las mutaciones que contienen afectan al funcionamiento de POLG.

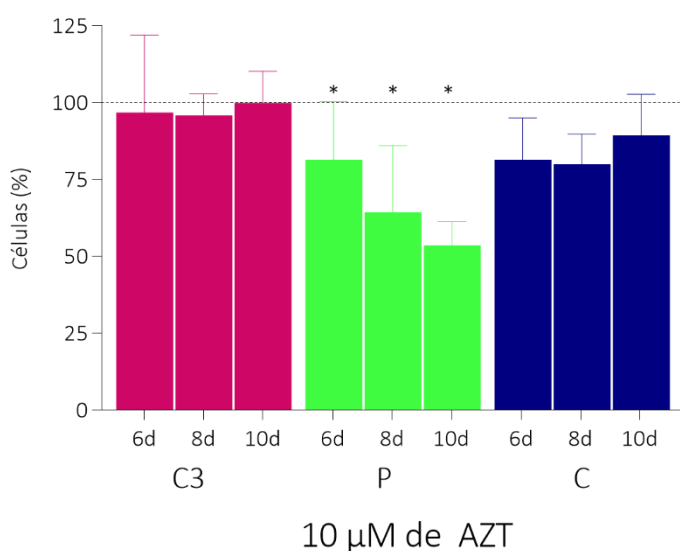


Figura 3.10 Efecto relativo de 10 µM de AZT en la proliferación de fibroblastos derivados de control de 1 mes (C), fibroblastos derivados de un control de 3 años (C3) y fibroblastos derivados de la paciente (P) en cultivo (después de 6, 8 y 10 días de exposición). Las condiciones del estudio fueron en medio DMEM sin glucosa de Gibco (ThermoFisher Scientific) suplementado con 5 mM de galactosa, 1 mM de piruvato de sodio y 10 % de SFB, con 10 µM de AZT disuelto en carbometil celulosa. Los datos se representan como la media ± SD (desviación estándar) del porcentaje de células respecto la media de valores de las células sin tratar (100 %, línea de puntos) (n=2 en las líneas celulares C y P, y n=4 en la línea celular C3). % células: C3 6d: 96,66 ± 25,22; C3 8d: 95,82 ± 6,94; C3 10d: 99,79 ± 10,39; P 6d: 81,41 ± 18,79; P 8d: 64,36 ± 21,65; P 10d: 53,53 ± 7,77; C 6d: 81,43 ± 13,5; C3 8d: 79,9 ± 9,84; C3 10d: 89,35 ± 13,29. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05 en la presencia de 10 µM de AZT comparado con las células sin tratar. Los datos previos a 6 días no se muestran, porque las células no presentaron diferencias.

3.8. Efectos de la lidocaína y la ceftriaxona en el consumo de oxígeno y la proliferación celular

Como se ha descrito anteriormente, la paciente sufrió un proceso infeccioso que fue tratado con inyecciones intramusculares de ceftriaxona/lidocaína. La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación que se utiliza en tratamientos de infecciones bacterianas, que fue administrada por una inyección intramuscular acompañada de la lidocaína, un anestésico local (Mohamed & Kamal, 2018). A pesar de que la paciente se recuperó después del tratamiento, lo hizo con deterioro motor y de consciencia. Este anestésico local se ha descrito anteriormente como un tóxico mitocondrial (Haschke Ph.D. & Fink M.D., 1975; Okamoto et al., 2016). Por tanto, el efecto de la ceftriaxona/lidocaína se examinó en los fibroblastos derivados del control y de la paciente.

El efecto del anestésico lidocaína se evaluó en los fibroblastos en primer lugar. Para ello, se midió el consumo de oxígeno a medida que se inyectaron dosis crecientes de lidocaína. La inhibición de la respiración por lidocaína fue dependiente de la dosis y afectó por igual a ambas líneas (50 % de

inhibición a $\sim 4,5$ mM, Figura 3.11 A.). Los valores fueron similares a los descritos previamente en mitocondrias aisladas de cerdo (Haschke Ph.D. & Fink M.D., 1975).

En segundo lugar, se determinó el efecto de la ceftriaxona en el consumo de oxígeno de los fibroblastos derivados del control y de la paciente a medida que se inyectaron dosis crecientes de ceftriaxona durante aproximadamente una hora. Como se muestra en la Figura 3.11 B., la adición de la ceftriaxona hasta una concentración de 1500 $\mu\text{g/ml}$ en la cámara de polarografía (diez veces mayor que la concentración máxima en plasma 141 $\mu\text{g/ml}$ (Mohamed & Kamal, 2018)) no inhibió la respiración celular de los fibroblastos. Este resultado sugiere excluir un efecto temprano del antibiótico en la función mitocondrial.

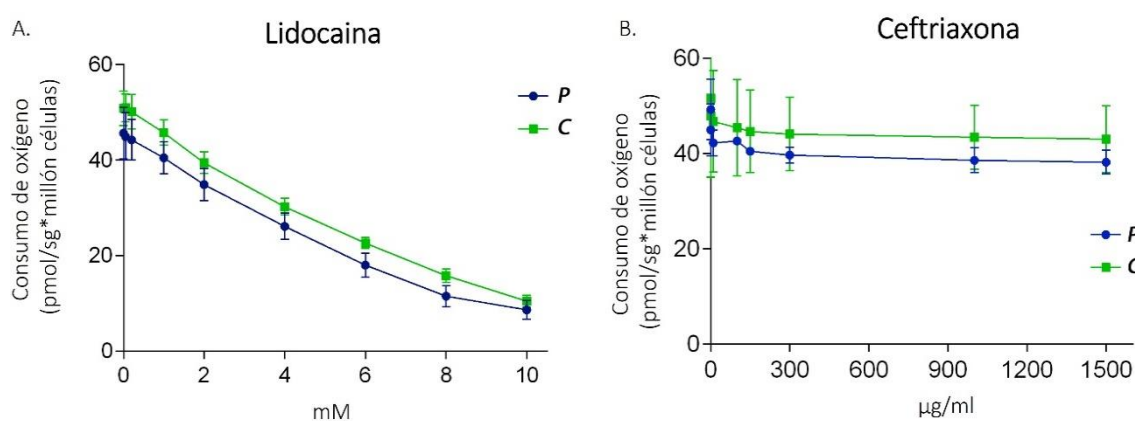


Figura 3.11 Ensayos de toxicidad de ceftriaxona y lidocaína. A. Consumo de oxígeno de los fibroblastos control (C) y de paciente (P) en presencia de dosis crecientes de lidocaína (0,05 mM, 0,2 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM de lidocaína) (n=3). B. Consumo de oxígeno de los fibroblastos C y de P en presencia de dosis crecientes de ceftriaxona (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ y 1500 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona) (n=2).

Para analizar un impacto a largo plazo, se testó el efecto de la ceftriaxona en células en crecimiento tras un período de 8 días. El crecimiento de los fibroblastos P en presencia de 150 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona, tras 2, 6 u 8 días de tratamiento, se vio reducido cuando se comparó con las mismas células sin tratar (línea de puntos, 100 %, Figura 3.12). Esta reducción no fue estadísticamente significativa, sin embargo, el número de células se redujo en un 18 % a día 8 respecto a las células sin tratar, mientras que en el caso de los fibroblastos C3 la reducción fue del 6 % respecto las células control sin tratar (línea de puntos, 100 %).

A concentración más elevada de ceftriaxona, 300 $\mu\text{g/ml}$, la proliferación de las células de la paciente se redujo en mayor medida indicando el efecto dependiente de la dosis (Figura 3.12). El número de células de P se redujo significativamente, comparado con células sin tratar en presencia de 300 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona (reducción de 22 %, 31 % y 42 %, a los 2, 6 u 8 días respectivamente), mientras que las células control fueron únicamente reducidas significativamente tras 8 días (27 %).

Los resultados indican que los fibroblastos derivados de la paciente presentan mayor sensibilidad a la droga.

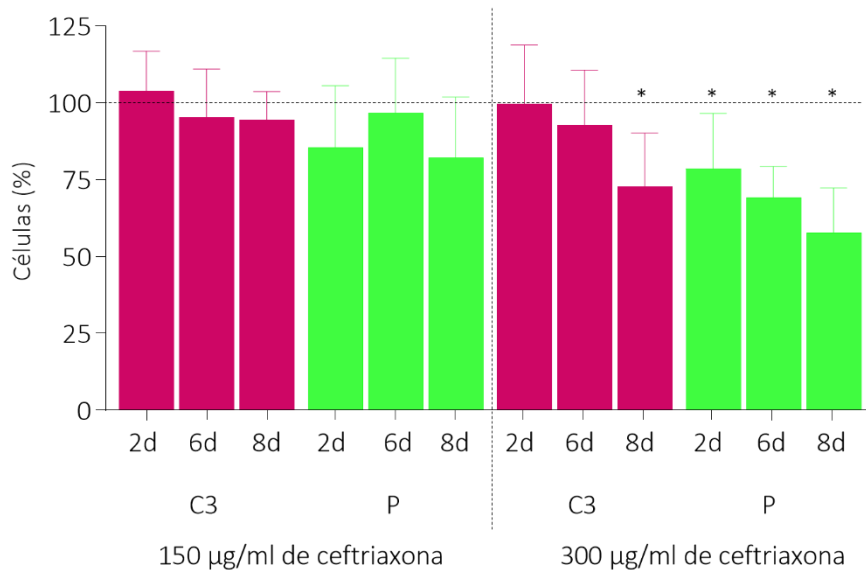


Figura 3.12 Efecto relativo de ceftriaxona en fibroblastos control (C3) y derivados de la paciente (P) en cultivo celular después de 2, 6, y 8 días de exposición. Las condiciones de estudio fueron en medio DMEM sin glucosa de Gibco (ThermoFisher Scientific) suplementado con 5 mM de galactosa, 1 mM de piruvato de sodio y 10 % de SFB, para facilitar la detección de los defectos en la fosforilación oxidativa, con Ceftriaxona (CFT) a dos concentraciones diferentes (150 µg/ml y 300 µg/ml). Los datos se representan como la media ± SD (desviación estándar) del porcentaje de células respecto la media de valores de las células sin tratar (100 %, línea de puntos), (n=4). Células (%): C3 2d 150 µg/ml: 103,77 ± 13,03; C3 6d 150 µg/ml: 95,26 ± 15,7; C3 8d 150 µg/ml: 99,79 ± 10,39; P 2d 150 µg/ml: 85,54 ± 20,06; P 6d 150 µg/ml: 96,71 ± 17,71; P 8d 150 µg/ml: 82,22 ± 19,68; C3 2d 300 µg/ml: 99,76 ± 18,99; C3 6d 300 µg/ml: 92,88 ± 17,75; C3 8d 300 µg/ml: 72,87 ± 17,26; P 2d 300 µg/ml: 78,54 ± 18,02; P 6d 300 µg/ml: 69,32 ± 9,99; P 8d 300 µg/ml: 57,81 ± 14,52. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05 en presencia de ceftriaxona comparado con células sin tratar.

3.9. Discusión

La paciente es una niña de 3 años portadora de dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el dominio polimerasa de la DNA polimerasa γ mitocondrial, que ha experimentado episodios severos de pérdida de consciencia y manifestaciones motoras durante el tratamiento de una infección por *Borrelia*. Una de las mutaciones (c.2591 A>G; p.Asn864Ser) fue previamente descrita en heterocigosis en dos hermanas de 15 años con enfermedad mitocondrial (Van Goethem et al., 2003). Como resultado, se la diagnosticó como portadora de una enfermedad mitocondrial relacionada con *POLG*.

Resulta complicado probar la naturaleza patogénica de las nuevas mutaciones en *POLG*, debido a que las manifestaciones de las enfermedades son a menudo dependientes de la epigenética y de factores ambientales y, además, el locus de *POLG* es altamente polimórfico (Saneto & Naviaux, 2010; Stewart et al., 2011). Una característica patogénica común que se espera que compartan las enfermedades relacionadas con *POLG* es que presenten depleciones en el mtDNA, posiblemente en combinación con daños en el mtDNA incluyendo múltiples deleciones y mutaciones puntuales. Debido a que el número de copias en el mtDNA es muy variable entre los diferentes tejidos, la depleción del mtDNA puede ser engañosa en el diagnóstico de la enfermedad (Dimmock et al., 2010), y además, no siempre está presente, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad (Nguyen et al., 2006). A pesar de que en el momento en el que aparecieron los síntomas clínicos no se detectó depleción del mtDNA en el músculo de la paciente, continuamos con el estudio en fibroblastos de la paciente. En ellos se observó una depleción leve del mtDNA tanto en medio con glucosa como en condiciones de biogénesis mitocondrial. Los niveles de depleción se recuperaron mediante complementación genética.

A continuación, se utilizó un ensayo que ha resultado muy útil en la identificación de mutaciones patológicas en *POLG* y que consiste en cuantificar la cinética de recuperación del mtDNA tras una depleción severa. Las células de la paciente mostraron una cinética de recuperación retardada en comparación con la cinética de los fibroblastos control y los fibroblastos de la paciente sobreexpresando *POLG*, que se recuperaron en poco tiempo. Esto fue debido a la combinación de las dos mutaciones recesivas en el dominio polimerasa de *POLG* en la paciente, indicando que son patogénicas.

Existen varios ejemplos bien establecidos de drogas que inducen desórdenes mitocondriales. En un estudio previo, varios pacientes tratados con los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTIs) desarrollaron una miopatía mitocondrial caracterizada por la aparición de fibras rojo-rasgadas y fibras musculares con actividad deficiente de citocromo c oxidasa (Lewis & Dalakas, 1995).

A pesar de que los NRTIs, como el AZT, están diseñados para inhibir la transcriptasa reversa del VIH, su incorporación inhibe la replicación de la polimerasa mitocondrial γ , induciendo toxicidad mitocondrial como principal efecto adverso. En los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo, la concentración 10 μ M de AZT no provocó efectos significativos en la proliferación de los fibroblastos derivados de los controles (C3, C), coincidiendo con los resultados publicados previamente (H. Wang et al., 1996). Sin embargo, las mutaciones en la paciente de *POLG* facilitaron la toxicidad inducida por AZT e incrementaron en un 11 % el tiempo de duplicación de las células. En otras líneas celulares con mutaciones en *POLG* se han descrito resultados semejantes de sensibilidad a AZT (Bailey et al., 2009; Yamanaka et al., 2007). Esta sensibilidad sugiere de nuevo que las mutaciones de la paciente son deletéreas.

Cuando existe una enfermedad intercurrente se puede dar una progresión más rápida de los síntomas clínicos que presentan pacientes con desórdenes mitocondriales (Saneto & Naviaux, 2010). En nuestra paciente se detectó una carga elevada de IgM anti-*Borrelia* sugiriendo que la infección por *Borrelia* sp. fue un evento importante en el desarrollo de la patología mitocondrial. La bacteria *Borrelia* sp. es dependiente de la ruta de salvamento de purinas de su hospedador (Jain et al., 2015). Esto podría haber alterado la disponibilidad de bases púricas para la síntesis de DNA de la paciente. La infección por *Borrelia* sp. se ha asociado frecuentemente con mioclonos (Gibaud et al., 2019), síntoma presente en las cuatro extremidades de nuestra paciente, además de en un episodio de crisis focal secundariamente generalizada con hipertensión. En un caso previo, la infección por *Borrelia* se asoció con el inicio de una neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (Macarez et al., 2006). Cuando el paciente, un hombre eurasiático de 17 años, mostró los primeros síntomas de deficiencia, su suero fue positivo para anticuerpos anti-*Borrelia*, motivo por el cual se le administró el antibiótico ceftriaxona durante 4 semanas. Poco después, se le identificó una mutación en el mtDNA (una sustitución de guanina a adenina en la posición 11778), y fue diagnosticado con la enfermedad de LHON. En un segundo caso, una mujer de 63 años con anticuerpos anti *Borrelia* sp. en el suero desarrolló el síndrome de cabeza caída (DHS), que fue atribuido a una mitocondriopatía multiórgano subyacente (J Finsterer, 2004).

Durante su admisión al hospital, la paciente empeoró repentinamente con la administración de la ceftriaxona/lidocaína. Los antibióticos cefalosporinas y el anestésico lidocaína se han asociado previamente con toxicidad mitocondrial. La lidocaína inhibe la cadena de transporte de electrones, aunque el mecanismo exacto de citotoxicidad no está descrito (Haschke Ph.D. & Fink M.D., 1975; Okamoto et al., 2016). La exposición *in vitro* de los fibroblastos derivados de la paciente a la lidocaína excluyó un impacto severo a esta droga en una dosis terapéutica. Por el contrario, en nuestros

ensayos *in vitro*, los fibroblastos de la paciente expuestos durante un largo período de tiempo a ceftriaxona fueron más susceptibles que los fibroblastos control. Notablemente, el incremento de la dosis de ceftriaxona incrementaba la toxicidad. El tratamiento con el antibiótico podría haber sido un factor ambiental clave en el progreso de la enfermedad mitocondrial subyacente en la paciente. Previamente, la ceftriaxona y otras cefalosporinas se han asociado con efectos en el sistema nervioso central, incluyendo principalmente encefalopatía, convulsión y mioclono (Hagiya et al., 2017; Kim et al., 2012; Lacroix et al., 2019; Triplett et al., 2019).

En resumen, se informa de un caso clínico de enfermedad mitocondrial relacionada con *POLG* precipitada por factores ambientales, infecciosos y terapéuticos. Este caso recalca la importancia de diagnósticos genéticos tempranos de los pacientes y la necesidad de considerar los riesgos y beneficios en la selección de tratamientos farmacológicos para pacientes con sospecha de desórdenes mitocondriales.

3.10. Conclusiones

Las conclusiones que se han extraído de la realización de este estudio son:

1. El alineamiento de 210 secuencias de referencia de POLG de diferentes animales indica que la asparagina 864 tiene un índice de conservación de 100 % y la alanina 1217 tiene un índice de conservación de 98,6 %.
2. La paciente con mutaciones en heterocigosis compuesta p.Asn864Ser y p.Ala1217Pro en el gen *POLG* no presenta depleción del mtDNA en músculo.
3. Los fibroblastos de la paciente mostraron una depleción leve del mtDNA que se corrigió mediante complementación genética.
4. En las células de la paciente la cinética de recuperación del mtDNA tras una depleción severa está alterada respecto a fibroblastos control, pero se recupera mediante complementación genética.
5. Los fibroblastos de la paciente presentan mayor susceptibilidad a la presencia de un nucleósido inhibidor de la transcriptasa reversa, la azidotimidina (AZT) que los controles.
6. El tratamiento de las células de la paciente con el antibiótico ceftriaxona a altas concentraciones afecta el crecimiento celular.

CAPITULO II – Estudio de
mutaciones en el gen
NDUFAF6

4. CAPITULO II – Estudio de mutaciones en el gen *NDUFAF6*

4.1. Caso clínico

Los pacientes son tres hermanos concebidos de padres españoles sanos sin consanguinidad, que a pesar de presentar los objetivos psicomotores tempranos dentro de la media y caminar sin ayuda entre los 12 y 15 meses de edad, a partir de los 17 meses presentaron dificultades al caminar y del habla (disartria severa). El deterioro neurológico fue insidioso, continuó en una distonía generalizada y marcha inestable entre los 3 y 6 años.

En un principio, no se observaron características sistémicas de desórdenes mitocondriales y los marcadores bioquímicos fueron normales en sangre y fluido cerebroespinal. Las concentraciones de aminoácidos del plasma, lactato y ácidos grasos en orina fueron normales en los dos primeros pacientes (P1 y P2) y, sin embargo, no se midieron en el más joven (P3). Los estudios de neuroimagen, mediante espectroscopía de resonancia magnética (MRS), permitieron detectar necrosis estriatal y picos de lactato en los pacientes, que previamente se habían asociado con mutaciones en genes del complejo I de la cadena respiratoria (Lebre et al., 2011).

Los pacientes, de 11, 8 y 6 años (P1, P2 y P3, respectivamente) en 2019, fueron diagnosticados con el Síndrome de Leigh. Presentaban distonía oromandibular prominente que causó dificultades al hablar, como tartamudeo, y disfagia. Los tres hermanos recibieron tratamiento con cofactores mitocondriales, incluyendo la tiamina y biotina, como el trihexifenidilo y L-dopa para la distonía, pero no presentaron mejora clínica.

4.2. Análisis genético

El paciente 1 (P1) se estudió en el Departamento de Neurología pediátrica del Hospital Vall d'Hebrón e Instituto de Investigación (VHIR) de Barcelona. En el gen *NDUFAF6* se identificaron dos mutaciones mediante *MiSeq sequencer* (Illumina, San Diego, CA, USA). La primera mutación fue una delección de 5 pb que lleva a un cambio en el marco de lectura (c.554_558delTTCTT; p.Tyr187AsnfsTer65) y la segunda, un cambio sin sentido previamente descrito en dos pacientes no relacionados (c.371T>C; p.Ile124Thr) (Kohda et al., 2016). Los programas *UCSC Genome Browser* y *Clustal Omega* ayudaron a confirmar que ambas mutaciones se encontraban en una región altamente conservada. Además, la mutación p.Tyr187AsnfsTer65 no se encontró en las bases de datos *HGMD*, *dbSNP*, *1000 Genome project*, *ExAC database* o en la base de variantes genéticas

española de CIBERER. La herramienta informática de predicción de mutaciones *Mutation Taster protein* la clasificó como patológica. No se identificaron mutaciones en otros genes.

Las dos mutaciones en heterocigosis compuesta se confirmaron en los tres hermanos mediante secuenciación Sanger. El padre era portador de la mutación sin sentido y el cambio en el marco de lectura procedía de la madre. Las mutaciones seguían una herencia autosómica recesiva en la familia.

En nuestro laboratorio llevamos a cabo un estudio molecular a partir de fibroblastos derivados del paciente P3. La presencia de las mutaciones en heterocigosis compuesta en *NDUFAF6* se confirmó en los fibroblastos derivados del paciente mediante secuenciación Sanger (Figura 4.1).

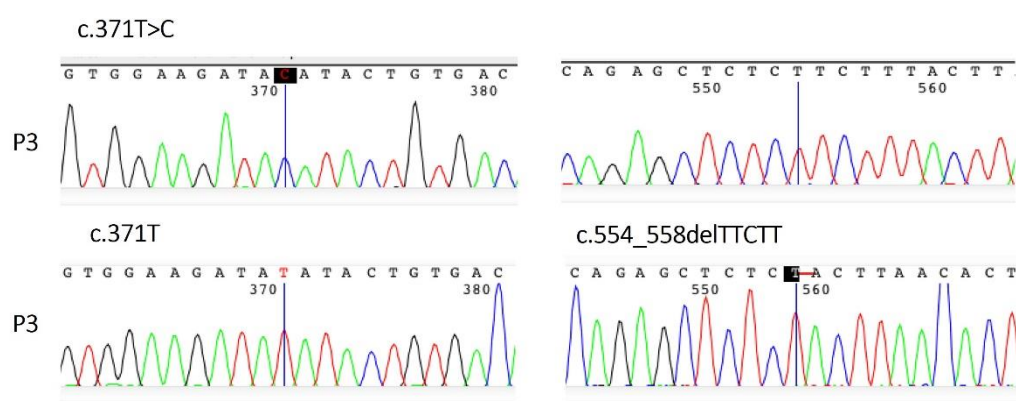


Figura 4.1 Mutaciones en el gen *NDUFAF6* en el paciente P3. Los electroferogramas de la parte de la izquierda muestran las dos secuencias obtenidas al amplificar la zona donde se localiza la variación c.371T>C en el paciente P3; en el superior se observa el cambio de nucleótido T>C y en el inferior se mantiene la Timina. Los electroferogramas de la derecha muestran las dos secuencias obtenidas al amplificar la zona donde se localiza la variación c.554_558delTTCTT en el paciente P3; en la superior se observa la secuencia TTCTT y en la inferior la delección de los 5 nucleótidos.

4.3. Estudio del efecto funcional de las mutaciones en *NDUFAF6*

4.3.1. Medida de los niveles de ATP mitocondrial

En este estudio, para comparar los resultados del paciente se utilizaron como controles, fibroblastos derivados de un individuo control de 1 mes (C) y estos mismos inmortalizados en nuestro laboratorio (C_i) (Apartado 7.1.13).

La reducción de la producción de ATP es una de las consecuencias fisiológicas de la reducción de la función del complejo I (Distelmaier et al., 2009). Para comprobar el efecto de las mutaciones en el gen *NDUFAF6* en el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa en los fibroblastos derivados del paciente P3, se midieron los niveles de ATP mitocondrial.

La cantidad de ATP mitocondrial de P3 se redujo un 40 % respecto a los fibroblastos control inmortalizados (C_i) (Figura 4.2). La diferencia entre el paciente y el control fue estadísticamente significativa. Este resultado indica que la función bioenergética está afectada en las células del paciente.

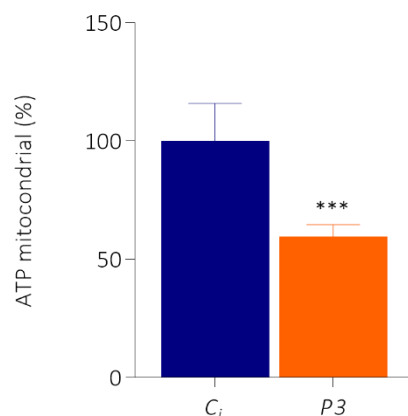


Figura 4.2 Niveles de ATP mitocondrial por número de células en fibroblastos inmortalizados control (C_i) y en fibroblastos derivados del paciente 3 (P3). Los datos se representan como la media \pm SD de los niveles de ATP mitocondrial normalizados por el número de células viables respecto las células control, tomada como la máxima producción de ATP mitocondrial por célula viable ($n=6$). *ATP mitocondrial (%)*: C_i : $100 \pm 15,95$; P3: $59,58 \pm 12,4$. La significación estadística se evaluó con el test ANOVA t-test (*unpaired*), *** $p < 0,001$, comparando con C_i .

4.3.2. Medida de los niveles de expresión de *NDUFAF6*

A continuación, para comprobar el efecto de las mutaciones en la expresión del gen se cuantificó la expresión del transcrito de *NDUFAF6* mediante PCR cuantitativa en los fibroblastos del paciente P3.

Como se muestra en la Figura 4.3, los niveles de transcritos de *NDUFAF6* en P3 se redujeron significativamente, con un $61,73 \% \pm 6,2$ de expresión relativa a fibroblastos C_i ($100 \% \pm 9,27$).

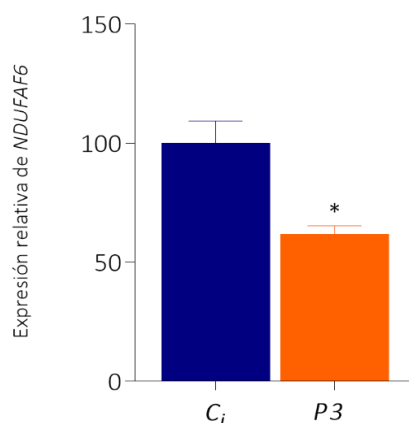


Figura 4.3 Niveles de expresión del transcrito de *NDUFAF6* en fibroblastos C_i y P3. Los datos se presentan como la media \pm SD (desviación estándar) de la expresión de *NDUFAF6* ($n=3$). *NDUFAF6*: C_i : $100 \pm 9,27$; P3: $61,73 \pm 6,2$. La significación estadística se evaluó con el test ANOVA t-test (*unpaired*), * $p < 0,05$, comparando con C_i .

Para determinar si las mutaciones en el gen *NDUFAF6* afectaban la homeostasis de la proteína se estudió la expresión de la proteína *NDUFAF6*. Los lisados de proteínas totales extraídas de fibroblastos control inmortalizados *C_i*, de fibroblastos control *C* y de fibroblastos *P3* se analizaron mediante geles SDS-PAGE y posterior inmunodetección con anticuerpos específicos.

Como se muestra en la Figura 4.4, la proteína *NDUFAF6* se detectó en los fibroblastos *C_i* y *C*, con una intensidad de banda similar, sin embargo, fue indetectable en los fibroblastos *P3*. La intensidad de la banda no se cuantificó debido a que visualmente podían comprobarse las diferencias de la expresión de la proteína entre líneas celulares. Este resultado sugiere que las mutaciones del paciente se asocian a una fuerte reducción de la proteína *NDUFAF6*.

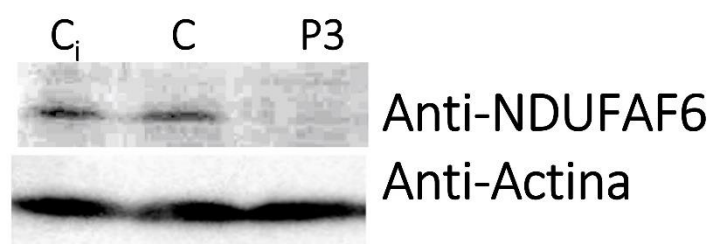


Figura 4.4 Imagen de la inmunodetección de la proteína *NDUFAF6* en fibroblastos control inmortalizados (*C_i*), fibroblastos control (*C*) y fibroblastos del paciente *P3*. Se cargaron 100 µg de proteína total por calle.

4.3.3. Medida de la actividad y cantidad de complejo I mediante Blue Native

La proteína *NDUFAF6* está involucrada en el ensamblaje del Complejo I (Pagliarini et al., 2008), por tanto, para estudiar si las mutaciones en *NDUFAF6* en el paciente afectan al ensamblaje del complejo I, se realizaron análisis en geles nativos Blue Native-PAGE.

En primer lugar, se midieron las actividades enzimáticas de los complejos I y II en gel en muestras de músculo extraído de un control (*C*) y de los pacientes *P1* y *P2*. Los resultados muestran una disminución de la actividad enzimática del complejo I en relación con el complejo II (utilizado como control de carga) en ambos pacientes (Figura 4.5).

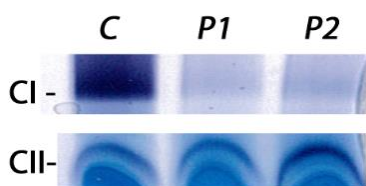


Figura 4.5 Medida de la actividad enzimática en gel del complejo I y II en muestras de músculo de control (*C*) y de los pacientes 1 (*P1*) y 2 (*P2*).

Para determinar si la cantidad de complejo I maduro de los fibroblastos derivados del paciente 3 se veía reducida, se analizaron los mitoplastos aislados de los fibroblastos mediante electroforesis Blue Native-PAGE, seguidas de la inmunodetección con anticuerpos específicos para los complejos respiratorios (Anexo II, Tabla 10.1).

Como se muestra en la Figura 4.6, la cantidad de Complejo I maduro en los mitoplastos del paciente P3 estaba drásticamente reducida en comparación con el control. El complejo I se inmunodetectó utilizando el anticuerpo frente a la proteína NDUF53, localizada en el brazo periférico del complejo I y que se ensambla en las primeras fases de formación del complejo I (Formosa et al., 2018). Esto indica que las primeras etapas del ensamblaje del complejo I se ven afectadas y, por consiguiente, el ensamblaje del complejo I maduro.

El resultado concuerda con la disminución de la proteína *NDUFAF6* observada en el paciente P3 y con el defecto detectado en la actividad enzimática en gel del CI en los tres hermanos.

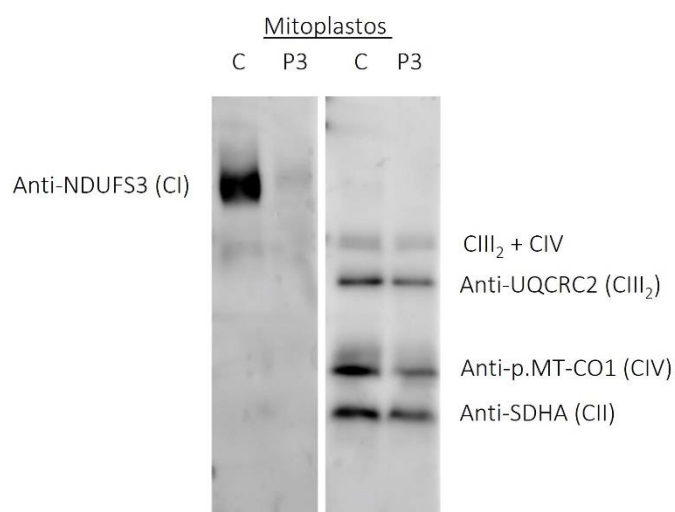


Figura 4.6 Imagen de la inmunodetección del complejo I maduro en mitoplastos de fibroblastos control (C) y paciente P3. Los complejos nativos se separaron en Blue Native-PAGE. Se inmunodetectaron los complejos I, III y IV. El complejo II se utilizó como control. Se cargaron 8 µg de mitoplastos por calle.

4.4. Estudios de complementación funcional

Los resultados obtenidos indican que las mutaciones en *NDUFAF6* en el paciente conducen a una caída de la expresión a nivel de transcrito y proteína de *NDUFAF6*, relacionadas con la dificultad de ensamblaje del complejo I y la reducción de su actividad en gel. Para confirmar que estos resultados se debían a las mutaciones en *NDUFAF6*, se realizaron ensayos de complementación genética en los fibroblastos P3 y Ci. Para ello, el gen *NDUFAF6* se amplificó a partir de RNA de fibroblastos derivados de un control y se introdujo en las líneas celulares mediante vectores lentivirales. A partir de ahora las células se denominarán con el superíndice *NDUFAF6*-WT (P3^{*NDUFAF6*-WT} y Ci^{*NDUFAF6*-WT}).

4.4.1. Medida de los niveles de expresión de *NDUFAF6*

Para determinar si se había logrado la sobreexpresión del transgén, se cuantificaron los niveles de transcrito mediante qPCR.

Los niveles de transcrito de *NDUFAF6* aumentaron significativamente tanto en la línea generada a partir del control ($972,80\% \pm 74,47$) como del paciente ($963,8\% \pm 73,78$) respecto a sus controles (Figura 4.7).

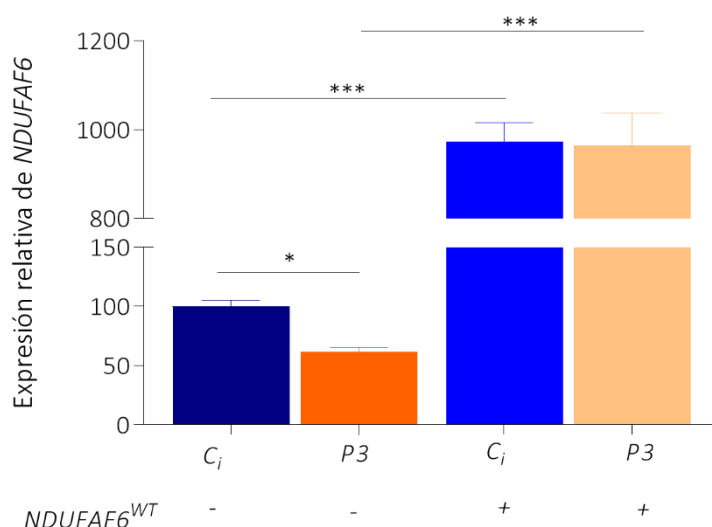


Figura 4.7 Niveles de expresión del transcrito de *NDUFAF6* en fibroblastos C_i, P3, C_i^{NDUFAF6-WT} y P3^{NDUFAF6-WT}. Los datos se presentan como la media \pm SD (desviación estándar) de la expresión de *NDUFAF6* (n=3). *NDUFAF6*: C_i: $100 \pm 9,27$; P3: $61,73 \pm 6,2$, C_i^{NDUFAF6-WT}: $972,78 \pm 74,47$, P3^{NDUFAF6-WT}: $963,84 \pm 73,78$. La significación estadística se evaluó con el test ANOVA t-test (unpaired), *p < 0,05, ***p < 0,001, comparando con C_i.

A continuación, se estudiaron los niveles de expresión de proteína *NDUFAF6* en las nuevas células generadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección.

Se detectó una banda muy intensa que correspondía a la expresión de *NDUFAF6* en las nuevas células generadas (C_i^{NDUFAF6-WT} y P3^{NDUFAF6-WT}) (Figura 4.8), a pesar de que en estas calles se cargó 6 veces menos cantidad de proteína que en las líneas control (C y C_i) y paciente P3. Estos resultados indican que las líneas C_i^{NDUFAF6-WT} y P3^{NDUFAF6-WT} muestran una clara sobreexpresión de la proteína *NDUFAF6*.

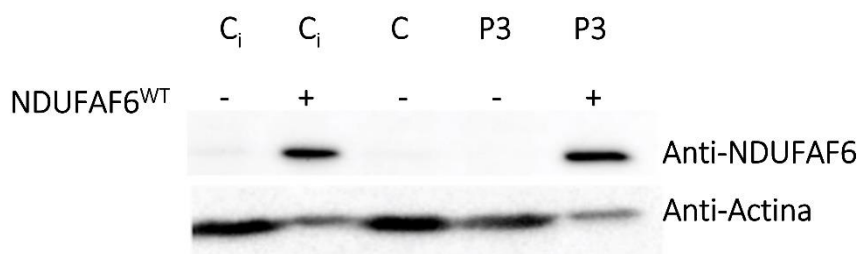


Figura 4.8 Imagen de la inmunodetección de la proteína NDUFAF6 en fibroblastos control inmortalizados (C_i), fibroblastos control (C) y fibroblastos del paciente P3, y en fibroblastos sobreexpresando NDUFAF6-WT (C_i^{NDUFAF6-WT}, P3^{NDUFAF6-WT}). Se cargaron 10 µg de proteína total en C_i, C y P3, y 60 µg de proteína total en C_i^{NDUFAF6-WT} y P3^{NDUFAF6-WT}.

4.4.2. Determinación de la actividad y la cantidad de complejo I maduro mediante Blue Native-PAGE

Para evaluar si la complementación genética llevaba a la recuperación de la actividad y la cantidad de complejo I en los fibroblastos del paciente, se estudiaron las fracciones mitocondriales aisladas de los fibroblastos mediante electroforesis nativas Blue Native-PAGE.

Como se muestra en la Figura 4.9, la actividad del complejo I se recuperó en las células del paciente después de sobreexpresar la variante silvestre de *NDUFAF6*.

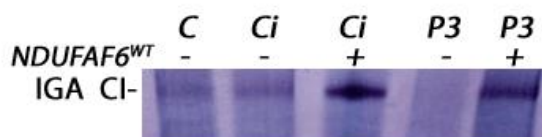


Figura 4.9 Medida de la actividad enzimática del complejo I en gel en mitocondrias aisladas de fibroblastos derivados de control (C, C_i), derivados de paciente 3 (P3), y de aquellos sobreexpresando NDUFAF6^{WT}.

El complejo I ensamblado no se detectó en los mitoplastos aislados de P3 (cuarta calle del gel Figura 4.10 y Figura 4.9), sin embargo, se detectó cuando se partió de fibroblastos P3 transducidos con la variante silvestre de *NDUFAF6* (P3^{NDUFAF6-WT}), a la misma altura que en fibroblastos C y C_i^{NDUFAF6-WT}.

Estos resultados indican que el aumento de la actividad del complejo I se debe al aumento del complejo I maduro que se logra en los fibroblastos del paciente, tras sobreexpresar la variante silvestre de *NDUFAF6*.

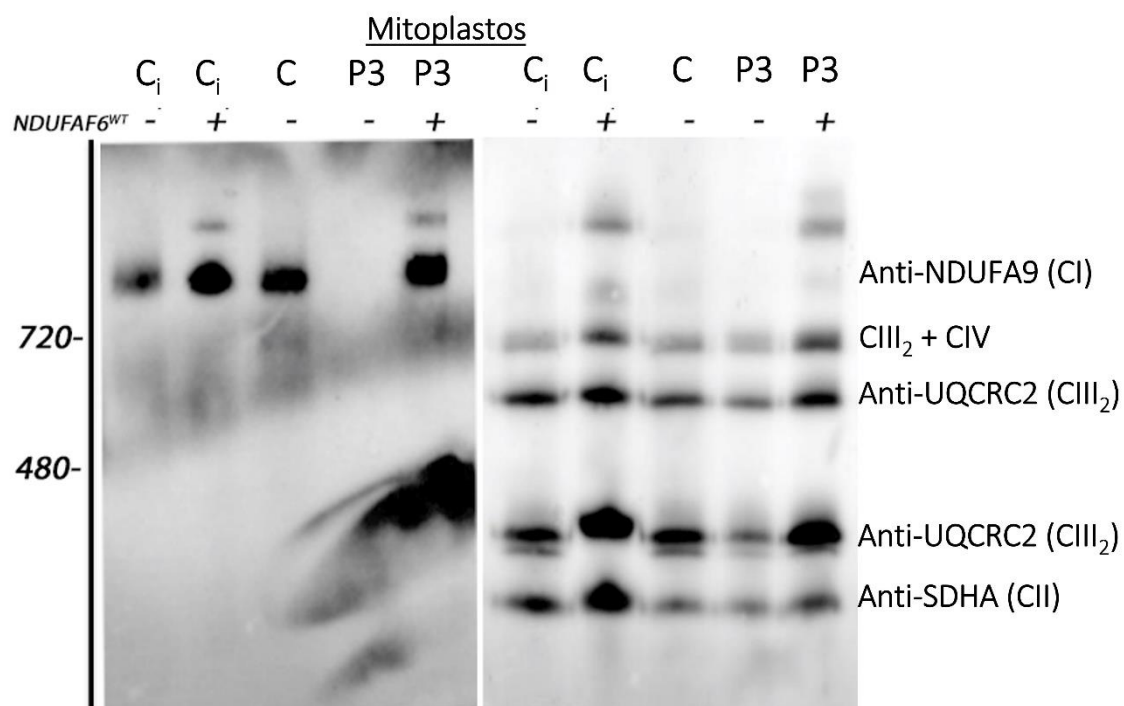


Figura 4.10 Imagen de la inmunodetección de la cantidad de complejo I maduro. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitoplastos de fibroblastos Ci, Ci^{NDUFA6-WT}, C, P3 y P3^{NDUFA6-WT}, mediante Blue Native-PAGE. También se inmunodetectaron los complejos III y IV. El complejo II se utilizó como control. Se cargaron 8 µg de mitoplastos por calle.

4.5. Discusión

Se han estudiado tres hermanos con distonía progresiva y necrosis estriatal en la infancia. Mediante secuenciación masiva se detectaron dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *NDUFAF6* en los tres hermanos. *NDUFAF6* es un factor de ensamblaje esencial para la maduración y actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones. Una de las mutaciones detectadas (c.371T>C; p.Ile124Thr) se había descrito previamente en dos pacientes no relacionados (Kohda et al., 2016). Los hermanos fueron diagnosticados con el síndrome de Leigh, que es una condición neurodegenerativa progresiva en la infancia, niñez o adolescencia, caracterizada por retraso psicomotor o regresión, hipotonía, distonía, ataxia, espasticidad, convulsiones y disfunción en el bulbo raquídeo. El Síndrome de Leigh puede ser causado por mutaciones en al menos 80 genes diferentes (Craven et al., 2017).

La expresión del transcrito *NDUFAF6* y de la proteína se vieron reducidas significativamente en fibroblastos del paciente. Además, los niveles de ATP mitocondrial se redujeron en los fibroblastos del paciente respecto a los fibroblastos control, resultado que podría deberse al déficit de complejo I (Distelmaier et al., 2009).

El ensamblaje defectivo del complejo I maduro es una característica común entre la mayoría de los pacientes descritos con mutaciones en *NDUFAF6* (Tabla 1.1). Solamente 3 de los 25 pacientes descritos con mutaciones en *NDUFAF6* presentaron valores normales de ensamblaje del complejo I, en el resto se redujo considerablemente en fibroblastos o en muestras de músculo. La reducción podría deberse a que la disminución de la expresión de la proteína *NDUFAF6* como consecuencia de las mutaciones que portan los pacientes, impide el ensamblaje correcto del complejo I (Pagliarini et al., 2008). No se detectó el complejo I ensamblado en nuestro paciente cuando se inmunodetectó con el anticuerpo frente a la proteína *NDUFS3*, que participa en las primeras fases de formación del complejo I, indicando que las mutaciones en *NDUFAF6* impiden el ensamblaje del complejo I desde las primeras etapas, tal y como se describió en un caso previo (Bianciardi et al., 2016), y como ocurre tras la supresión de la expresión de *NDUFAF6* mediante de RNA de interferencia en fibroblastos humanos (Pagliarini et al., 2008).

Los análisis de complementación (Rodenburg, 2018) con el gen silvestre *NDUFAF6* permitieron recuperar los niveles de transcrito y de proteína, y los niveles de la actividad y cantidad de complejo I maduro aumentaron notablemente. La recuperación de la actividad del complejo I dada por la sobreexpresión de *NDUFAF6* silvestre también se observó en los fibroblastos derivados del paciente estudiado por Pagliarini et al. (Pagliarini et al., 2008); y en uno de los hermanos estudiados por Bianciardi et al., y McKenzie et al. (Bianciardi et al., 2016; McKenzie et al., 2011). En

nuestro estudio, además de identificar las variantes en el gen *NDUF6* mediante secuenciación de nueva generación, los ensayos funcionales de complementación genética nos permitieron obtener la evidencia conclusiva de la patogenicidad de esta familia.

Puesto que en 14 pacientes (10 no relacionados) con mutaciones en *NDUF6* de los 25 publicados están diagnosticados con el Síndrome de Leigh, el gen *NDUF6* podría establecerse definitivamente como un gen asociado con el síndrome de Leigh (Bianciardi et al., 2016).

4.6. Conclusiones

Las conclusiones que se han extraído de la realización de este estudio son:

1. Los ensayos funcionales de complementación genética determinan que la combinación de las dos mutaciones autosómicas recesivas en heterocigosis compuesta p.Ile124Thr y p.Tyr187AsnfsTer65 en *NDUF6* producen la caída de la expresión a nivel de transcrito y de proteína que codifica, impidiendo el ensamblaje del complejo I y reduciendo su actividad.
2. El gen *NDUF6* debería incluirse en el diagnóstico diferencial de pacientes con el síndrome de Leigh.

CAPITULO III – Estudio del gen *ATAD3C*

5. CAPITULO III – Estudio del gen *ATAD3C*

5.1. Caso clínico

El paciente es un niño de ocho años con cuadro de síndrome hipotónico y retraso en el desarrollo psicomotor. El parto fue distócico, el paciente ingresó en neonatología por fiebre intraparto. Con 8-9 meses de edad, el paciente permanecía sin sostén cefálico y muy irritable. La analítica completa fue normal a excepción de un aumento del nivel de lactato en plasma. Tanto la histoquímica de la biopsia muscular como el estudio de la cadena respiratoria fueron normales. En la última exploración se le diagnosticó parálisis cerebral, tetraparesia espástica, retraso severo del lenguaje y trastorno del movimiento, que incluye temblor y mioclonías.

5.2. Análisis genético

El DNA mitocondrial del paciente se estudió a partir de una muestra de músculo en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y no se encontraron mutaciones puntuales, tampoco se detectó depleción del DNA mitocondrial. No se estudiaron delecciones. A continuación, se secuenciaron los exomas del niño y de sus padres a partir de DNA genómico de muestras de sangre. En el paciente no se identificó, *a priori*, ninguna variante patogénica previamente descrita en las bases de datos y bibliografía consultadas y que se asocie con el fenotipo objeto de estudio.

Posteriormente, se reevaluó el exoma y, por un lado, se detectó una variante en hemicigosis en el gen *MAGIX* (cromosoma X, ENST00000595224.5), c.449C>T, que provoca un cambio de aminoácido de prolina a leucina en la posición 150 (p.Pro150Leu). La misma variante fue encontrada en heterocigosis en su madre. Por otro lado, se detectaron dos mutaciones en heterocigosis compuesta en el gen *ATAD3C* (cromosoma 1) (ENST00000378785.7). La primera variante, c.692T>C, en el paciente provoca un cambio de aminoácido de leucina a prolina en la posición 231 (p.Leu231Pro) y se encuentra en heterocigosis en el genoma materno. La segunda variante c.152+1G>A, se encontró también en heterocigosis en el genoma paterno.

En este momento, recibimos los fibroblastos derivados del paciente (P) en nuestro laboratorio para realizar un estudio molecular del efecto de las mutaciones en ambos genes. En la actualidad, no se han identificado mutaciones en ninguno de ellos que se asocien a patología humana.

En primer lugar, se estudió la prevalencia en la población de la mutación en *MAGIX*, que fue identificada como probablemente patogénica por el predictor *PolyPhen-2* (Score 1.00). Se utilizó la

base de datos *gnomAD* (*The Genome Aggregation Database* (Karczewski et al., 2020)), que recopila 125748 exomas y 15708 genomas de individuos no relacionados (un total de 141456 individuos) que se alinean contra el genoma humano GRCh37. La variante p.Pro150Leu en *MAGIX* se encontró en hemigiosis en otros 55 hombres, de los cuales no se tiene información sobre su estado clínico, pero la base de datos elimina los casos con enfermedad pediátrica severa. Por tanto, descartamos continuar con el estudio de este gen.

A continuación, las mutaciones en *ATAD3C* se confirmaron mediante extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación Sanger (Figura 5.1). La variante c.692T>C no se ha descrito previamente en *gnomAD*, por el contrario, la variante intrónica (c.152+1G>A) se describió en homocigosis en un individuo, SNP (rs764542022), con una frecuencia del alelo de 3.57e-5 en la población general en *gnomAD*. Los predictores de patogenicidad utilizados identifican a la variante c.692T>C como muy probablemente patogénica (*MutationTaster (disease causing)*, *PolyPhen-2 (Score 1.00)*). En el caso de la variante c.152+1G>A, ambos predictores y *The Human Splicing Finder system* (<https://hsf.genomnis.com/>), la predicen como generadora de un cambio en el sitio donante de *splicing*, afectando a la maduración del mRNA del gen *ATAD3C*.

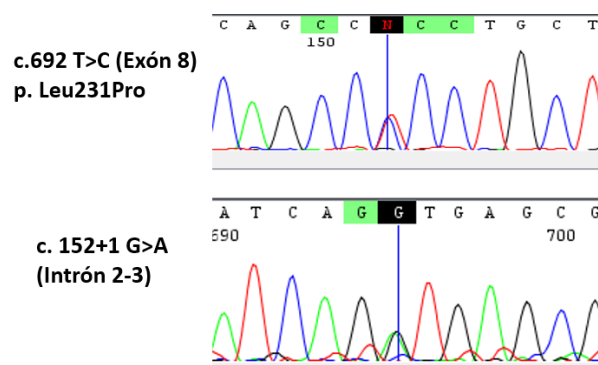


Figura 5.1 Mutaciones en el gen *ATAD3C* en los fibroblastos del paciente. El electroferograma superior muestra la mutación c.692T>C (p.Leu231Pro) en heterocigosis en los fibroblastos del paciente. El electroferograma inferior muestra la mutación c.152+1G>A en heterocigosis en los fibroblastos del paciente.

5.3. Estudio de la expresión de *ATAD3C* y comparación con la de *ATAD3B* y *ATAD3A*

El gen *ATAD3C* se ha considerado que podría ser un pseudogén (Harel et al., 2016, Yap et al., 2021). Por ello, para poder determinar si da lugar a una proteína que pueda causar la patología del paciente, comenzamos estudiando la expresión de *ATAD3C* en relación con sus parálogos *ATAD3A* y *ATAD3B*.

5.3.1. Expresión de genes *ATAD3* humanos en tejidos

La expresión de los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* es media-baja y la de *ATAD3C* baja en 52 tipos de tejidos de 948 individuos analizados por RNA-Seq, según datos del Proyecto *Genotype-Tissue Expression (GTEx)* (Papatheodorou et al., 2020) (Anexo I, Tabla 9.1). A pesar de que *ATAD3A* y *ATAD3B* presentan mayor expresión que *ATAD3C* en todos los tejidos, *ATAD3C* se expresa en tejidos, que incluyen partes del cerebro como cerebelo, hipotálamo e hipocampo. Su expresión en fibroblastos de la piel transformados, en el mismo estudio, es de 0,6 transcritos por millón (TPM), siendo 0,5 el valor umbral de detección. La expresión de *ATAD3A* y *ATAD3B* en fibroblastos transformados es de 30 y 13 TPMs respectivamente.

La base de datos *Human Protein Atlas* (Thul et al., 2017) recoge los niveles de expresión de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* en numerosas líneas celulares establecidas. De acuerdo con estos datos de RNA-Seq, *ATAD3C* tiene valores de expresión cercanos al límite de detección, 16 de 65 líneas celulares analizadas están por encima del límite de detección. La línea celular con mayor expresión fue RPMI-8226 (16,5 NX). Como ocurría en tejidos, la expresión en las líneas celulares también fue mayor en todos los casos para los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* que para *ATAD3C*. La Tabla 5.1 recoge los valores para tres líneas celulares con las que trabajaremos en esta tesis.

Tabla 5.1 Comparación de los niveles de expresión de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* en diferentes líneas celulares medidas mediante RNA-Seq. Datos obtenidos de la base de datos *Human Protein Atlas* (Thul et al., 2017) (accedido el 24/04/2021). Los resultados de la secuenciación de RNA (RNA-Seq) generados se exportaron como valores NX normalizados (NX indica expresión normalizada). En la base de datos, un valor de NX 1,0 se define como el umbral de la expresión de la proteína correspondiente.

Datos de expresión de RNA (NX) de líneas celulares	<i>ATAD3A</i>	<i>ATAD3B</i>	<i>ATAD3C</i>
RPMI-8226	24,2	7,1	16,5
HEK293	32,0	13,3	1,3
SH-SY5Y	10,5	7,2	1,0

5.3.2. Medida de la expresión de los transcritos de *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* mediante qPCR

Puesto que la expresión del gen *ATAD3C* en fibroblastos transformados, medida mediante RNA-Seq, da un valor por encima del umbral de detección, decidimos comparar su expresión con la de *ATAD3A* y *ATAD3B*, en fibroblastos C y P utilizando ensayos de qPCR con sondas TaqMan.

Se comenzó diseñando oligonucleótidos específicos para clonar, a partir de RNA celular los cDNA correspondientes a la proteína ATAD3C (Q5T2N8-1), a las isoformas Q9NVI7-1 y Q9NVI7-2 de la proteína ATAD3A (utilizando los mismos oligonucleótidos para ambas isoformas), y a las isoformas Q5T9A4-1 y Q5T9A4-3 de la proteína ATAD3B (el comienzo de las secuencias es diferente por lo que se diseñó un oligonucleótido directo para cada isoforma y un oligonucleótido reverso común) (ver las isoformas de las proteínas en la Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Principales isoformas de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C recogidas en las bases de datos *Uniprot* (Bateman et al., 2021) y *Ensembl* (Yates et al., 2020). En sombreado se destacan las isoformas clonadas en este trabajo. En la base de datos *Uniprot* se describe una única isoforma de la proteína ATAD3C en humanos, mientras que para las proteínas ATAD3A y ATAD3B se recogen tres isoformas de cada una. Las isoformas con las que hemos trabajado son la isoforma 1 de ATAD3C, la isoforma 2 de ATAD3A y la isoforma 1 de ATAD3B.

Proteína	Isoforma	Correspondencia con <i>Ensembl</i> (ID de transcrito)	Longitud (bp)	Longitud (aa)	Masa (kDa)
ATAD3C (<i>Uniprot</i> Q5T2N8)	Isoforma 1: Q5T2N8-1	ATAD3C-201 ENST00000378785.7 NM_001039211.3	3864	411	46,380
ATAD3A (<i>Uniprot</i> Q9NVI7)	Isoforma 1: Q9NVI7-1 (canónica)	ATAD3A-202 ENST00000378755.9	2612	634	71,369
	Isoforma 2: Q9NVI7-2 (predominante)	ATAD3A-203 ENST00000378756.8 NM_001170535.3	2481	586	66,218
	Isoforma 3: Q9NVI7-3	ATAD3A-207 ENST00000536055.6	2330	507	57,948
ATAD3B (<i>Uniprot</i> Q5T9A4)	Isoforma 1: Q5T9A4-1 (canónica)	ATAD3B-206 ENST00000673477.1 NM_031921.6	4098	648	72,573
	Isoforma 2: Q5T9A4-2	-	-	166	19,508
	Isoforma 3: Q5T9A4-3	NM_001317238.2	1809	602	67,608

No se consiguió clonar ninguno de los cDNA a partir de RNA derivado de fibroblastos C. Por este motivo, se probó con RNA derivado de otras líneas celulares. Se consiguió clonar el cDNA de ATAD3C a partir de la línea celular RPMI, la de mayor expresión del gen según datos del *Human Protein Atlas* (Thul et al., 2017). El cDNA correspondiente a la isoforma predominante de ATAD3A (Q9NVI7-2) se clonó a partir de la línea celular HEK293T. A partir de HEK293T también se clonó el

cDNA correspondiente a la isoforma 3 de *ATAD3B* (Q5T9A4-3). Sin embargo, no se consiguió clonar la isoforma de *ATAD3B* considerada canónica (isoforma Q5T9A4-1) a partir de ninguna línea celular (RPMI, HEK293T o SH-SY5Y), por tanto, se obtuvo de la casa comercial DHARMACON (*Apartado 7.3.8.1*).

Puesto que los tres genes de la familia *ATAD3* tienen alta homología entre sí, se utilizaron los cDNAs clonados para estudiar la especificidad de las sondas TaqMan comerciales diseñadas para detectar los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* respectivamente. Cada una de las tres sondas comerciales TaqMan resultó específica para el gen para el que está diseñada (*Apartado 7.3.13.3*).

La sonda TaqMan específica de *ATAD3B* es capaz de detectar la isoforma 1 y la isoforma 3 (Anexo I, Figura 9.1), resultando imposible determinar cuál de las dos isoformas se detectan.

5.3.3. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* en líneas celulares

Antes de llevar a cabo la cuantificación de la expresión usando ensayos de qPCR con las sondas TaqMan específicas para cada gen, se determinó la eficiencia de los ensayos en fibroblastos y en las líneas celulares RPMI, HEK293T y SH-SY5Y (*Apartado 7.3.13.4*). La eficiencia de los ensayos de detección de *ATAD3A* y *ATAD3B* fue 2 para las cuatro líneas celulares, indicando que el ensayo es altamente eficiente en el rango estudiado (Pfaffl, 2001). Sin embargo, el ensayo para detectar *ATAD3C* solo dio un valor de eficiencia igual a 2 para la línea celular RPMI, por lo que solo fue posible medir su expresión en esta línea.

El valor de expresión obtenido para los genes *ATAD3B* y *ATAD3C* se comparó con el obtenido para *ATAD3A* en una misma línea celular (Figura 5.2 A.). La expresión de *ATAD3B* fue semejante a la de *ATAD3A* en las líneas HEK293T y SH-SY5Y, pero fue significativamente menor que la expresión de *ATAD3A* en la línea RPMI ($13,33 \% \pm 3,35$), y en los fibroblastos C ($48,81 \% \pm 23,78$) y P ($45,32 \% \pm 26,48$). La expresión de *ATAD3C*, en la única línea celular en la que pudimos medir, RPMI, fue significativamente menor que la de *ATAD3A* ($8,09 \% \pm 2,4$).

A continuación, se compararon las cuantificaciones de los transcritos de *ATAD3A* y *ATAD3B* entre las líneas celulares. Como se muestra en la Figura 5.2 B., las diferencias de expresión tanto de *ATAD3A* como de *ATAD3B* fueron significativas para todas las líneas celulares cuando se compararon con la expresión obtenida para la línea HEK293T (considerada el 100 %). Los niveles más elevados de transcrito para *ATAD3A* se encontraron en la línea RPMI 8226 ($113,44 \% \pm 8,67$), seguida de la línea celular HEK293T (considerada el 100 % $\pm 3,73$) y de SH-SY5Y ($26,31 \% \pm 2,57$), y, por último, de los fibroblastos C ($10,38 \% \pm 2,03$) y P ($11,75 \% \pm 1,71$). Para *ATAD3B*, la expresión fue mayor en las

células HEK293T ($100 \% \pm 7,35$), seguida de SH-SY5Y ($38,35 \% \pm 25,32$), RPMI ($22,86 \% \pm 5,75$) y fibroblastos ($5,39 \% \pm 1,92$ para C y $4,78 \% \pm 1,19$ para P).

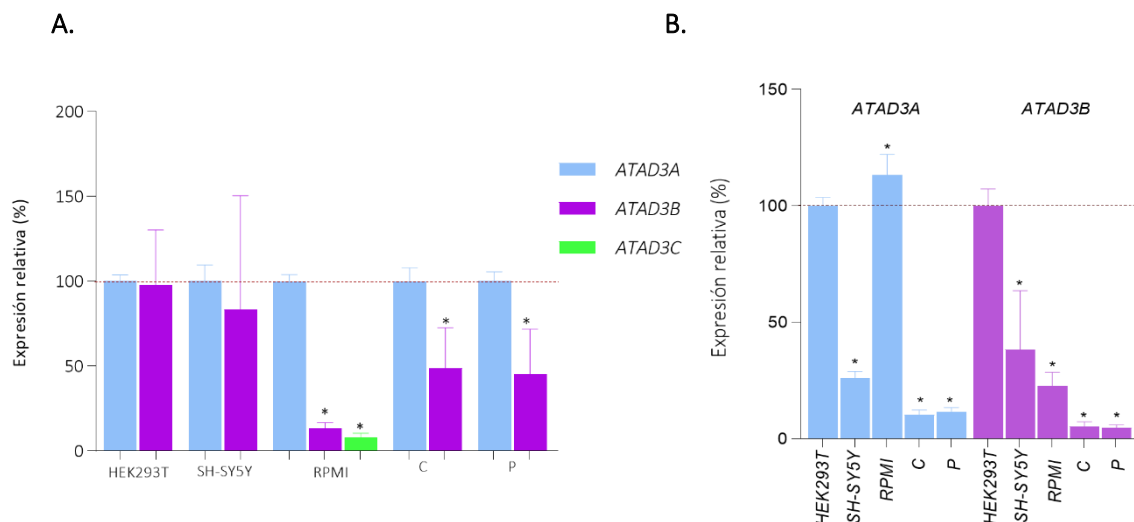


Figura 5.2 A. Niveles de expresión del transcrito de ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en las diferentes líneas celulares. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) de la expresión de ATAD3A, ATAD3B o ATAD3C ($n=3$). *Expresión relativa (%)*: HEK293T ATAD3A: $100 \pm 3,73$; HEK293T ATAD3B: $97,68 \pm 32,56$; SH-SY5Y ATAD3A: $100 \pm 9,51$; SH-SY5Y ATAD3B: $83,6 \pm 66,8$; RPMI ATAD3A: $100 \pm 3,97$; RPMI ATAD3B: $13,33 \pm 3,35$; RPMI ATAD3C: $8,09 \pm 2,4$; C ATAD3A: $100 \pm 7,96$; C ATAD3B: $48,81 \pm 23,78$; P ATAD3A: $100 \pm 5,52$; P ATAD3B: $45,32 \pm 26,48$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la expresión en ATAD3A en cada línea celular (línea de puntos).

B. Niveles de expresión del transcrito de ATAD3A y ATAD3B en las diferentes líneas celulares. Los datos se representan como la media \pm SD de la expresión de ATAD3A, ATAD3B o ATAD3C ($n=3$). *Expresión relativa (%)*: HEK293T ATAD3A: $100 \pm 3,73$; SH-SY5Y ATAD3A: $26,31 \pm 2,57$; RPMI ATAD3A: $113,44 \pm 8,67$; C ATAD3A: $10,38 \pm 2,03$; P ATAD3A: $11,75 \pm 1,71$; HEK293T ATAD3B: $100 \pm 7,35$; SH-SY5Y ATAD3B: $38,35 \pm 25,32$; RPMI ATAD3B: $22,86 \pm 5,75$; C ATAD3B: $5,39 \pm 1,92$; P ATAD3B: $4,78 \pm 1,19$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la expresión en ATAD3A o ATAD3B en la línea HEK293T, considerada el 100 % (línea de puntos).

La comparación de la expresión de ATAD3A y ATAD3B entre fibroblastos C y P (Figura 5.3), no mostró diferencias significativas.

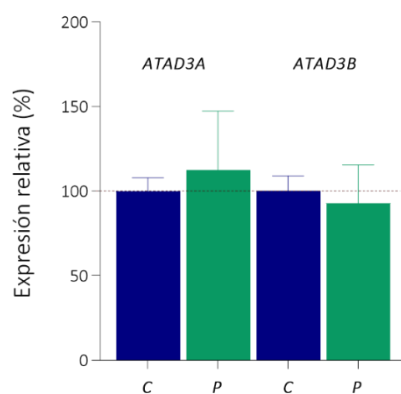


Figura 5.3. Niveles de expresión de los transcritos de ATAD3A y ATAD3B en fibroblastos control (C) y paciente (P). Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) ($n=3$) de la expresión relativa de ATAD3A o ATAD3B. *Expresión relativa (%)*: C ATAD3A: $100 \pm 7,96$; P ATAD3A: $112,76 \pm 34,6$; C ATAD3B: $100,02 \pm 9,07$; P ATAD3B: $92,87 \pm 22,77$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la expresión en ATAD3A o ATAD3B en la línea C, considerada el 100 % (línea de puntos).

Los datos de expresión de los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* medidos mediante qPCR son similares a los valores medidos por RNA-Seq (Thul et al., 2017) para las mismas líneas celulares (Tabla 5.1). Sin embargo, no se detectó expresión del transcrito de *ATAD3C* en nuestros ensayos de qPCR en las líneas en las que mediante RNA-Seq la expresión está muy cerca del umbral de detección: fibroblastos, HEK293T y SH-SY5Y.

Puesto que el gen *ATAD3* se considera importante para la correcta estructura de la membrana mitocondrial (Peralta et al., 2018), se estudió el comportamiento de *ATAD3A* y *ATAD3B* en condiciones de biogénesis mitocondrial midiendo la variación de la expresión de los transcritos en las diferentes líneas celulares en un medio rico con galactosa en lugar de glucosa.

En las líneas celulares HEK293T y SH-SY5Y el nivel de transcrito de *ATAD3A* aumentó significativamente en el medio que contenía galactosa ($135,52 \% \pm 20,52$ en HEK293T y $155,17 \% \pm 32,88$ en SH-SY5Y) (Figura 5.4). Mientras que la expresión disminuyó significativamente en el medio con galactosa en los fibroblastos C ($79,58 \% \pm 11,83$). La diferencia de expresión en los fibroblastos P no fue significativa.

Los resultados obtenidos para el transcrito *ATAD3B* fueron semejantes a los de *ATAD3A*; *ATAD3B* aumentó significativamente en la línea celular HEK293T cuando se creció en un medio con galactosa ($159,67 \% \pm 19,03$) (Figura 5.4). A pesar de que los valores no son significativos, la expresión mostró tendencia a aumentar en el medio con galactosa en la línea SH-SY5Y ($108,63 \% \pm 45,05$). La expresión de *ATAD3B* también disminuyó significativamente en medio con galactosa en el caso de fibroblastos C ($63,72 \% \pm 13,17$).

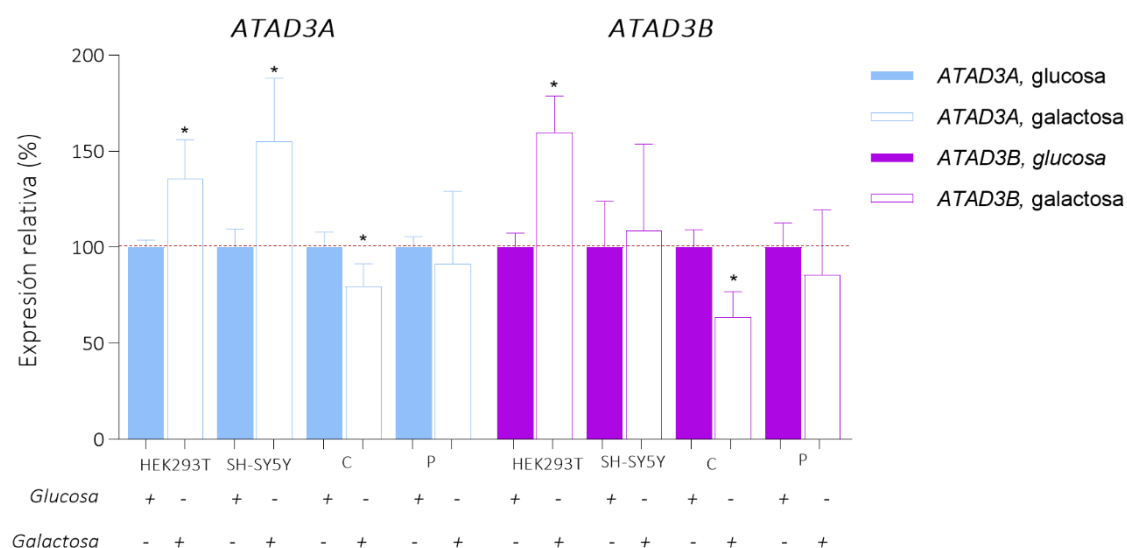


Figura 5.4. Niveles de expresión de los transcritos de ATAD3A y ATAD3B en las diferentes líneas celulares en diferentes medios de cultivo (glucosa y galactosa). Los datos se representan como la media \pm SD (n=3) de la expresión relativa de ATAD3A o ATAD3B. Expresión relativa (%): 293T glucosa ATAD3A: $100 \pm 3,73$; 293T galactosa ATAD3A: $135,52 \pm 20,52$; SH-SY5Y glucosa ATAD3A: $100 \pm 9,51$; SH-SY5Y galactosa ATAD3A: $155,17 \pm 32,88$; C glucosa ATAD3A: $100 \pm 7,96$; C galactosa ATAD3A: $79,58 \pm 11,83$; P glucosa ATAD3A: $100 \pm 5,52$; P galactosa ATAD3A: $91,43 \pm 37,65$; 293T glucosa ATAD3B: $100 \pm 7,35$; 293T galactosa ATAD3B: $159,67 \pm 19,03$; SH-SY5Y glucosa ATAD3B: $100 \pm 23,89$; SH-SY5Y galactosa ATAD3B: $108,63 \pm 45,05$; C glucosa ATAD3B: $100 \pm 9,07$; C galactosa ATAD3B: $63,72 \pm 13,17$; P glucosa ATAD3B: $100 \pm 12,66$; P galactosa ATAD3B: $85,79 \pm 33,73$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la expresión en ATAD3A o ATAD3B en cada línea celular en el medio de cultivo rico en glucosa, considerada el 100 % (línea de puntos).

5.4. Estudio de la expresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C

Para estudiar la expresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en las líneas celulares se utilizaron anticuerpos comerciales. Teniendo en cuenta que la alta homología existente entre las tres proteínas, para facilitar la interpretación de los resultados de inmunodetección se generaron líneas celulares derivadas de HEK293T sobreexpresando cada una de las tres proteínas. Las nuevas líneas generadas se denominarán con la proteína expresada en el superíndice: HEK293T^{ATAD3A}, HEK293T^{ATAD3B} y HEK293T^{ATAD3C}.

Para detectar la proteína ATAD3C se probó un anticuerpo de Sigma (SAB1305852). Este, no detectó ninguna banda ni en extractos celulares ni mitocondriales de la línea celular HEK293T. A continuación, se probó un anticuerpo de la casa comercial Origene (Anexo I, Figura 9.4), que tampoco detectó la proteína en un extracto celular de HEK293T. Cuando se sobreexpresó la proteína (HEK293T^{ATAD3C}), con este anticuerpo se observó una banda tenue del tamaño esperado en el extracto celular, además de bandas inespecíficas. En un extracto mitocondrial aislado a partir de la

línea celular HEK293T se detectó la proteína ATAD3C a 46 kDa, sin embargo, de nuevo se detectaron con mayor intensidad bandas inespecíficas, aproximadamente a 55 kDa y 27 kDa.

Puesto que no se encontró un anticuerpo comercial para inmunodetectar la proteína ATAD3C, se adicionó el epítipo HA a la secuencia del cDNA de *ATAD3C* (línea HEK293T^{ATAD3C-HA}). Se generó además la línea HEK293T^{ATAD3C-L231P-HA}, con una versión de *ATAD3C-HA* que contiene la mutación del paciente c.6952T>C (p.Leu231Pro, L231P). Para futuros ensayos, también se añadió el epítipo -HA a los genes *ATAD3A* y *ATAD3B*, generando así las líneas celulares HEK293T^{ATAD3A-HA} y HEK293T^{ATAD3B-HA}.

El anticuerpo frente el epítipo HA (Figura 5.5) permitió confirmar que, en la línea HEK293T^{ATAD3C-HA}, el gen *ATAD3C* genera una proteína. La localización subcelular de la proteína ATAD3C se estudió a continuación mediante inmunofluorescencia (Anexo I, Figura 9.3). Se observó que la expresión de la proteína en la población celular no era homogénea, sino que se detectaron células con diferentes grados de expresión. A pesar de ello, la superposición de las imágenes de la proteína ATAD3C-HA marcada en verde (anti-HA y anticuerpo secundario Alexa fluor 488) y la mitocondria marcada en rojo (anti-SDHA, proteína de la membrana interna mitocondrial, y el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 594 goat) indicó que estas probablemente colocalizan.

Para detectar ATAD3A se utilizaron dos anticuerpos diferentes, uno procedente de la casa comercial Abnova y otro de Sigma. Ambos anticuerpos son policlonales y se generaron utilizando toda la secuencia de 586 aminoácidos de la isoforma 2 de ATAD3A (Q9NVI7-2). Los anticuerpos detectaron predominantemente ATAD3A en la línea celular HEK293T, sin embargo, también detectaron una banda superior, que se ha identificado en estudios previos como ATAD3B (isoforma 1, Q5T9A4-1) (Shu et al., 2021) (Figura 5.5).

Para inmunodetectar ATAD3B se utilizó un anticuerpo de Sigma dirigido contra la secuencia de aminoácidos 198 a 229 de la isoforma 1 de ATAD3B (Q5T9A4-1) o los aminoácidos 152 a 183 de la isoforma 3 (Q5T9A4-3). El anticuerpo detectó en la línea HEK293T la isoforma canónica (Q5T9A4-1 de 72,573 kDa (banda superior intensa al sobreexpresar ATAD3B). Sin embargo, también detectó una banda que corresponde con el tamaño de la proteína ATAD3A (isoforma 2 de 66,21 kDa, correspondiente a la banda inferior intensa al sobreexpresar ATAD3A) (Figura 5.5 A. y B.).

En la línea RPMI se detectó la proteína ATAD3A pero no ATAD3B cuyo transcrito presentaba baja expresión.

En condiciones de biogénesis mitocondrial se detectó un aumento de la expresión de las proteínas ATAD3A y ATAD3B en las células HEK293T (recuadro rojo Figura 5.5 B., y cuantificación de

la expresión Figura 5.5 C.), concordando con el aumento de mRNA de *ATAD3A* y *ATAD3B* en condiciones de biogénesis mitocondrial detectado por qPCR.

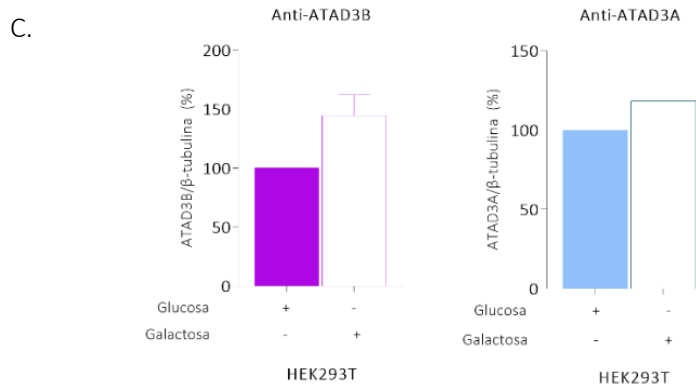
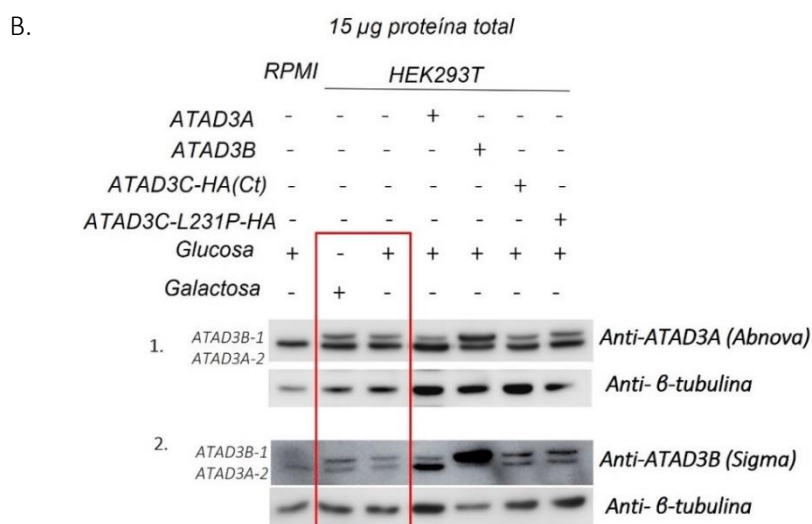
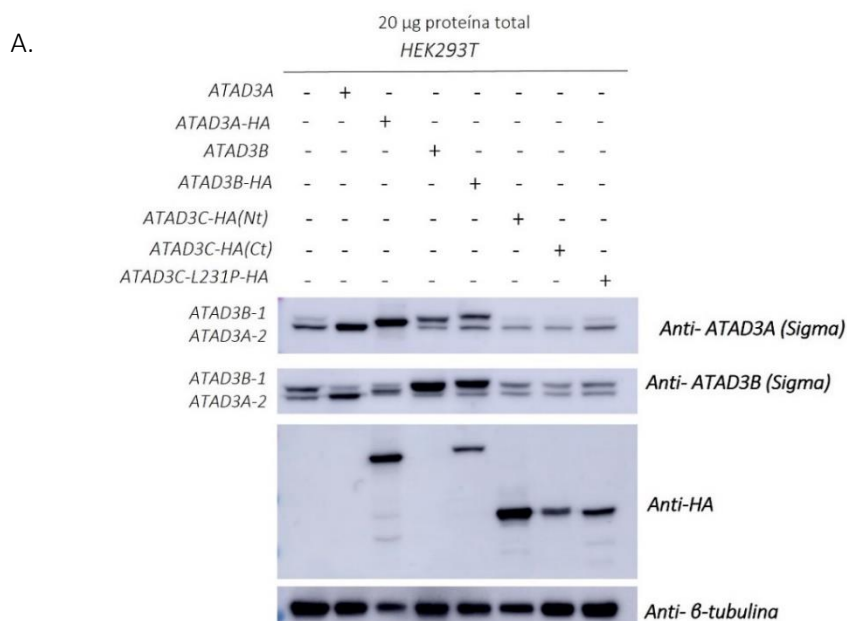


Figura 5.5. Cuantificación de los niveles de proteína ATAD3A y ATAD3B mediante Western Blot en las diferentes líneas celulares. A. y B. Imágenes de la inmunodetección. En el gel **B.** se comparó la expresión en condiciones de biogénesis mitocondrial (galactosa). **C. Representación gráfica de la cuantificación del Western Blot.** Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del % de expresión cuantificada respecto a la expresión de la tubulina en cada membrana y respecto a la línea cultivada en glucosa. Se hizo el promedio de la cuantificación de ATAD3B en 3 geles SDS-PAGE utilizando 2 membranas hibridadas con el anticuerpo anti-ATAD3B (Sigma) y otra membrana hibridada con el anticuerpo anti-ATAD3A (Abnova). El gráfico correspondiente a la expresión de ATAD3A solamente recoge la cuantificación de ATAD3A en un gel SDS-PAGE. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, comparando con HEK293T glucosa.

5.4.1. Estructura primaria de la proteína ATAD3C y analogía con sus parálogos ATAD3A y ATAD3B

La proteína ATAD3C presenta una homología de secuencia del 77,13 % con la proteína ATAD3A (isoforma 2) y del 78,7 % con ATAD3B (isoforma 1) (utilizando la herramienta *protein BLAST*[®], disponible en la web del *National Center for Biotechnology Information*, NCBI).

Para determinar los dominios que comparte ATAD3C con ATAD3A y ATAD3B se utilizaron varias herramientas informáticas de predicción y los resultados se compararon con los dominios predichos para ATAD3A y ATAD3B (Figura 5.6). La herramienta *NPS@* (*Network Protein Sequence Analysis* (Combet et al., 2000)) predijo un único dominio de hélice superenrollada (CC) para ATAD3C, compuesto por los aminoácidos en las posiciones 7 a 40, importantes para las interacciones proteína-proteína y con alta probabilidad de participar en oligomerización (Gilquin, Cannon, et al., 2010). Para ATAD3A-2 y ATAD3B-1, se predijeron dos dominios CC, CC1.

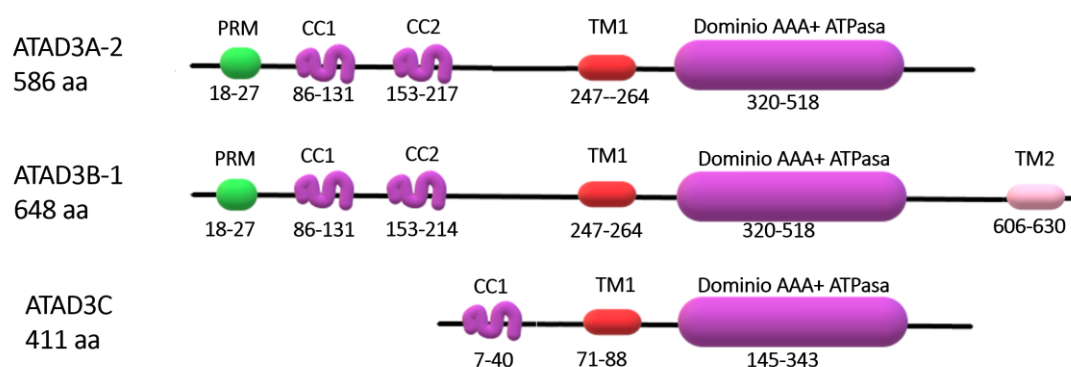


Figura 5.6. Representación lineal de las proteínas humanas ATAD3A (isoforma 2), ATAD3B (isoforma 1) y ATAD3C. PRM, motivo rico en prolina; CC1 y CC2 dominios de hélice superenrollada; TM1 y TM2, dominios transmembrana. Las predicciones se realizaron con los programas *NPS@* (*Network Protein Sequence Analysis*), *TMpred* de *ExPASy* (*Bioinformatics Resource Portal*), *PRED-TMR* (*Prediction of Transmembrane regions in proteins*).

Los predictores *TMpred* de *ExPASy* (*Bioinformatics Resource Portal*, (Hofmann & Stoffel, 1993), *Score* > 500) y *PRED-TMR* (*Prediction of Transmembrane regions in proteins* (Pasquier et al., 1999)) se utilizaron para predecir los dominios transmembrana de las secuencias de las proteínas. Ambos predictores predijeron un dominio transmembrana en ATAD3C, formado por los residuos 71 a 88 (*Score* 999). ATAD3A tendría un sitio transmembrana que abarca los aminoácidos de la posición 247 a 264 (*Score* 1033). Para ATAD3B, se predicen dos dominios transmembrana, el primero del aminoácido 247 a 264 (*Score* 999) y el segundo abarcando los aminoácidos del 606 a 630 (*Score* 730) (*PRED-TMR* únicamente predijo el primer sitio).

En un estudio previo (Baudier, 2018) se indica que ATAD3A y ATAD3B presentan una secuencia rica en prolinas (PRM) en el dominio amino terminal (residuos 18-27) (Figura 5.6), no presente en ATAD3C, que podría ser importante en las interacciones proteína-proteína y en el anclaje a la membrana.

Todas las proteínas de la familia ATAD3 presentan un dominio conservado AAA⁺ ATPasa en el extremo C-terminal caracterizado por los dominios de unión a ATP y ATPasa (Walker A y Walker B) (Gilquin, Taillebourg, et al., 2010). ATAD3C conserva el dominio AAA⁺ ATPasa entre las posiciones 145 y 343 de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas AAA⁺ ATPasa se dividen en numerosas familias, entre ellas, la subfamilia AAA ATPasa se caracteriza por tener un motivo muy conservado en el dominio ATPasa denominado segunda región de homología (SRH) (Lupas & Martin, 2002; Ogura et al., 2004) (*Apartado 1.6.3.1*). El alineamiento de los dominios AAA⁺ ATPasa de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C con miembros de la subfamilia AAA ATPasa (incluyendo FtsH, NSF y p97), mediante el programa de múltiple alineamiento de secuencias *Clustal Omega* de *EMBL-EBI*, indicó que las proteínas ATAD3 contienen el dominio SRH por lo que se podrían clasificar en la subfamilia de AAA ATPasas (Figura 5.7).

Los motivos Walker A y Walker B de las tres proteínas ATAD3 presentaron alta homología con los de las otras AAA ATPasas (Figura 5.7). Las tres proteínas ATAD3 conservan la arginina a continuación del dominio Walker B (arginina 4 en la Figura 5.7). Las tres contienen la arginina localizada en la hélice $\alpha 7$ (sensor 2, arginina 3 en la Figura 5.7), que no es característica de la subfamilia AAA, sin embargo no tienen la localizada en la posición 2 (arginina 2 en la Figura 5.7). El residuo denominado dedo de arginina (arginina 1 en la imagen), que está conservado en la mayoría de las subfamilias AAA⁺, no lo está en ATAD3C.

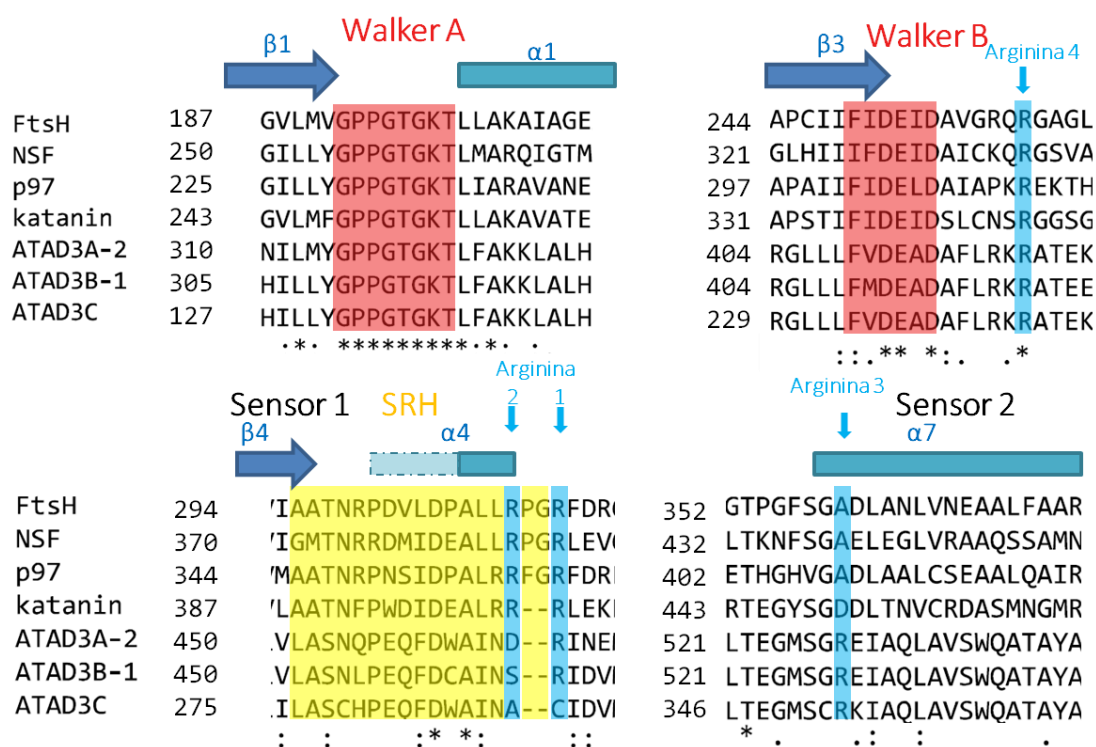


Figura 5.7 Alineamiento múltiple de secuencia de los dominios AAA de las ATPasas. Los motivos Walker A y Walker B y la segunda región de homología (SRH) se indican en rojo y amarillo, respectivamente. Las argininas conservadas se somborean en azul. Se indican las láminas β o hélices α donde se encuentran los aminoácidos destacados. Se indica con * las posiciones que tienen un único residuo conservado entre las secuencias alineadas; con : la conservación entre grupos con propiedades muy similares; y con . la conservación entre grupos con propiedades escasamente similares.

Las AAA ATPasas se pueden subclasificar en clados dependiendo de la posición de la arginina localizada cerca del dedo de arginina. Las proteínas ATAD3A y ATAD3B podrían clasificarse en el clado meiótico, al que pertenece la katanina (*katanin* en la Figura 5.7), debido a que se caracterizan por tener un espacio de dos residuos en el SRH inmediatamente precediendo al dedo de arginina (Frickey & Lupas, 2004) (Figura 5.7).

En el Anexo I, Figura 9.2 y Tabla 9.2 se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína ATAD3C con las de sus parálogos ATAD3A (isoformas 1 y 2) y ATAD3B (isoformas 1 y 3) y se indican los dominios conservados y su localización.

5.4.2. Predicción de la estructura terciaria de la proteína ATAD3C y comparación con sus parálogos

Mediante el programa de predicción *Alphafold* (Jumper et al., 2021), se obtuvieron las predicciones de estructuras terciaria de las tres proteínas ATAD3 y se compararon sus dominios AAA⁺ (Figura 5.8 y secuencias en Anexo I, Figura 9.5).

La estructura del dominio AAA⁺ ATPasa, formado por 198 residuos (aminoácidos 320 – 518) para ATAD3A y ATAD3B, y 117 (residuos 145 – 262) para ATAD3C, coincidía con las estructuras secundarias descritas previamente (Miller & Enemark, 2016). Contendría 5 láminas β rodeadas de las hélices α a ambos lados formando la estructura $\alpha 0 - \beta 1 - \alpha 1 - \beta 2 - \alpha 2 - \beta 3 - \alpha 3 - \beta 4 - \alpha 4 - \beta 5$. En el extremo carboxilo se localizaron las hélices α que forman la cubierta sobre el sitio de unión de nucleótidos ($\alpha 5 - \alpha 6 - \alpha 7 - \alpha 8$). Los aminoácidos que forman las láminas β y hélices α del dominio AAA ATPasa presentaron un valor de precisión de la estimación del plegamiento alto, por encima de 90 coloreados en azul oscuro, y por encima de 70 en azul claro (Figura 5.8).

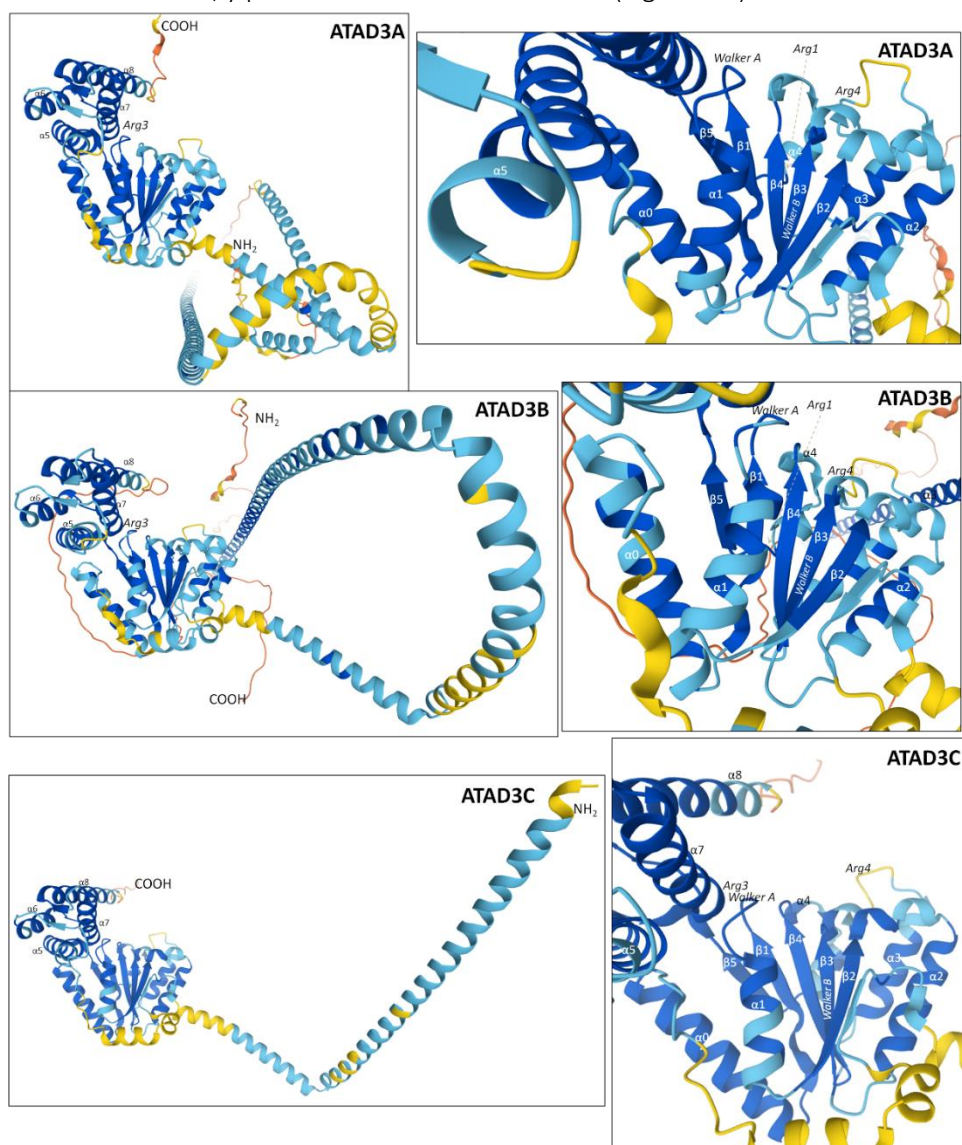


Figura 5.8. Imágenes de las predicciones de las estructuras terciarias de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C obtenidas mediante AlphaFold. En la columna de la izquierda se observa la estructura de toda la proteína, y en la de la derecha se amplía la zona de la secuencia del dominio AAA⁺ ATPasa. Se indican las hélices α y las láminas β en cada estructura y los motivos Walker A, Walker B y las argininas conservadas en las secuencias. AlphaFold predice el plegamiento de las proteínas y presenta un valor de precisión de la estimación del plegamiento por residuo (pLDDT): en azul oscuro, los aminoácidos con un elevado valor de precisión (>90), en azul claro, entre 70 y 90, en color amarillo, los aminoácidos con bajo valor de precisión (50-70), y en naranja con muy poco valor de precisión (<50).

5.5. Estudio de la localización subcelular de la proteína ATAD3C en células HEK293T

La elevada homología de secuencia de ATAD3C con ATAD3A y ATAD3B, descritas como proteínas de la membrana mitocondrial interna (Gilquin, Taillebourg, et al., 2010), sugiere que ATAD3C podría ser una proteína mitocondrial, además el estudio mediante inmunocitoquímica de la línea celular HEK293T^{ATAD3C-HA} indicó colocalización con la mitocondria (Anexo I, Figura 9.3). Para confirmarlo, se estudió su localización subcelular utilizando métodos bioquímicos.

5.5.1. Determinación de la localización subcelular de ATAD3C

Para determinar la localización subcelular de ATAD3C se realizó un subfraccionamiento celular de la línea celular HEK293T^{ATAD3C-HA}. Se separaron tres fracciones, una enriquecida en núcleos (N), otra enriquecida en mitocondrias (mt) y otra en el resto del contenido citoplasmático (Sn, sobrenadante). Se analizaron mediante Western Blot utilizando anticuerpos frente al epítipo HA y frente a proteínas de localización conocida (Figura 5.9).

Los resultados indican que la proteína ATAD3C está enriquecida en la fracción mitocondrial. ATAD3A y ATAD3B también se encontraron en mayor proporción en la fracción mitocondrial, así como todas las proteínas mitocondriales analizadas, tanto de la membrana externa mitocondrial (TOM20 y Porina), como de la membrana interna mitocondrial (Rieske y SDHB), y de la matriz mitocondrial (Hsp60). Además, se utilizó un anticuerpo frente a la proteína GRP78, una chaperona fundamental del retículo endoplasmático (ER) para detectar contaminación con ER (Figura 5.9 A.). La Figura 5.9 B. muestra las proteínas de localización conocida que se utilizaron como controles.

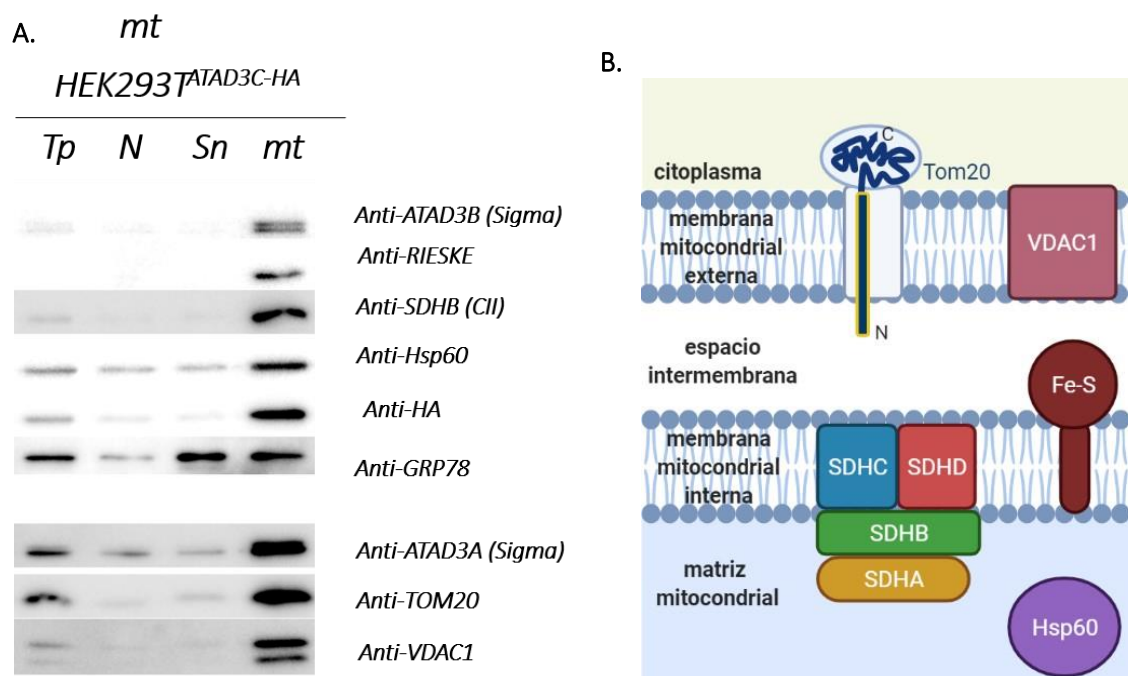


Figura 5.9 A. Imagen de la inmunodetección de las fracciones subcelulares de HEK293T^{ATAD3C-HA} mediante Western Blot. Tp: Proteína total (*Total protein*), N: núcleo, Sn: sobrenadante, mt: fracción mitocondrial. **B. Esquema de las proteínas de localización conocida utilizadas como controles para determinar la localización de ATAD3C.** Tom-20 es una proteína de la membrana mitocondrial externa, cuyo extremo amino se localiza en el espacio intermembrana, a continuación, presenta un dominio transmembrana y su extremo carboxilo se localiza en el citoplasma. El anticuerpo frente a Tom-20 se generó utilizando la secuencia de los primeros 30 aminoácidos de la proteína, que se localiza en el espacio intermembrana y el dominio transmembrana (se señala la zona en color amarillo). La proteína VDAC1 está anclada a la membrana mitocondrial externa. La proteína Fe-S o Rieske se localiza en la membrana mitocondrial interna, accesible desde el espacio intermembrana. La proteína SDHA se localiza en la matriz mitocondrial anclada a la proteína SDHB que se encuentra unida a la membrana mitocondrial interna. Los anticuerpos frente VDAC1, Rieske y SDHA se generaron utilizando la secuencia completa de la proteína. Hsp60 es una proteína soluble de la matriz mitocondrial, el anticuerpo se generó con un epítipo localizado entre los residuos de aminoácidos 383-447 de la proteína humana Hsp60. Creado con BioRender.com.

5.5.2. Determinación de la localización submitocondrial de ATAD3C: Mediante rotura por sonicación y mediante extracción alcalina

A continuación, se realizaron ensayos para determinar la localización submitocondrial de ATAD3C. Las mitocondrias aisladas a partir de la línea celular HEK293T^{ATAD3C-HA} se subfraccionaron por dos métodos distintos (Ryan et al., 2001).

Por un lado, se llevó a cabo la rotura física mediante un procedimiento de congelado-descongelado, seguido de sonicación (*Apartado 7.4.3.7*). A continuación, los fragmentos se centrifugaron para separar la fracción de proteínas unidas a las membranas mitocondriales (que quedan en el pellet) de la fracción de proteínas solubles de matriz y espacio intermembrana (que quedan en el sobrenadante).

Como se muestra en la Figura 5.10, la proteína ATAD3C se encontró enriquecida en la fracción precipitada, indicando que se trata de una proteína unida a membrana. También las proteínas ATAD3A y ATAD3B, Rieske, Porina y SDHA se encontraron enriquecidas en el pellet. Por el contrario, Hsp60 se detectó en la fracción del sobrenadante, confirmando que se trataba de una proteína soluble de la matriz.

Por otro lado, se llevó a cabo la extracción de proteínas solubles y periféricas de membrana con carbonato sódico a pH 11,3 (*Apartado 7.4.3.7*). Este tratamiento permite separar la fracción de proteínas integrales de membrana (que quedan en el pellet) de las periféricas de membrana (que son extraídas de la membrana y quedan en el sobrenadante) junto con las proteínas solubles.

Los resultados indican que la proteína ATAD3C se encuentra enriquecida en la fracción del pellet (Figura 5.10). De la misma manera que ATAD3A y ATAD3B, descritas como proteínas integrales de membrana, Rieske (UQCRCF1) del complejo III, localizada en la membrana mitocondrial interna orientada hacia el espacio intermembrana y Porina, proteína de la membrana mitocondrial externa. Por el contrario, Hsp60, proteína soluble en la matriz mitocondrial se detectó enriquecida en la fracción del sobrenadante. El tratamiento con carbonato sódico arrastra las proteínas que no se encuentran integradas en la membrana, como SDHA, subunidad del complejo II localizada la membrana interna pero orientada hacia la matriz, que tras el tratamiento se encuentra en el sobrenadante.

Por tanto, ambos tratamientos indican que ATAD3C es una proteína de membrana.

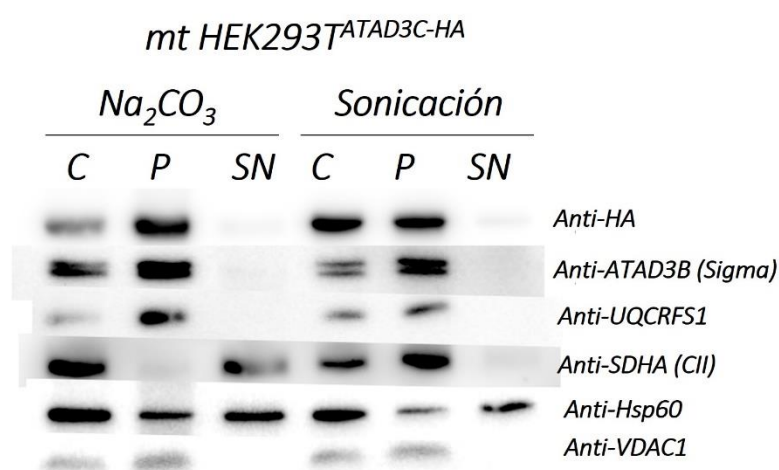


Figura 5.10. Imagen de la inmunodetección de la fracción mitocondrial de HEK293T^{ATAD3C-HA} tras el tratamiento con carbonato sódico (Na₂CO₃) o rotura por sonicación. Se separaron las fracciones mitocondriales en un gel SDS-PAGE. Las proteínas de interés se inmunodetectaron con anticuerpos comerciales. C: control o proteínas totales; P: fracción precipitada; SN: fracción del sobrenadante.

5.5.3. Determinación de la topología de ATAD3C: Tratamientos con tripsina y proteinasa K

Para obtener información de en cuál de las dos membranas mitocondriales (externa o interna) se encuentra ATAD3C y en qué orientación, se evaluó la accesibilidad a la proteína de concentraciones crecientes de proteinasa K o de tripsina (5 µg/ml, 10 µg/ml o 20 µg/ml), tras tratar las mitocondrias con un medio hipotónico, para romper la membrana mitocondrial externa.

Utilizando concentraciones crecientes de proteinasa K, proteasa no específica que degrada en primer lugar proteínas solubles y dominios proteicos no protegidos por membrana (Wu et al., 2003), e inmunodetección del extremo carboxilo de ATAD3C-HA, se pudo detectar la proteína completa (ATAD3C-HA, 47,47kDa (46 kDa + secuencia HA) además de dos fragmentos: ΔN-ATAD3C-HA y ΔN-ATAD3C-HA (25kDa) (Figura 5.11).

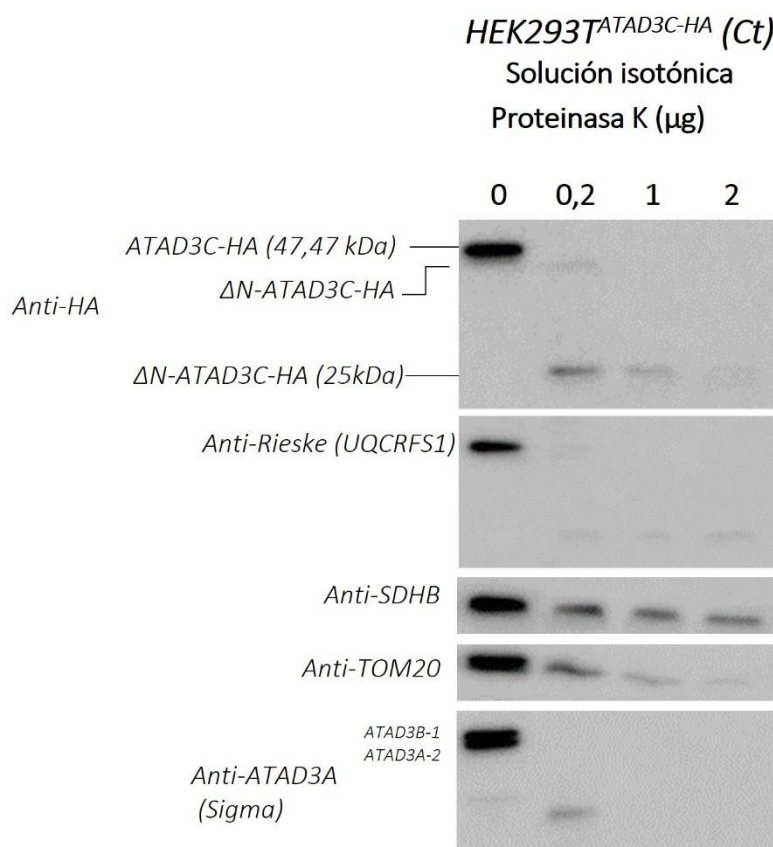


Figura 5.11 Imagen de la inmunodetección de la fracción mitocondrial de HEK293T^{ATAD3C-HA} (Ct) sometida a un medio isotónico e incubada a concentraciones crecientes de proteinasa K (0-2 µg/2,5 µg de mitocondrias). Las fracciones mitocondriales se separaron en un gel SDS-PAGE. Las proteínas de interés se inmunodetectaron con anticuerpos comerciales.

Como se muestra en la Figura 5.11, a medida que aumentó la concentración de proteinasa K, desaparecieron rápidamente las dos bandas altas de la proteína ATAD3C (proteína completa ATAD3C-HA, 47,47kDa, y fragmento Δ N-ATAD3C-HA) mientras que el fragmento de 25 kDa, conteniendo el extremo carboxilo terminal, fue más estable. Este fragmento se comportó como la proteína Tom20, localizada en la membrana mitocondrial externa y como un fragmento de Rieske, proteína anclada a la membrana interna hacia el espacio intermembrana. La proteína SDHB, protegida por la membrana interna en el lado de la matriz fue más resistente a la degradación. Por tanto, esto sugiere que ATAD3C tiene su extremo carboxilo protegido por la membrana y el extremo amino terminal fuera de la membrana.

A continuación, se estudió la accesibilidad de la tripsina a la proteína ATAD3C en un extracto mitocondrial aislado a partir de la línea celular HEK293T^{ATAD3C-HA}. Para ello, se incubaron extractos mitocondriales con baja concentración de tripsina (5 μ g/ml) en un medio isotónico. No se observó degradación de las proteínas inmunodetectadas a medida que aumentaba el tiempo de incubación, sugiriendo que la tripsina no rompe la membrana ni accede al interior de la mitocondria (Figura 5.12 A.). Cuando los extractos mitocondriales se sometieron a un medio hipotónico, para romper la membrana mitocondrial externa, la digestión con tripsina en las mismas condiciones (5 μ g/ml), degradó rápidamente el extremo amino de la proteína ATAD3C-HA. La proteína completa (47,47 kDa) disminuía a medida que aumentaba el tiempo de digestión, acumulándose el fragmento Δ N-ATAD3C-HA (Figura 5.12 B.). El resto de las proteínas analizadas no se vieron afectadas. La degradación de un fragmento amino-terminal en medio hipotónico, pero no en medio isotónico, indica que ATAD3C tiene un fragmento muy accesible a la tripsina en el espacio intermembrana. (En Anexo I, Figura 9.6 se muestra la secuencia primaria de la proteína ATAD3C con los sitios de corte de la Tripsina).

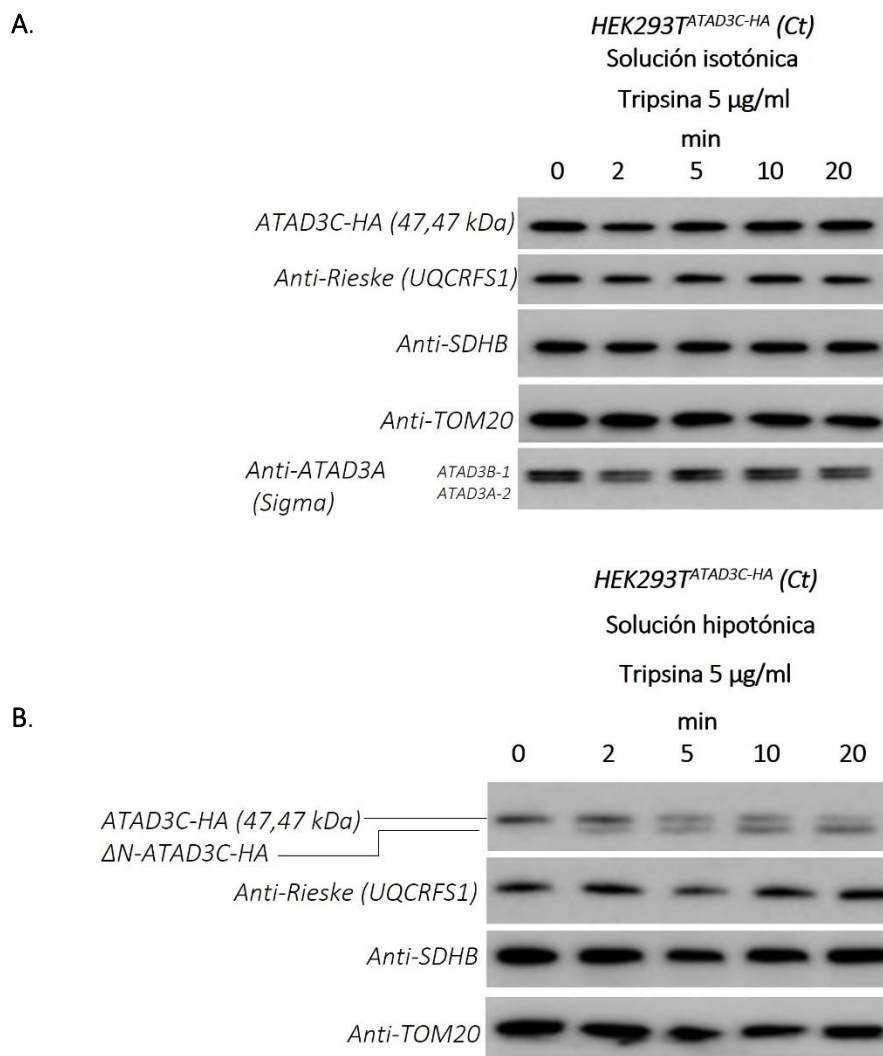


Figura 5.12. Imagen de la inmunodetección de la fracción mitocondrial de HEK293T^{ATAD3C-HA} (Ct) incubada a baja concentración de tripsina (5 µg/ml) sometida a un medio isotónico (A.) o a un medio hipotónico (B.). Las fracciones mitocondriales se separaron en geles SDS-PAGE. Las proteínas de interés se inmunodetectaron con los anticuerpos comerciales que se indica. Medio isotónico: Tris-HCl 30 mM pH7,4, Mg-Acetato 4 mM, Aminocaproico 5 mM, NaCl 50 mM, ATP 1 mM. Medio hipotónico: 20 mM HEPES pH 7,5.

Se continuó con el estudio de la accesibilidad de la tripsina a la proteína ATAD3C-HA, sometiendo la fracción mitocondrial de células HEK293T^{ATAD3C-HA} a un medio hipotónico e incubando con elevada concentración de tripsina. Mediante inmunodetección con anticuerpo anti-HA se detectó un fragmento ΔN-ATAD3C-HA (Figura 5.13 A.) que se comportó frente a la degradación con tripsina en tiempos crecientes igual que la proteína Rieske, anclada a la membrana interna. La proteína TOM20 de la membrana externa, sin embargo, se acabó degradando por completo. La proteína SDHB no se vio afectada por la tripsina, indicando que en el ensayo ésta no accede al interior de la matriz (Sabatini & Blobel, 1970). Estos resultados sugieren que el extremo carboxilo de ATAD3C se encuentra protegido por la membrana mitocondrial interna.

Paralelamente, se realizó el mismo experimento detectando el extremo amino terminal de la proteína ATAD3C (para ello se generó la línea celular HEK293T^{ATAD3C-HA} (Nt), con el epítipo -HA en el extremo amino) (Figura 5.13 B.). En este ensayo se obtuvo una única banda correspondiente a HA-ATAD3C, de 47,47 kDa, que se degradó a tiempos largos de digestión de la misma manera que Tom20, confirmando que el extremo amino es el extremo más accesible no protegido por la membrana.

Los resultados llevaron a concluir que ATAD3C está anclada en la membrana mitocondrial interna por su extremo carboxilo, con su extremo amino terminal localizado en el espacio intermembrana.

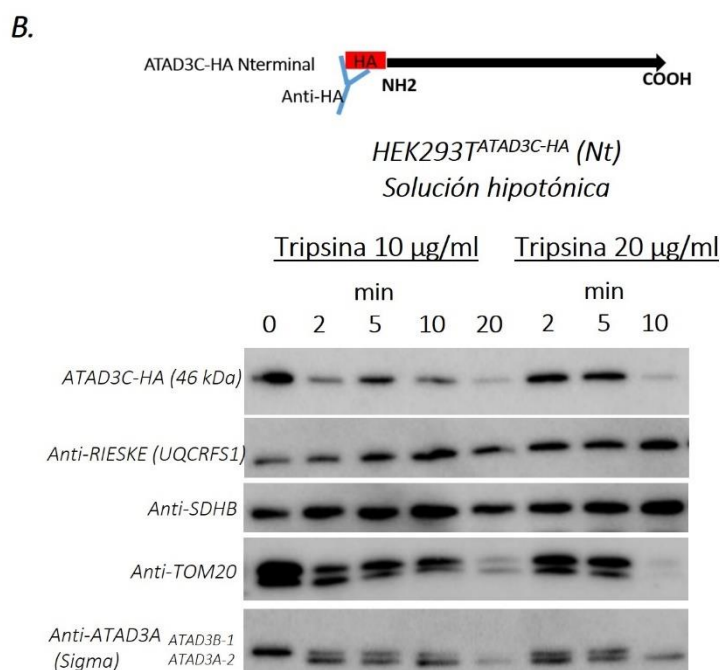
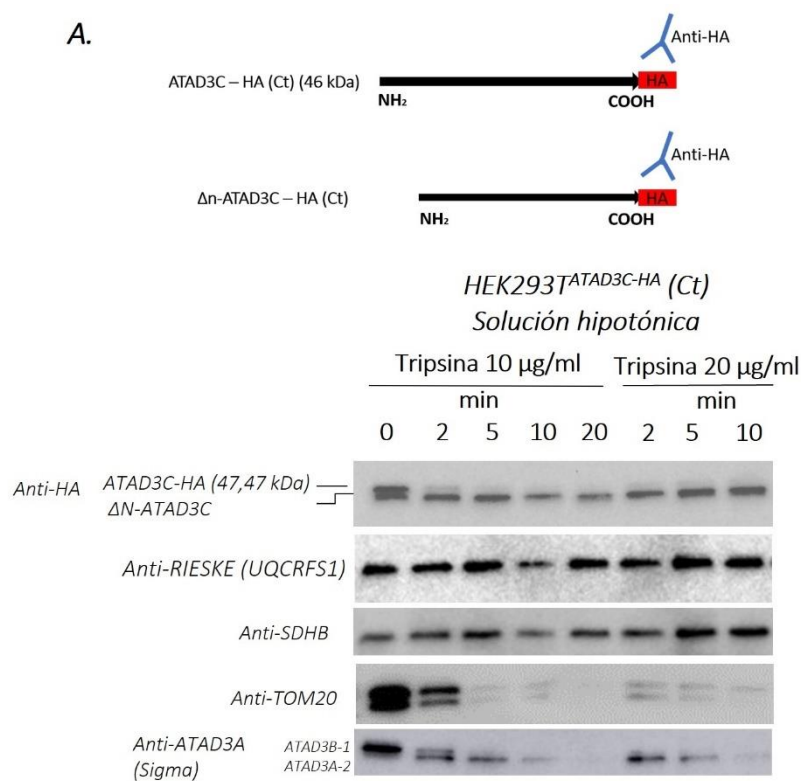


Figura 5.13. Imagen de la inmunodetección de la fracción mitocondrial tratada con elevadas concentraciones de tripsina (10 μg/ml o 20 μg/ml) de HEK293T^{ATAD3C-HA} (Ct) (A.) o HEK293T^{ATAD3C-HA} (Nt) (B.). Las fracciones mitocondriales se separaron en geles SDS-PAGE. Las proteínas de interés se inmunodetectaron con los anticuerpos comerciales que se indican.

5.6. Detección de ATAD3C mediante LC-MS/MS

Puesto que no disponemos de un anticuerpo que reconozca específicamente la proteína ATAD3C, recurrimos a cromatografía líquida acoplada a un espectrometría de masas (LC-MS/MS) para tratar de detectarla tanto en la línea celular HEK293T, en la que la había detectado un estudio previo (Garin-Muga et al., 2016), como en fibroblastos primarios. Se separaron las proteínas totales de un extracto mitocondrial en un gel SDS-PAGE, se recortó una banda en la que, de acuerdo con su tamaño (40 – 50 kDa) podría encontrarse la proteína ATAD3C y se analizaron las proteínas presentes mediante proteómica dirigida. Para determinar la presencia de péptidos únicos se llevaron a cabo análisis de LC-MS/MS utilizando un método combinado de shotgun y proteómica dirigida seguido de identificación de péptidos mediante las herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline*. En la línea HEK293T se detectó un péptido único de ATAD3C (Tabla 5.3). En el mismo experimento se detectaron 6 péptidos únicos de ATAD3A y dos péptidos únicos de ATAD3B.

Tabla 5.3 Péptidos únicos de las proteínas ATAD3C, ATAD3A y ATA3B detectados por LC-MS/MS. Se utilizó un método combinado de shotgun y proteómica dirigida y se identificaron péptidos únicos de las proteínas mediante las herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline* en las mitocondrias aisladas a partir de C3, de la línea HEK293T (SDS-PAGE y BN-PAGE) y de HEK293T^{ATAD3C-HA}. En verde se indican las isoformas a las que pertenecen los péptidos analizados. En granate se indican las muestras en las que se han detectado los péptidos únicos.

	Secuencia del péptido	Isoforma de la proteína					Líneas celulares			
		ATAD3A-1	ATAD3A-2	ATAD3B-1	ATAD3B-3	ATAD3C	Fibroblastos C3	HEK293T (SDS-PAGE)	HEK293T (BN-PAGE)	HEK293T ^{ATAD3C-HA}
ATAD3C	QLVNEDLR									
	HHQTFLESIR									
	HPIQQVSR									
	MYLNEYVLKPATEGK									
	CLEIAR									
	LTEGMSCR									
	GERPGPEDEQPSS									
	AAGTLFGEGFR									
ATAD3A	MSWLFGINK									
	AFVTDWDK									
	NATLVAGR									
	LLSRPQDALEGVVLSPSLEAR									
	NILMYGPPGTGK									
	INEMVHFDLPQGEER									
	VQDAVQQHQK									
	MYFDKYVLKPATEGK									
	AEGPGRGDESPS									
	YAKDALNLAQMGEQTLQLEQQSK									
ATAD3B	PQDALEGVVLSPSLEAR									
	EALNLAQMGEQTLQLEQQSK									
	GLLFMDEADAFLR									
	ATLNAFLYHMGQHSNK									
	IDVMVHFDLPQGEER									
	LHFDNCVLKPATEGK									
	DGVLTEAMMDACVQDAVQQYR									
	ICSWMGTLGLCPGLSPR									
	ATEEISKDLR									
	MSCGGGRPFPCPGHPLL									

A continuación se analizó una banda de alto peso molecular detectada con el anticuerpo anti-ATAD3B (Sigma) en extracto mitocondrial de la línea HEK293T tras su separación mediante Blue Native-PAGE (Figura 5.14, Tabla 5.3). Se detectó un péptido único de ATAD3C (diferente al detectado separando las proteínas mediante SDS-PAGE) en la línea celular HEK293T. En el mismo experimento se detectaron 6 péptidos únicos de ATAD3B y 9 péptidos únicos de ATAD3A.

Cuando se sobreexpresó la proteína ATAD3C en la línea celular HEK293T, se detectaron 5 péptidos únicos de ATAD3C, uno de ellos (HHQTFLESIR), coincide con el detectado sin sobreexpresar. Se detectaron además 9 péptidos únicos de ATAD3A y 6 péptidos únicos de ATAD3B

(los péptidos únicos detectados se recogen en la Tabla 5.3 y los péptidos comunes entre las proteínas ATAD3 se recogen en la Anexo I, Tabla 9.4).

El péptido único de ATAD3B que se detectó en la línea HEK293T (EALNLAQMMEQTLQLEQQSK) corresponde a la isoforma 1, indicando que ésta se expresa de manera endógena en la línea celular HEK293T. Puesto que a partir de cDNA de esta línea celular pudimos clonar la isoforma 3 de ATAD3B, confirmamos que ambas isoformas se expresan de manera endógena en la línea HEK293T.

Estos resultados indican la presencia de la proteína ATAD3C en la línea celular humana HEK293T a pesar de que no pudimos detectar el transcrito mediante qPCR, así como la presencia de ATAD3A y ATAD3B en células HEK293T.

Cuando en el estudio de proteómica dirigida para detectar ATAD3C se partió de extractos mitocondriales derivados de fibroblastos primarios, se detectaron 3 péptidos únicos de ATAD3A, 2 péptidos compartidos entre ATAD3A y ATAD3B, y un péptido común para las tres proteínas (Tabla 5.3 y Anexo I, Tabla 9.4). No se detectó ningún péptido único de ATAD3C ni de ATAD3B. Por lo tanto, obtuvimos evidencia mediante proteómica de que ATAD3A está presente en fibroblastos, pero no de que lo estén ATAD3B o ATAD3C.

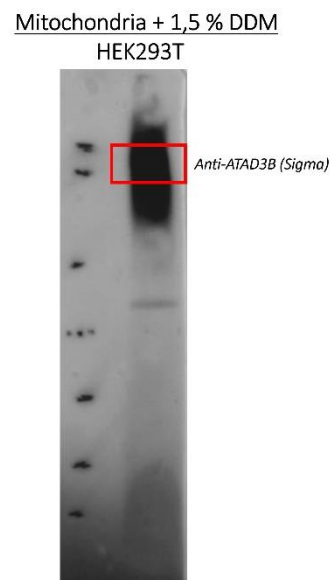


Figura 5.14 Imagen de la inmunodetección de ATAD3B en mitocondrias HEK293T solubilizadas con DDM. Se separaron las mitocondrias mediante Blue Native-PAGE. El recuadro rojo indica la banda recortada y analizada por el Servicio de Proteómica.

5.7. Estudio de las interacciones entre las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C

5.7.1. Estudio de las interacciones entre las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante inmunoprecipitación

Para estudiar las interacciones entre ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA partiendo de mitocondrias aisladas de células HEK293T sobreexpresando ATAD3A-HA, ATAD3B-HA, ATAD3C-HA o ATAD3C-L231P-HA conteniendo la mutación del paciente. Como control negativo, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con mitocondrias de la línea celular HEK293T.

En la Figura 5.15, se comparan la muestra inicial, la fracción no inmunoprecipitada o sobrenadante y el eluido final tras la inmunoprecipitación, para las líneas HEK293T, HEK293T^{ATAD3C-HA} y HEK293T^{ATAD3C-L231P-HA}. Los ensayos transcurrieron correctamente puesto que las proteínas ATAD3C-HA y ATAD3C-L231P-HA se encontraron en los eluidos finales pero no en el sobrenadante. Con un anticuerpo anti-ATAD3A se observó que esta proteína co-inmunoprecipitó con ATAD3C-HA y con ATAD3C-L231P-HA. Sin embargo, las proteínas de los complejos OXPHOS, UQCRC2 del CIII₂ y ATP5A1 del CIV se mantuvieron en la fracción no inmunoprecipitada.

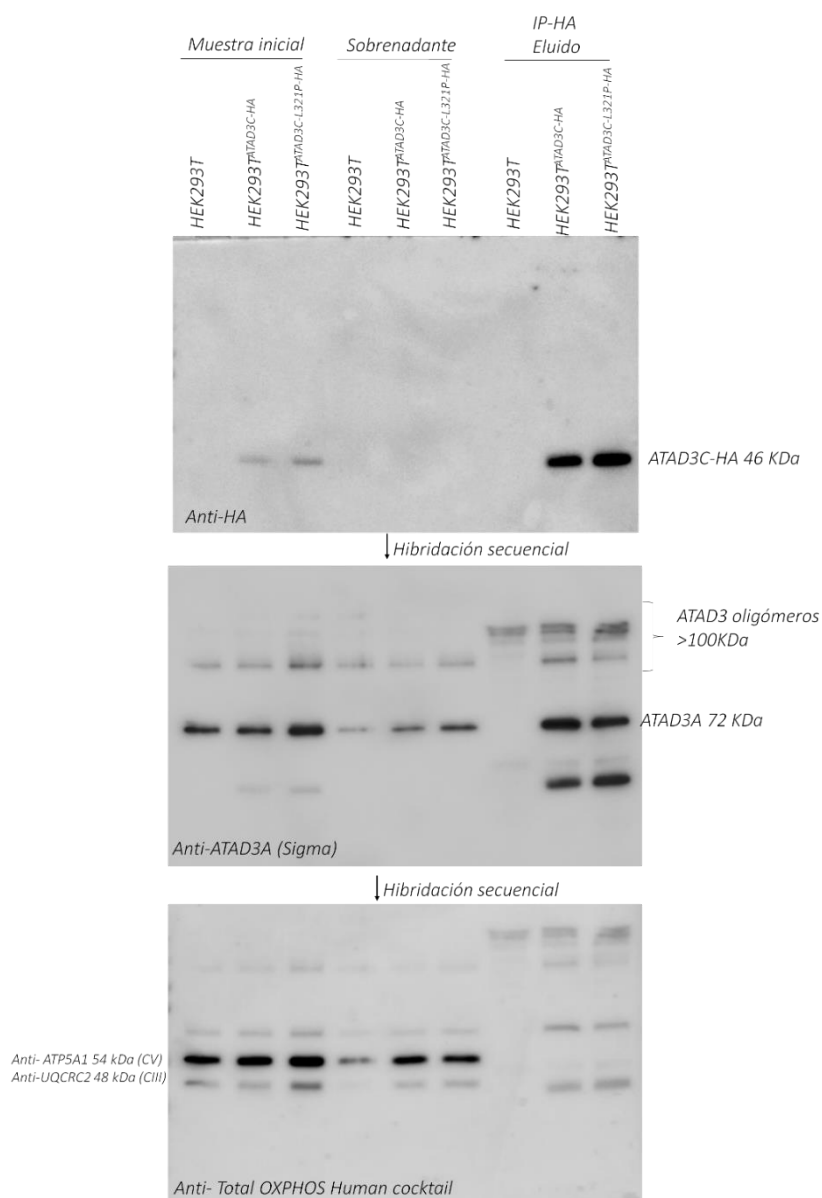


Figura 5.15. Imagen de la inmunodetección de las proteínas ATAD3A, ATAD3C-HA y de proteínas de los complejos OXPHOS en las distintas fracciones del ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA en las líneas HEK293T, HEK293T^{ATAD3C-HA} y HEK293T^{ATAD3C-L321P-HA}. Las fracciones se analizaron por Western Blot. La membrana se incubó secuencialmente con los anticuerpos anti-HA, anti-ATAD3A y con el coctel de anticuerpos OXPHOS.

La fracción eluida tras la inmunoprecipitación en cada una de las líneas celulares se analizó por Western Blot con el anticuerpo anti-HA (Figura 5.16 A.) y se estimó el peso molecular de las bandas inmunodetectadas comparando su migración con la de las bandas del marcador de pesos moleculares. En la Figura 5.16 B. se recoge la migración en el gel en mm de cada especie detectada y su peso molecular aparente, que se asoció con una especie oligomérica cuando su peso molecular estimado $\pm 10\%$ coincidía con el peso molecular teórico de la especie oligomérica (las medidas de migración del marcador de pesos moleculares y la gráfica representando su migración respecto al peso molecular se puede encontrar en Anexo I, Tabla 9.3). Se identificaron así en los inmunoprecipitados tanto monómeros como dímeros de las proteínas ATAD3A (en la línea

HEK293T^{ATAD3A-HA}) y ATAD3B (en la línea HEK293T^{ATAD3B-HA}). Se identificaron dímeros de ATAD3C (en las líneas HEK293T^{ATAD3C-HA} y HEK293T^{ATAD3C-L231P-HA}) y una banda muy intensa ($c^{HA}(u1)$, $cm^{HA}(u1)$) que no se pudo estimar su peso molecular porque está en el límite de la recta patrón.

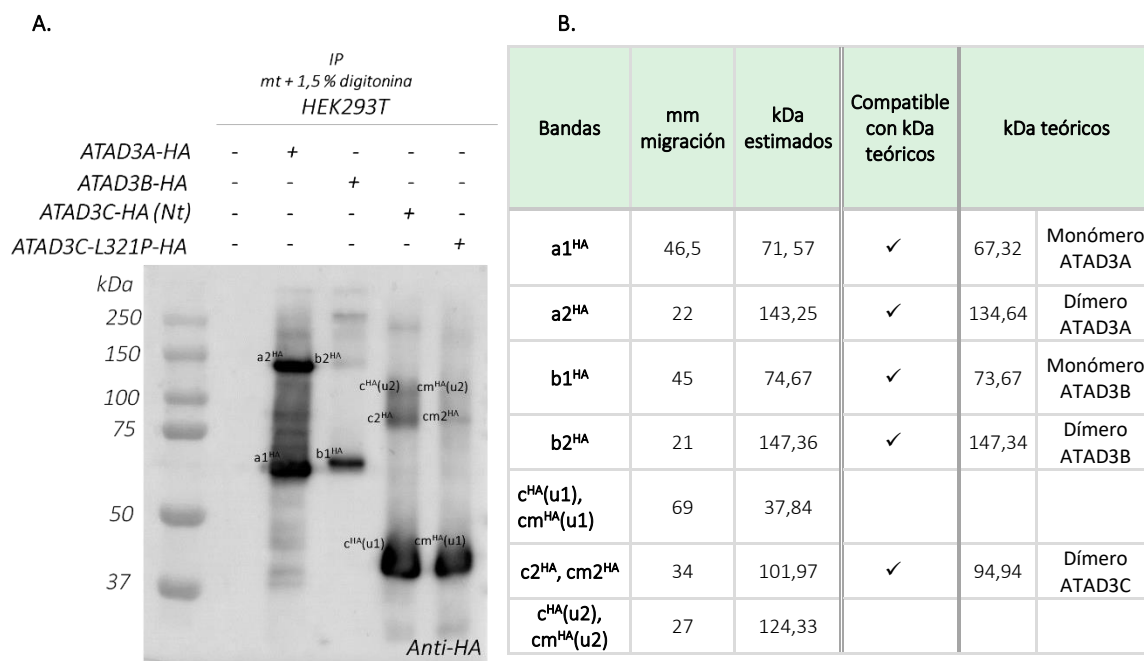


Figura 5.16 A. Imagen de la inmunodetección de oligómeros de las proteínas ATAD3A-HA, ATAD3B-HA y ATAD3C-HA, en fracciones mitocondriales inmunoprecipitadas analizadas mediante Western Blot. Las proteínas inmunoprecipitadas (IP) se eluyeron con el tampón de carga sin β -mercaptoetanol, para mantener los puentes disulfuro de las proteínas. Las bandas que se inmunodetectan para ATAD3A-HA se identifican como bandas a, para ATAD3B-HA como bandas b y para ATAD3C-HA como bandas c, seguidas del número de subunidades si se ha podido identificar. Las bandas que no se han podido identificar se etiquetan como desconocidas (u, *unknown*). HA indica que son subunidades que contienen epítipo. **B. Datos de la migración de las bandas en el Western Blot inmunodetectado con el anticuerpo anti-HA y estimación de sus pesos moleculares aparentes.** Con la recta patrón calculada con todas las proteínas del marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Standards (BIO-RAD) se estimaron los pesos moleculares de las bandas (Anexo I, Tabla 9.3). Se indica la especie oligomérica a la que podría ajustarse cada banda de acuerdo con su peso molecular aparente. ✓ indica que el peso molecular de la banda detectada coincide con el peso molecular teórico de una especie oligomérica.

A continuación, las fracciones eluidas tras las inmunoprecipitaciones se analizaron por Western Blot con anticuerpos contra las proteínas ATAD3A y ATAD3B. Se encontró que ATAD3A había co-inmunoprecipitado con ATAD3B-HA, con ATAD3C-HA y con ATAD3C-L321P-HA (Figura 5.17 B.). Con el anticuerpo anti-ATAD3B de Sigma que detecta principalmente ATAD3B, solo se detectó la proteína en la calle correspondiente a la línea HEK293T^{ATAD3B-HA} (Figura 5.17 A.). Puesto que el anticuerpo también puede detectar ATAD3A, de menor peso molecular, en el Western Blot se observó además la banda correspondiente a ATAD3A, mayoritaria en la calle correspondiente a HEK293T^{ATAD3A-HA} y tenue en las calles HEK293T^{ATAD3C-HA} y HEK293T^{ATAD3C-L231P-HA}.

La presencia de la proteína ATAD3A endógena en todos los inmunoprecipitados, indica que interacciona con ATAD3B y ATAD3C, al menos cuando estas se sobreexpresan.

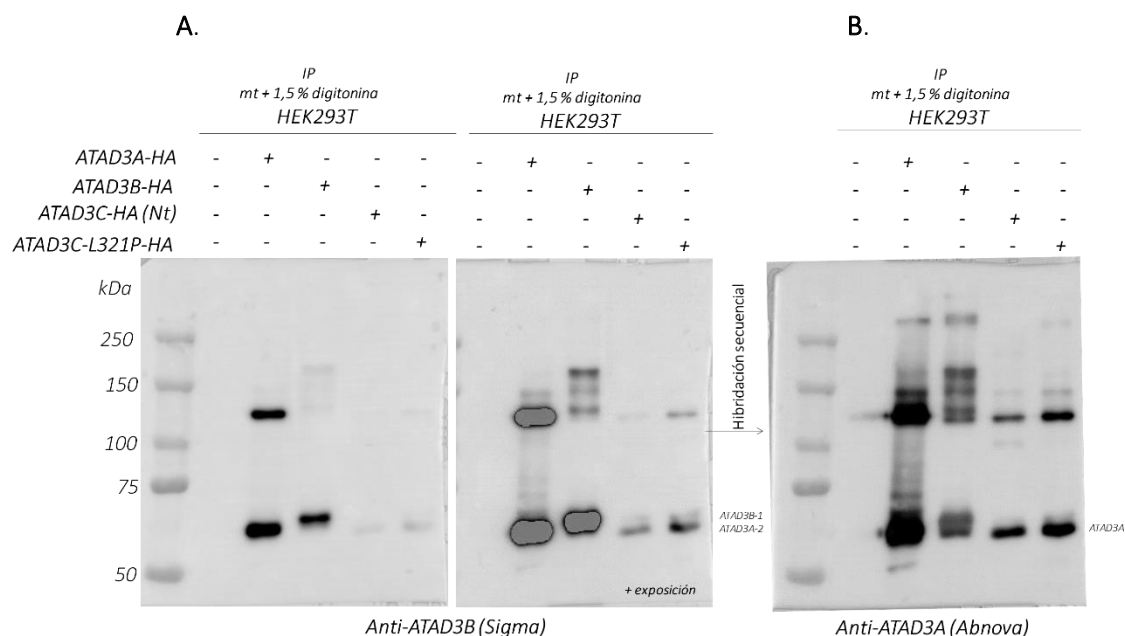


Figura 5.17 Imagen de la inmunodetección de las proteínas ATAD3A y ATAD3B mediante Western Blot en la fracción eluida tras cada inmunoprecipitación. Se analizaron en geles SDS-PAGE de 7 % Acrilamida-Bisacrilamida.

Las fracciones eluidas en cada uno de los ensayos de inmunoprecipitación fueron analizadas a continuación mediante LC-MS/MS utilizando un método combinado de shotgun y proteómica dirigida seguido de identificación de péptidos mediante las herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline*. Los péptidos únicos correspondientes a las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C que se encontraron, se muestran en la Tabla 5.4. Los péptidos comunes a las tres proteínas se recogen en Anexo I, Tabla 9.7.

Co-inmunoprecipitando con ATAD3A-HA se detectaron dos péptidos únicos de ATAD3C, pero no se detectó ningún péptido único de la proteína ATAD3B. Co-inmunoprecipitando con ATAD3B-HA se detectaron numerosos péptidos únicos de ATAD3A, además de dos péptidos únicos de ATAD3C. También se encontraron numerosos péptidos de ATAD3A co-inmunoprecipitando con las proteínas ATAD3C-HA y ATAD3C-L231P-HA. Debido a la alta homología entre las tres isoformas, el hecho de encontrar un péptido único de una de las proteínas se consideró suficiente indicio para determinar que la proteína se encuentra presente en la muestra analizada. Sin embargo, la presencia de uno o muy pocos péptidos puede deberse a interacción inespecífica, como ocurre en el control negativo, la línea HEK293T, en la que en uno de los ensayos se detectó un péptido único de ATAD3A. La interacción más consistente que hemos detectado (con mayor número de péptidos únicos de las dos proteínas) se da entre ATAD3C y ATAD3A.

Tabla 5.4 Péptidos únicos de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C analizados por LC-MS/MS. Se utilizó un método combinado de shotgun y proteómica dirigida y se identificaron péptidos únicos de las proteínas mediante las herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline* en los inmunoprecipitados de las diferentes líneas celulares. En verde se indican las isoformas a las que pertenecen los péptidos analizados. En rojo se indican las muestras de inmunoprecipitación en las que se han detectado los péptidos únicos. * EALNLAQMQEQLQLEQQSK: indica que el péptido es único para la isoforma 1 de ATAD3B.

Péptido	Isoformas					Inmunoprecipitación-HA					
	ATAD3A-1	ATAD3A-2	ATAD3B-1	ATAD3B-3	ATAD3C	Líneas celulares					
						HEK293T	HEK293T ^{ATAD3A-HA}	HEK293T ^{ATAD3B-HA}	HEK293T	HEK293T ^{ATAD3C-HA}	HEK293T ^{ATAD3C-L23IP-HA}
ATAD3C	QLVNEDLR										
	HHQTFLESIR										
	HPIQQVSR										
	MYLNEYVLKPATEGK										
	CLEIAR										
	LTEGMSCR										
ATAD3A	MSWLFGINK										
	AFVTDWDK										
	NATLVAGR										
	LLSRPQDALEGVVLSPLEAR										
	NILMYGPPGTGK										
	INEMVHFDLPQQEER										
	VQDAVQQHQK										
ATAD3B	EALNLAQMQEQLQLEQQSK*										
	GLLLFMDEADAFLR										
	ATLNAFLYHMGQHSNK										
	IDVMVHFDLPQQEER										
	LHFDNCVLKPATEGK										
	DGVLTEAMMDACVQDAVQQYR										
	ICSWMGTLCPGLSPR										

Se detectaron además numerosas proteínas comunes a todas las muestras. Entre las más abundantes en todas las muestras, incluidas la muestra control, están algunas proteínas como la queratina y la cistatina consideradas contaminantes, proteínas ribosomales citoplasmáticas como las subunidades 60S y 40S, las histonas H4 y H2A, y la proteína S100. Entre las muestras co-inmunoprecipitadas con ATAD3A-HA, ATAD3B-HA y ATAD3C-HA se detectaron proteínas de las subunidades 28S y 39S del ribosoma mitocondrial, la translocasa de ADP/ATP y varias subunidades de las proteínas TIM y TOM.

5.8. Estudio de interacciones de oligómeros ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en condiciones nativas

Para estudiar cómo se comportan las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en la membrana mitocondrial en condiciones nativas, las sobreexpresamos en fibroblastos primarios, por ser genéticamente más estables que las líneas celulares inmortalizadas como es el caso de las HEK293T.

5.8.1. Sobreexpresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en fibroblastos

Se generaron líneas derivadas de fibroblastos control (C y C3) y P sobreexpresando ATAD3C-HA (Anexo I, Figura 9.7), y fibroblastos C sobreexpresando ATAD3A-HA y ATAD3B-HA.

Para comprobar la sobreexpresión y estudiar si se altera la expresión de los otros genes del locus *ATAD3*, se cuantificaron los niveles de expresión de *ATAD3A* y *ATAD3B* mediante qPCR en los fibroblastos control o sobreexpresando ATAD3A-HA, ATAD3B-HA o ATAD3C-HA. El valor de expresión obtenido para los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* en los diferentes fibroblastos se comparó con el obtenido para *ATAD3A* en las células control (C) (Figura 5.18). La expresión de *ATAD3A* en $C^{ATAD3A-HA}$ fue significativamente mayor ($432,57 \% \pm 32,67$) que en los fibroblastos C ($100 \% \pm 32,67$), y no se alteró significativamente la expresión de *ATAD3B* en $C^{ATAD3A-HA}$ ($66,68 \% \pm 21,53$) respecto a los fibroblastos C ($100,06 \% \pm 57,26$).

También, la expresión de *ATAD3B* aumentó significativamente en las células $C^{ATAD3B-HA}$ ($588,1 \% \pm 119,11$) respecto a fibroblastos C ($100,06 \% \pm 57,26$), pero no se alteró la expresión de su parálogo *ATAD3A* ($106,42 \% \pm 27,7$) respecto a los fibroblastos C ($100 \% \pm 32,67$). Ambos resultados confirmaron la sobreexpresión de los genes *ATAD3A* y *ATAD3B* en las células. Los niveles de expresión de *ATAD3A* y *ATAD3B* fueron similares en los fibroblastos C y en $C^{ATAD3C-HA}$.

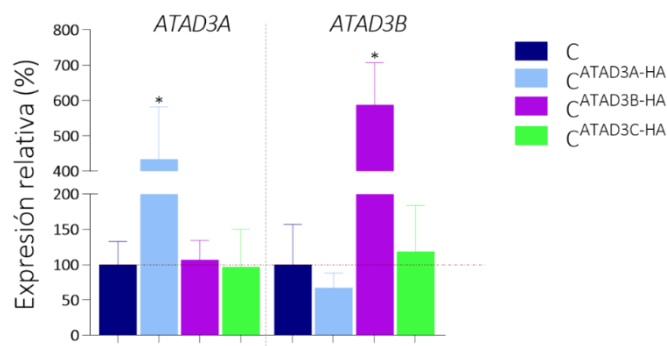


Figura 5.18 Niveles de expresión del transcrito de *ATAD3A* y *ATAD3B* en los fibroblastos control (C) y sobreexpresando *ATAD3A*-HA ($C^{ATAD3A-HA}$), *ATAD3B*-HA ($C^{ATAD3B-HA}$) y *ATAD3C*-HA ($C^{ATAD3C-HA}$). Los datos se representan como la media \pm SD de la expresión de *ATAD3A* y *ATAD3B* (n=3). *Expresión relativa (%)*: C *ATAD3A*: $100 \pm 32,67$; $C^{ATAD3A-HA}$ *ATAD3A*: $432,57 \pm 147,19$; $C^{ATAD3B-HA}$ *ATAD3A*: $106,42 \pm 27,7$; $C^{ATAD3C-HA}$ *ATAD3A*: $96,27 \pm 53,86$; C *ATAD3B*: $100,06 \pm 57,26$; $C^{ATAD3A-HA}$ *ATAD3B*: $66,68 \pm 21,53$; $C^{ATAD3B-HA}$ *ATAD3B*: $588,1 \pm 119,11$; $C^{ATAD3C-HA}$ *ATAD3B*: $118,42 \pm 65,65$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la expresión de *ATAD3A* en los fibroblastos C, considerada el 100 % (línea horizontal de puntos).

Como se muestra en la Figura 5.19, se consiguió una clara sobreexpresión de las tres proteínas, aunque fue mayor para ATAD3C-HA (47,47 kDa) y ATAD3A-HA (67,32 kDa), que para ATAD3B-HA (73,67 kDa). Mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-ATAD3B (Sigma) se confirmó la sobreexpresión de ATAD3B. Las subunidades de los complejos respiratorios detectadas no mostraron cambios de expresión frente al control.

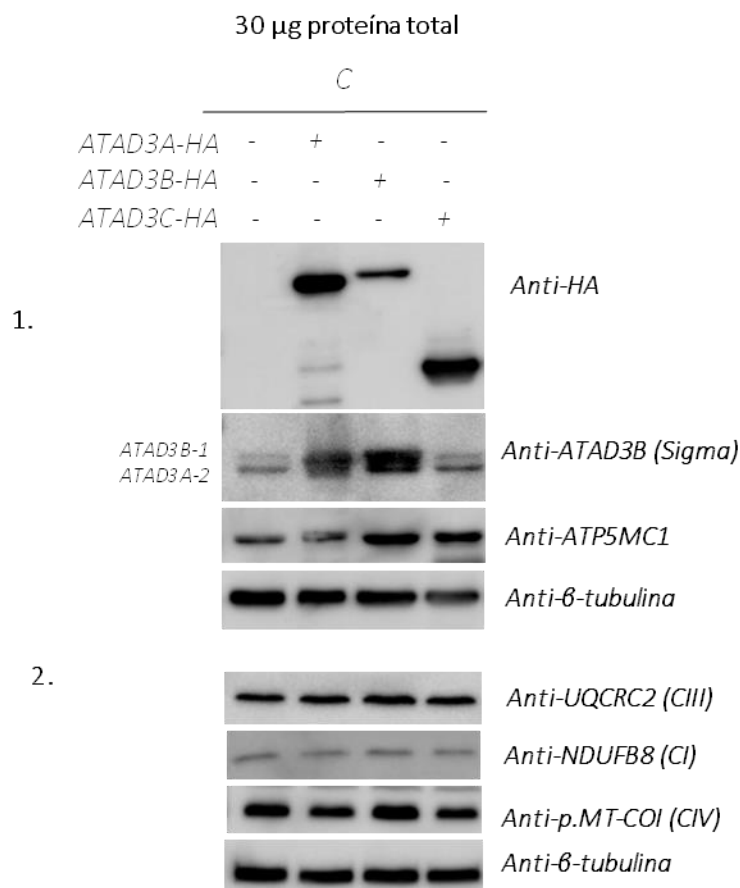


Figura 5.19 Imagen de la inmunodetección de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C y de proteínas de los complejos respiratorios en proteínas totales aisladas de fibroblastos C sobreexpresando ATAD3A-HA, ATAD3B-HA y ATAD3C-HA. Se analizaron 30 µg de proteínas totales en geles SDS-PAGE. La β-tubulina se utilizó como control de carga en los dos geles realizados (10 % (membrana 1) y 14 % (membrana 2) de acrilamida/bisacrilamida).

Utilizando la técnica de inmunofluorescencia se estudió la colocación del epítipo -HA, que contienen las proteínas sobreexpresadas, con la mitocondria en los fibroblastos C, $C^{ATAD3C-HA}$, $C^{ATAD3A-HA}$ y $C^{ATAD3B-HA}$ (Figura 5.20). Las proteínas ATAD3A y ATAD3C se detectaron en color amarillo, resultado del rojo de la mitocondria y el verde de la proteína, confirmando la expresión en los fibroblastos y su localización en la mitocondria. En los fibroblastos $C^{ATAD3B-HA}$ no se consiguió detectar a la proteína ATAD3B, a pesar de que se había detectado en el análisis mediante Western Blot.

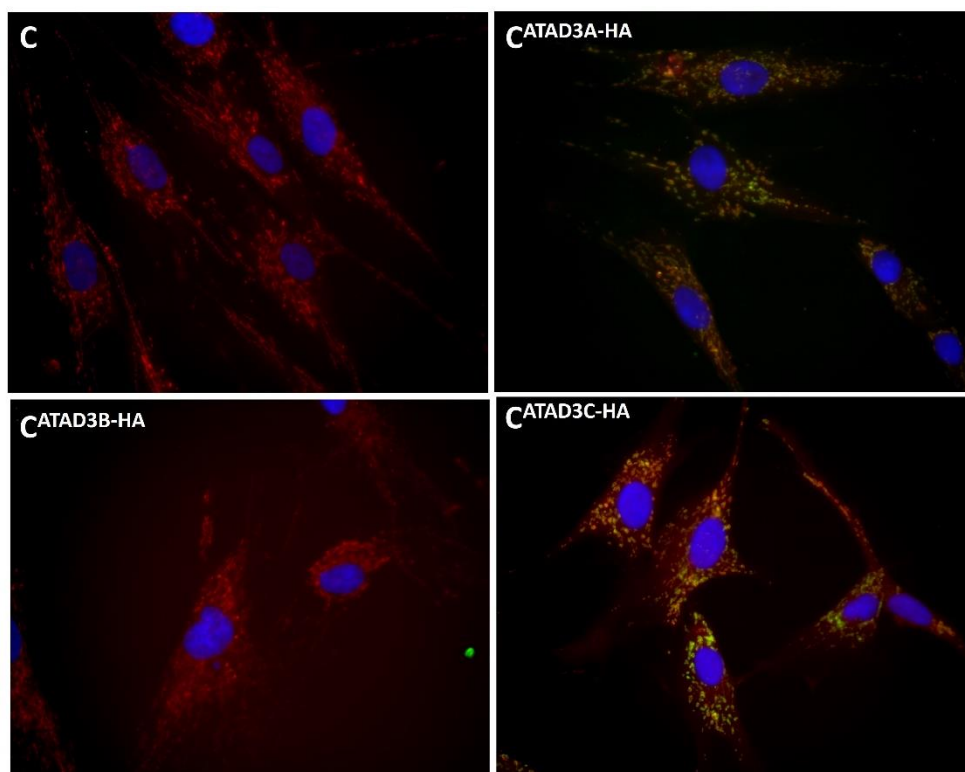


Figura 5.20 Imagen de inmunofluorescencia de los fibroblastos C, CATAD3A-HA, CATAD3B-HA y CATAD3C-HA. La red mitocondrial se visualizó en rojo (*MitoTracker® Red CMXRos*, ThermoFisher Scientific), los núcleos en azul (DAPI) y las proteínas de interés en verde (anticuerpo anti-HA). Cuando las proteínas colocalizan en la mitocondria se observan en amarillo.

5.8.2. Efecto funcional de la sobreexpresión de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C

Para analizar el efecto de la sobreexpresión de *ATAD3C* en el crecimiento de los fibroblastos se midió el tiempo de duplicación de fibroblastos C3 y de estos sobreexpresando ATAD3C-HA, tanto en el medio de cultivo rico en glucosa como en medio con galactosa (condiciones de biogénesis mitocondrial).

La sobreexpresión de ATAD3C-HA en los fibroblastos C3, aumentó significativamente el tiempo de duplicación (162,2 %) respecto C3. Cuando se utilizó medio con galactosa, el tiempo de duplicación todavía fue superior (175,9 %) respecto C3 en galactosa (Figura 5.21).

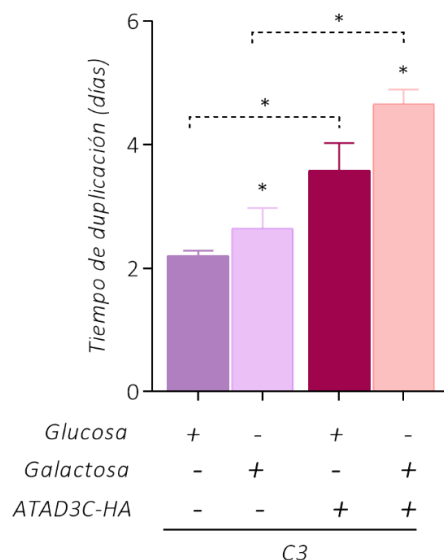


Figura 5.21 Tiempo de duplicación (días) de los fibroblastos C3 y C3^{ATAD3C-HA} en glucosa y en galactosa. Se mantuvieron en cultivo hasta 10 días. Los datos se representan como la media \pm SD (n=3) del tiempo de duplicación en las células crecidas en un medio con glucosa o con galactosa. *Tiempo de duplicación (días)*: C3 glucosa: $2,2 \pm 0,07$; C3 galactosa: $2,64 \pm 0,33$; C3^{ATAD3C-HA} glucosa: $3,58 \pm 0,43$; C3^{ATAD3C-HA} galactosa: $4,65 \pm 0,23$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la línea celular que se indica en cada comparación.

Puesto que la sobreexpresión de la proteína ATAD3C afecta al crecimiento de los fibroblastos y el efecto es mayor en galactosa que en glucosa, estudiamos si estaba afectado el sistema OXPHOS. Medimos en un polarógrafo la respiración endógena de los fibroblastos (Figura 5.22). Se confirmó que la sobreexpresión de ATAD3C reducía el consumo de oxígeno en los fibroblastos. La sobreexpresión de ATAD3B también redujo significativamente el consumo de oxígeno, sin embargo esto no ocurrió al sobreexpresar ATAD3A.

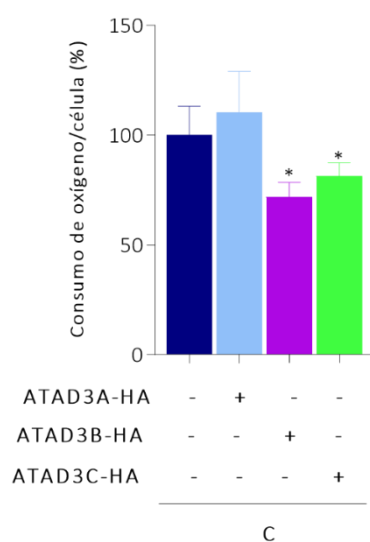


Figura 5.22 Respiración endógena por célula de los fibroblastos C, C^{ATAD3A-HA}, C^{ATAD3B-HA} y C^{ATAD3C-HA}. Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del consumo de oxígeno por célula (% $\text{fmol O}_2/\text{ml}/\text{min}/\text{célula}$) (n=3). *Consumo de oxígeno/célula (%)*: C: $100 \pm 13,24$; C^{ATAD3A-HA}: $110,37 \pm 18,68$; C^{ATAD3B-HA}: $71,81 \pm 6,58$; C^{ATAD3C-HA}: $81,44 \pm 6$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$ respecto C.

5.8.3. Estudio de la formación de oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante SDS-PAGE

Se ha descrito que ATAD3A dimeriza bajo condiciones no reductoras (Zhao et al., 2019). Nuestros resultados en los experimentos de inmunoprecipitación en células HEK293T indican que las tres proteínas pueden formar dímeros. Para estudiar si en fibroblastos ocurre lo mismo, se realizó la extracción de proteínas totales a partir de células C, C^{ATAD3A-HA}, C^{ATAD3B-HA} y C^{ATAD3C-HA} que se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando el buffer de solubilización con digitonina (*Apartado 7.4.4*) sin β -mercaptoetanol, para mantener los puentes disulfuro.

Tras la inmunodetección, en todos los casos se observó una banda compatible con el tamaño de la proteína sobreexpresada además de algunas bandas de alto peso molecular (Figura 5.23). El peso molecular de cada banda detectada se estimó comparando la migración de la banda en el gel con la migración de las bandas de peso molecular conocido del marcador de pesos moleculares. En la Tabla 5.5 se recoge la migración en el gel en mm de cada especie detectada y su peso molecular aparente, que se asoció con una especie oligomérica cuando sus pesos moleculares $\pm 10\%$ coincidían. Las medidas de migración del marcador de pesos moleculares y la gráfica representando su migración respecto al peso molecular se puede encontrar en Anexo I, Tabla 9.5.

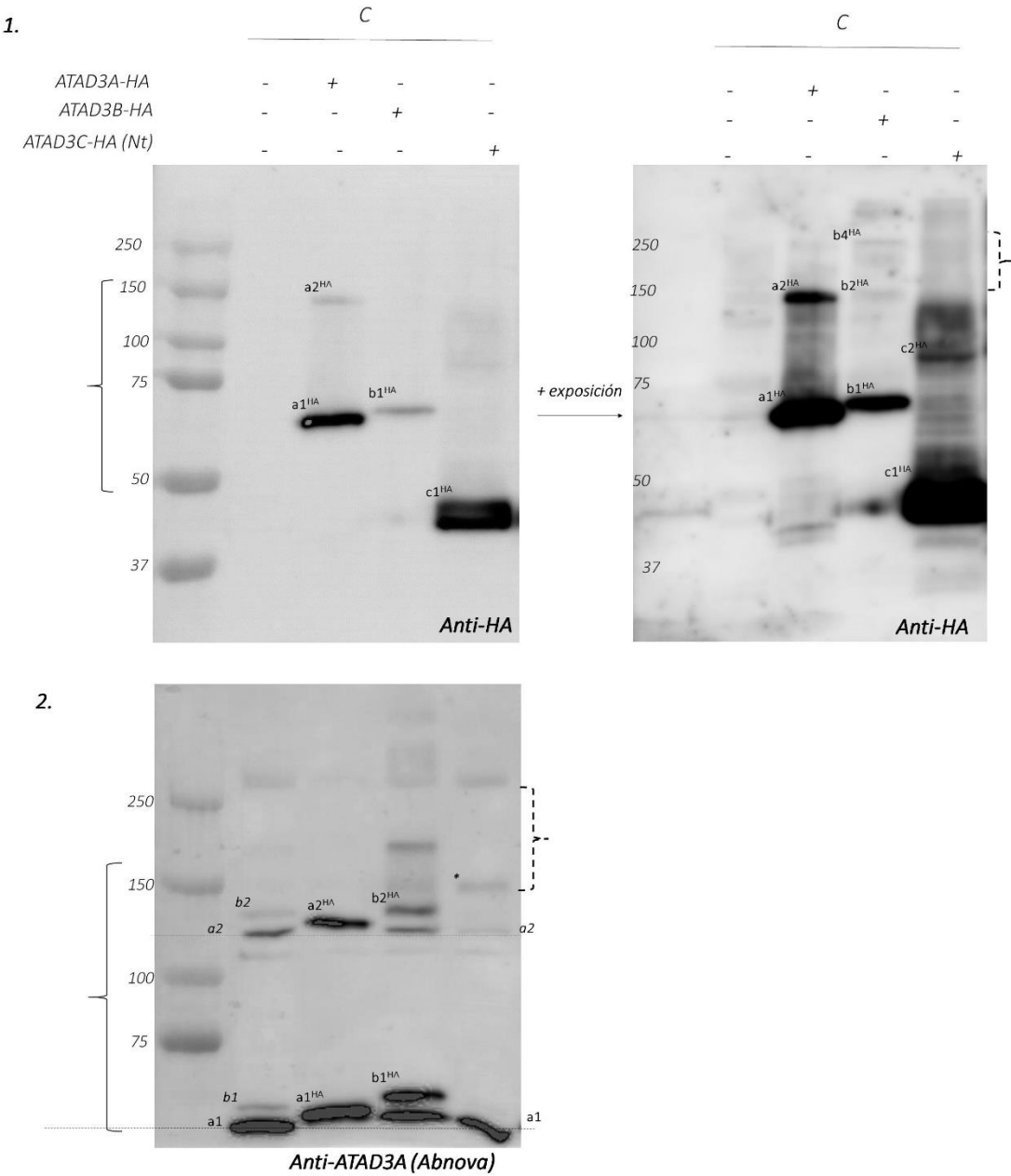


Figura 5.23 Imagen de la inmunodetección de proteína total aislada de fibroblastos C, CATAD3A-HA, CATAD3B-HA y CATAD3C-HA. Las proteínas se separaron mediante geles SDS-PAGE. Se utilizó el buffer de solubilización con digitonina (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, EDTA 1 mM, digitonina 1 % e inhibidor de proteasas). La inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-HA (membrana 1, gel 10 % AA/BA) y con el anticuerpo anti-ATAD3A de Abnova (membrana 2, gel 7 % AA/BA). Las bandas que se inmunodetectan para ATAD3A-HA se identifican como bandas a, para ATAD3B-HA como bandas b y para ATAD3C-HA como bandas c, seguidas del número de subunidades si se ha podido identificar. HA indica que son subunidades que contienen epítipo.

Tabla 5.5. Datos de la migración de las bandas detectadas en el gel SDS-PAGE revelado con el anticuerpo anti-HA y anti-ATAD3A y los pesos moleculares estimados. Con la recta patrón calculada con todas las proteínas del marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Standards* (BIO-RAD) se estimaron los pesos moleculares de las bandas (Anexo I, Tabla 9.5). Se indica la especie oligomérica a la que podría ajustarse cada banda de acuerdo con su peso molecular aparente. ✓ indica que el peso molecular de la banda detectada coincide con el peso molecular teórico de una especie oligomérica. La banda b4^{HA} quedaba fuera de la recta patrón, se estimó su peso molecular con las bandas del marcador de pesos moleculares más cercana a ella (250 kDa - 150 kDa).

Membrana inmunodetectada con anti-HA					
Banda	mm migración	kDa estimados	Compatible con kDa teóricos	kDa teóricos	
a1 ^{HA}	45,5	73,24	✓	67,32	Monómero ATAD3A
a2 ^{HA}	21,5	146,13	✓	134,64	Dímero ATAD3A
b1 ^{HA}	43	78,7	✓	73,67	Monómero ATAD3B
b2 ^{HA}	20,5	150,4	✓	147,34	Dímero ATAD3B
b4 ^{HA}	10	273,47	✓	294,68	Tetrámero ATAD3B
c1 ^{HA}	65,5	41,186	✓	47,47	Monomero ATAD3C
c2 ^{HA}	33,5	103,45	✓	94,94	Dímero ATAD3C
Membrana inmunodetectada con anti-ATAD3A (Abnova)					
Banda	mm migración	kDa estimados	Compatible con kDa teóricos	kDa teóricos	
a2	43	132,4	✓	132,43	Dímero ATAD3A
b2	39	137,94	✓	145,146	Dímero ATAD3B
*	33	155,99			

Como se muestra en la Figura 5.23 1., en los fibroblastos C^{ATAD3A-HA} se detectó la proteína ATAD3A-HA (a1^{HA}) además de una banda superior compatible con un dímero de la proteína ATAD3A-HA (a2^{HA}). En la calle correspondiente a fibroblastos C^{ATAD3B-HA} se detectó la proteína ATAD3B-HA (b1^{HA}). Cuando la membrana se expuso durante más tiempo, se consiguieron detectar dos bandas altas para ATAD3B-HA, que podrían corresponder con un dímero de la proteína (b2^{HA}) y un tetrámero (b4^{HA}). En la calle correspondiente a fibroblastos C^{ATAD3C-HA} se detectó elevada expresión de la proteína ATAD3C-HA en forma de monómero (c1^{HA}), así como una banda superior (c2^{HA}), que es compatible con un dímero de ATAD3C. Por encima de esta banda se detectó una señal continua que puede indicar degradación de alguna especie de tamaño superior.

La hibridación de un duplicado de la membrana con el anticuerpo frente ATAD3B (Sigma), mostró con mayor intensidad las bandas que podrían corresponder con el dímero y tetrámero de ATAD3B (Anexo I, Figura 9.8).

Una tercera membrana, con mayor separación entre las proteínas, se hibridó con el anticuerpo anti-ATAD3A (Abnova) con el objetivo de detectar la proteína endógena además de la sobreexpresada (Figura 5.23 2.). En los fibroblastos C se detectaron las bandas correspondientes a monómeros de ATAD3A y ATAD3B (para los que no se pudo estimar el peso molecular porque las bandas quedan fuera de la recta patrón) y bandas compatibles con homo-dímeros de proteína endógena ATAD3A y ATAD3B ($\alpha 2$ y $\beta 2$, respectivamente). El dímero de ATAD3A ($\alpha 2$) se detectó también en los fibroblastos $C^{ATAD3B-HA}$ y $C^{ATAD3C-HA}$. En los fibroblastos $C^{ATAD3C-HA}$ se detecta una nueva banda (*), con un tamaño estimado de 155,99 kDa, compatible con hetero-oligómeros formados por una subunidad de ATAD3A (la proteína ATAD3 de mayor expresión endógena) y una de ATAD3C (sobreexpresada).

Estos resultados indican que en fibroblastos las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C tanto sobreexpresadas como endógenas forman homo-dímeros en los que participan los puentes disulfuro, además de formar otros oligómeros de tamaño superior. Es posible que ATAD3C también pueda formar hetero-oligómeros con ATAD3A.

5.8.4. Estudio de la formación de oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C mediante Blue Native-PAGE

La electroforesis desnaturizante sin agente reductor indicó que cada proteína de la familia ATAD3 sobreexpresada formaba un homo-dímero. Para estudiar si estos, a su vez, formaban parte de complejos de mayor peso molecular, se estudiaron enriquecidos mitocondriales mediante electroforesis nativa (BN-PAGE).

En primer lugar, se analizaron mitocondrias aisladas de fibroblastos C con los anticuerpos anti-ATAD3A y anti-ATAD3B (Figura 5.24). Se detectó una banda muy ancha e intensa para el complejo de ATAD3A, de alto peso molecular, que correspondería con el complejo de 800-900 kDa, que han descrito otros autores (Frazier et al., 2021; Gilquin, Taillebourg, et al., 2010; Peralta et al., 2019). Se detectaron al menos otras dos bandas de menor peso molecular. La inmunodetección con anti-ATAD3B permitió detectar una banda de alto peso molecular (de aproximadamente 900 kDa, localizada justo por debajo de las bandas de supercomplejos, Anexo I, Figura 9.9), y una inferior. La banda superior de ATAD3B coincide con la parte alta del complejo de ATAD3A (de unos 900 kDa)

(Figura 5.24). Estos análisis indican la presencia de las proteínas ATAD3A y ATAD3B endógenas en complejos de alto peso molecular en la membrana mitocondrial.

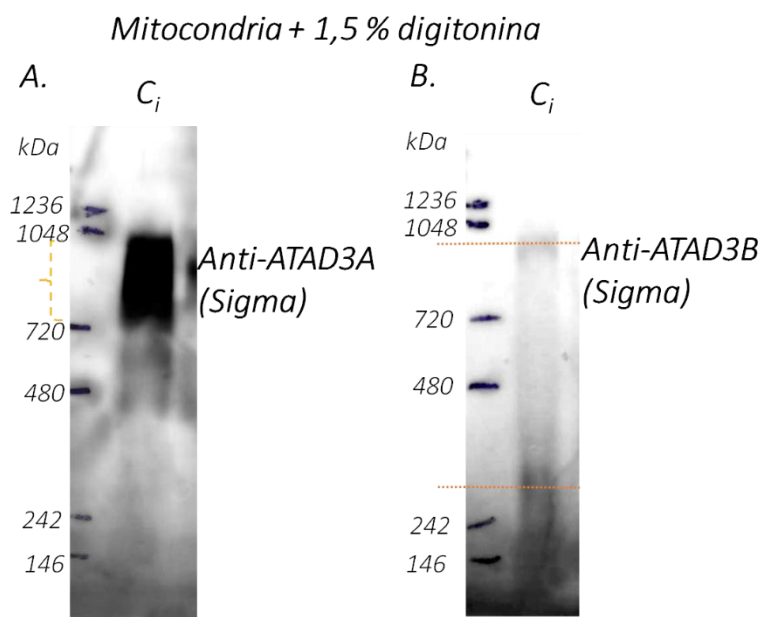


Figura 5.24. Imagen de la inmunodetección de ATAD3A (A.) y ATAD3B (B.) en mitocondrias solubilizadas con digitonina de fibroblastos C_j . Se separaron los complejos nativos mediante Blue Native-PAGE. La llave dibujada en el gel indica la banda detectada para ATAD3A (complejo de 800-900 kDa) y las líneas naranjas indican la zona central de las dos bandas detectadas para ATAD3B. Se cargaron 42,6 μ g de la fracción mitocondrial solubilizada por calle.

A continuación, se aislaron fracciones mitocondriales de las líneas celulares C , $C^{ATAD3A-HA}$, $C^{ATAD3B-HA}$ y $C^{ATAD3C-HA}$, se solubilizaron con digitonina al 1,5 % de concentración final y se analizaron mediante Blue Native-PAGE e inmunodetección. Se detectaron los complejos formados por las proteínas ATAD3A-HA, ATAD3B-HA y ATAD3C-HA en la membrana y se estimó su peso molecular teniendo en cuenta la migración en el gel del marcador de pesos moleculares utilizado en Blue Native-PAGE (Figura 5.25). Puesto que se trata de proteínas de membrana, se estimó también su peso molecular teniendo en cuenta la migración de los complejos respiratorios, siempre que las bandas quedasen dentro del rango (Figura 5.25). En las condiciones que hemos utilizado las dos estimaciones deberían darnos valores semejantes (Wittig et al., 2010). En la Tabla 5.6 se recoge la migración en el gel en mm de cada especie detectada y su peso molecular aparente, que se asoció con una especie oligomérica cuando sus pesos moleculares, con una variación ± 15 %, coincidían. Las medidas de migración del marcador de pesos moleculares, los complejos OXPHOS y las gráficas representando su migración respecto al peso molecular se pueden encontrar en Anexo I, Tabla 9.6.

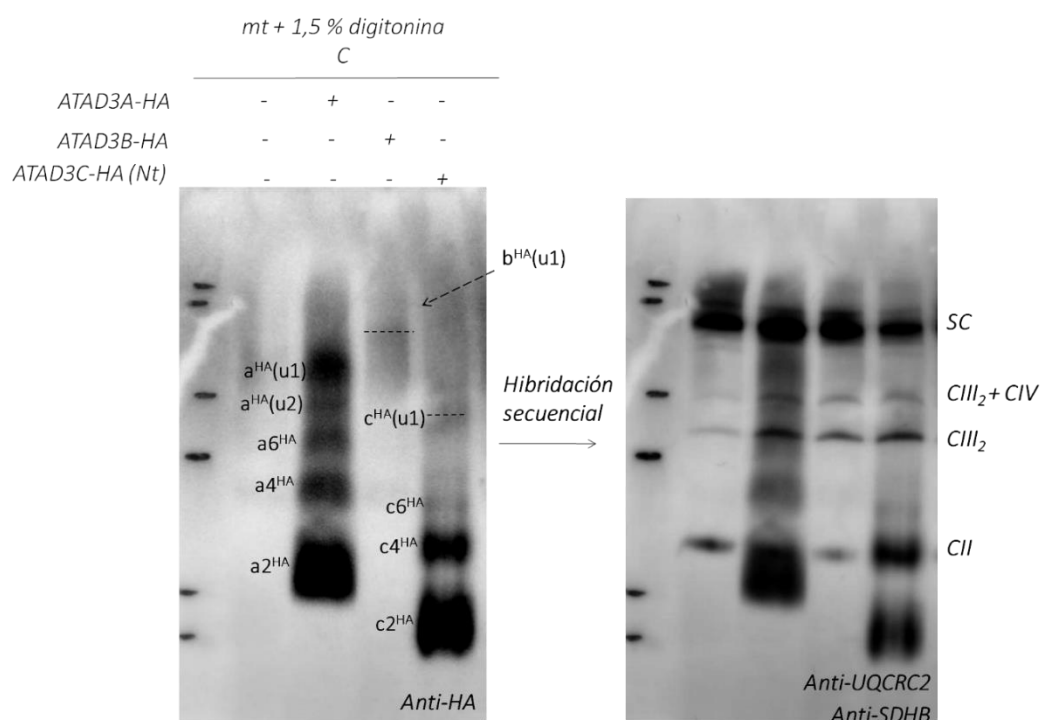


Figura 5.25 Imagen de las inmunodetecciones de los oligómeros de las proteínas ATAD3A-HA, ATAD3B-HA y ATAD3C-HA en la membrana mitocondrial interna. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitocondrias aisladas de fibroblastos C, C^{ATAD3A-HA}, C^{ATAD3B-HA}, C^{ATAD3C-HA}, mediante Blue Native-PAGE. Las bandas que se inmunodetectan para ATAD3A-HA se identifican como bandas a, para ATAD3B-HA como bandas b y para ATAD3C-HA como bandas c, seguidas del número de subunidades si se ha podido identificar. Las bandas que no se han podido identificar se etiquetan como desconocidas (u, *unknown*). HA indica que son subunidades que contienen epítipo.

Tabla 5.6 Cuantificación de la migración en el gel Blue Native-PAGE de las bandas inmunodetectadas con el anticuerpo anti-HA y estimación de sus pesos moleculares aparentes. Se indica la especie oligomérica a la que podría ajustarse cada banda de acuerdo con su peso molecular aparente. ✓ indica que el peso molecular de la banda detectada coincide con el peso molecular teórico de una especie oligomérica.

Banda	mm migración	kDa estimados con marcador de pesos moleculares	Compatible con kDa teóricos	kDa teóricos		kDa estimados con pesos moleculares de complejos OXPHOS
a2 ^{HA}	73,5	120	✓	134,64	Dímero ATAD3A	
	63,1	172,69				
a4 ^{HA}	48,2	290,91	✓	269,28	Tetrámero ATAD3A	250,88
a6 ^{HA}	38,1	414,26	✓	403,92	Hexámero ATAD3A	424,36
a ^{HA} (u1)	28,9	571,63				684,95
a ^{HA} (u2)	21	753,70				1033,23
b ^{HA} (u1)	14,6	942,93				1415,33
c2 ^{HA}	83,6	84,27	✓	94,94	Dímero ATAD3C	
	75,7	111,11	✓	94,94	Dímero ATAD3C	
c4 ^{HA}	62,6	175,74	✓	189,88	Tetrámero ATAD3C	
c6 ^{HA}	52	254,68	✓	284,82	Hexámero ATAD3C	205,87
c ^{HA} (u1)	33	495,22				553,35

La sobreexpresión de ATAD3A-HA permitió detectar una escalera de bandas en el gel nativo (Figura 5.25). Se observó una banda inferior muy ancha, a2^{HA}, cuya zona inferior es compatible con homo-dímero de ATAD3A, coincidiendo con la identificación de homo-dímero en el gel SDS-PAGE. Las bandas a4^{HA} y a6^{HA} podrían tratarse de tetrámeros y hexámeros de ATAD3A-HA, respectivamente. Las bandas superiores, a^{HA}(u1) y a^{HA}(u2), podrían corresponder a oligómeros de ATAD3A-HA unidos a otras proteínas.

La sobreexpresión de ATAD3C-HA también permitió detectar varias bandas en la membrana. En la zona inferior, se detectó una banda muy ancha, c2^{HA}, muy intensa que podría corresponder con un homo-dímero de ATAD3C. Las bandas c4^{HA} y c6^{HA} podrían ser compatibles con tetrámero y hexámero de ATAD3C-HA, respectivamente. La banda tenue superior, c^{HA}(u1), podría corresponder a oligómeros de ATAD3C-HA posiblemente unidos a otras proteínas o lípidos de membrana.

La coincidencia de pesos moleculares con las especies oligoméricas, indica que las proteínas ATAD3A y ATAD3C, dan lugar a la especie funcional hexamérica descrita para las AAA⁺ ATPasas mediante asociación de dímeros y tetrámeros.

Cuando se sobreexpresó ATAD3B-HA (Figura 5.25), únicamente se detectó una banda tenue en la parte superior del gel nativo, b^{HA}(u1), que podría ser un complejo de alto peso molecular del que forme parte ATAD3B-HA. Sin embargo, no se detectaron especies oligoméricas.

5.8.5. Efecto de la sobreexpresión de ATAD3C sobre otros complejos de la membrana mitocondrial, utilizando Blue Native-PAGE

Cuando, tras la separación en geles Blue Native-PAGE, inmunodetectamos el complejo de alto peso molecular que forma ATAD3A en la membrana mitocondrial (800-900 kDa), observamos que la sobreexpresión de ATAD3C reduce tamaño (hasta aproximadamente 700 kDa). Este efecto se observó en fibroblastos control (C y C3) y derivados del paciente P sobreexpresando ATAD3C-HA (Anexo I, Figura 9.10), y también en fibroblastos inmortalizados sobreexpresando ATAD3C, que se generaron para poder obtener mayor rendimiento en la purificación de mitocondrias (C_i, C_i^{ATAD3C}, C3_i, C3_i^{ATAD3C}, P_i, P_i^{ATAD3C}, Figura 5.26).

Este resultado podría explicarse por la introducción de hetero-dímeros de ATAD3A y ATAD3C, o por la introducción de homo-oligómeros de ATAD3C, en el ensamblaje de los hexámeros de ATAD3A.

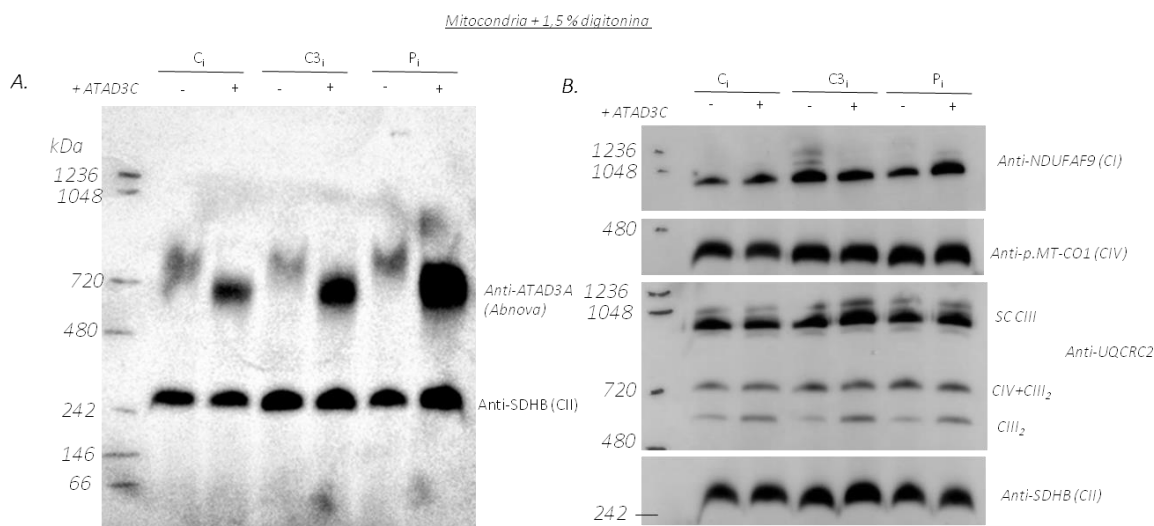


Figura 5.26 Imagen de la inmunodetección de oligómeros de las proteínas ATAD3A y ATAD3C en la membrana mitocondrial interna. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitocondrias aisladas de fibroblastos C_i, C_i^{ATAD3C}, C3_i, C3_i^{ATAD3C}, P_i, P_i^{ATAD3C}, mediante Blue Native-PAGE. Se cargaron 21 µg de mitocondrias por calle.

A continuación, se estudió el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria, CI, CIII, CIV y CII en estas líneas celulares (Figura 5.26 B.). El complejo III se detectó en forma de supercomplejos (SC CIII), ensamblado con el CIV (CIV+CIII) y en forma de dímero (CIII₂). La cantidad de dímero del complejo III aumentó al sobreexpresar la proteína ATAD3C en todos los fibroblastos C, C3 y P, si se utiliza CII para normalizar y se compara con los fibroblastos sin transfectar (Figura 5.26 B.). También se detectó una disminución de la banda de los supercomplejos (Anexo I, Figura 9.10) que podría deberse a que cuánto más complejo III se encuentra en forma de dímero, libre, menor CIII se encuentra en forma de supercomplejos. Por lo tanto, la sobreexpresión de ATAD3C afecta el ensamblaje de CIII₂ en complejos de mayor peso molecular.

5.8.6. Análisis de la formación de complejos en membrana mediante electroforesis bidimensional

Para analizar la composición de los complejos que observamos al sobreexpresar ATAD3A y ATAD3C, se aislaron mitocondrias de fibroblastos, se separaron en un gel nativo (1D-BN-PAGE) y, a continuación, cada calle se recortó y se corrió en un gel desnaturizante en segunda dimensión (2D-Tricina-SDS-PAGE) (*Apartado 7.4.5.3*).

En la Figura 5.27, se muestran las segundas dimensiones obtenidas para fibroblastos C, C^{ATAD3A-HA} y C^{ATAD3C-HA}, hibridadas con anticuerpos contra el epítipo HA, contra ATAD3A y contra subunidades de los complejos OXPHOS. Los complejos OXPHOS, CI, CII o CIV, se utilizaron para alinear entre sí las distintas membranas. La posición de dos puntos de proteínas en una misma línea vertical del gel 2D indica su presencia en el mismo complejo multiproteico en el gel 1D (Camacho-Carvajal et al., 2004).

Cuando se separan en segunda dimensión los complejos de membrana de fibroblastos C, (Figura 5.27 A., anticuerpo anti-ATAD3A), la proteína ATAD3A se encuentra, a la altura correspondiente a 66 kDa, en tres puntos. El punto más tenue, a la derecha de la línea verde (correspondiente a CV) corresponde con el complejo de alto peso molecular en el que se encontró la proteína ATAD3A endógena en 1D-BN-PAGE. Los otros dos puntos, uno muy intenso a la derecha de la línea roja (correspondiente a CII), y otro a la derecha de la línea amarilla (correspondiente a CIV), indican que hay intermediarios de ensamblaje con gran cantidad de proteína ATAD3A acumulados, que no se lograron detectar en 1D en fibroblastos C (Figura 5.24).

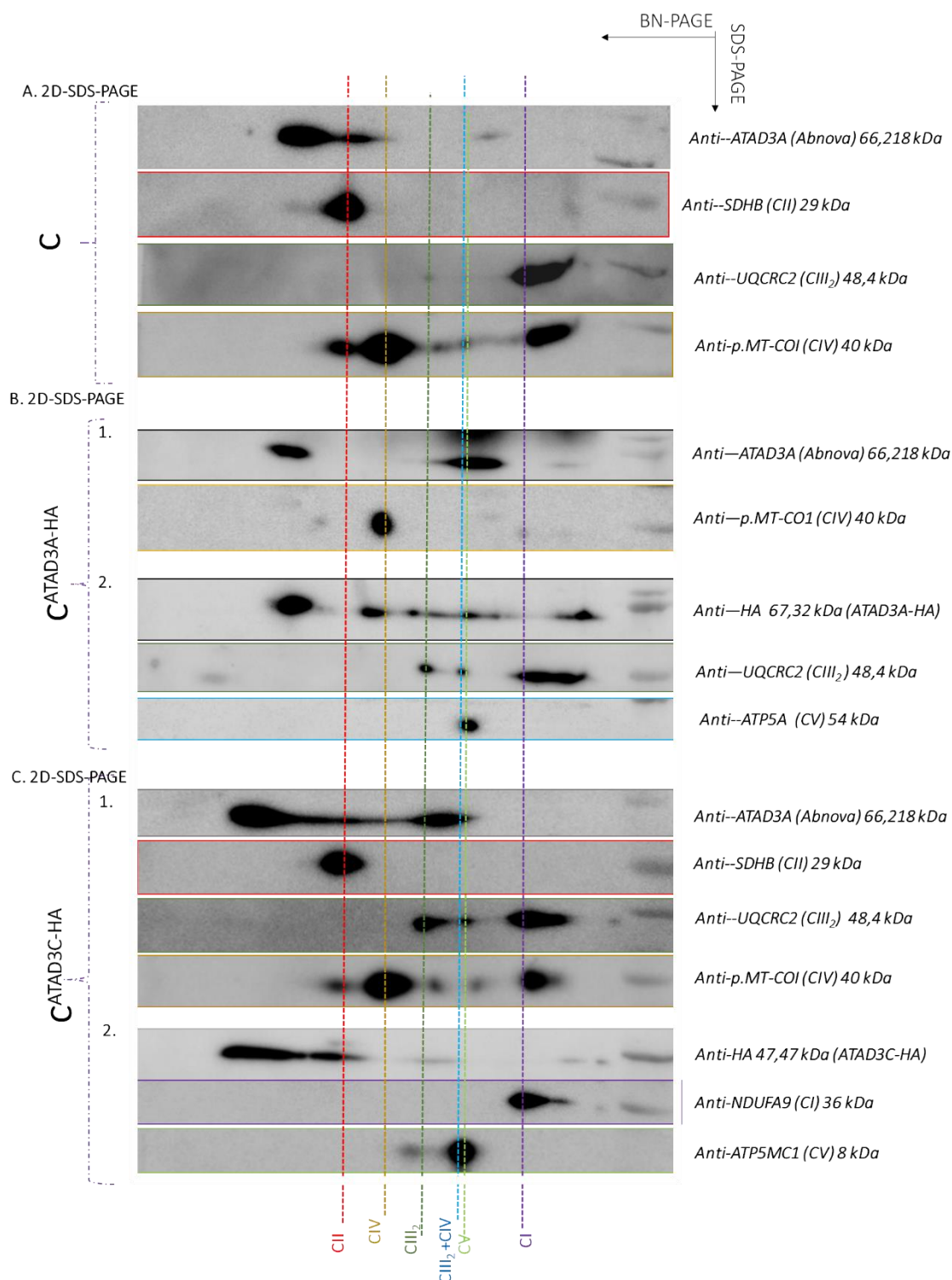


Figura 5.27. Imagen de la inmunodetección de las proteínas ATAD3A y ATAD3B, y de proteínas de los complejos OXPHOS tras la separación en electroforesis bidimensional de proteínas mitocondriales de fibroblastos C, C^{CATAD3A-HA} y C^{CATAD3C-HA}. Para comparar las membranas, se alinearon utilizando las posiciones de los complejos respiratorios CI, CII y CIV, que no se alteraron entre las diferentes líneas celulares en 1D. La hibridación de los anticuerpos fue secuencial para cada membrana (1 y 2) de cada línea celular.

El complejo de ATAD3A de alto peso molecular (800-900 kDa) se detecta con mayor intensidad en fibroblastos $C^{ATAD3A-HA}$ (Figura 5.27 B. membrana 1, anticuerpo anti-ATAD3A), en los que también se detecta con gran intensidad el intermediario de menor peso molecular. En esta misma línea $C^{ATAD3A-HA}$, se detecta en segunda dimensión ATAD3A-HA, a la altura de 66 kDa, en cinco puntos intensos (Figura 5.27 B. membrana 2, anticuerpo anti-HA). Estos puntos corresponden a la escalera de bandas que se observaba en 1D-BN-PAGE con el anticuerpo anti-HA ($a2^{HA}$, $a4^{HA}$, $a6^{HA}$, $a^{HA}(u1)$) lo que nos permite confirmar que no eran bandas inespecíficas (Figura 5.25 y Figura 5.28). El intermediario de bajo peso molecular que se acumula en el ensamblaje del complejo de ATAD3A endógeno, corresponde con la banda $a2^{HA}$ compatible con homo-dímero de ATAD3A-HA, en $C^{ATAD3A-HA}$ (Figura 5.28), por lo que podemos especular que de forma endógena hay un reservorio de dímero de la proteína.

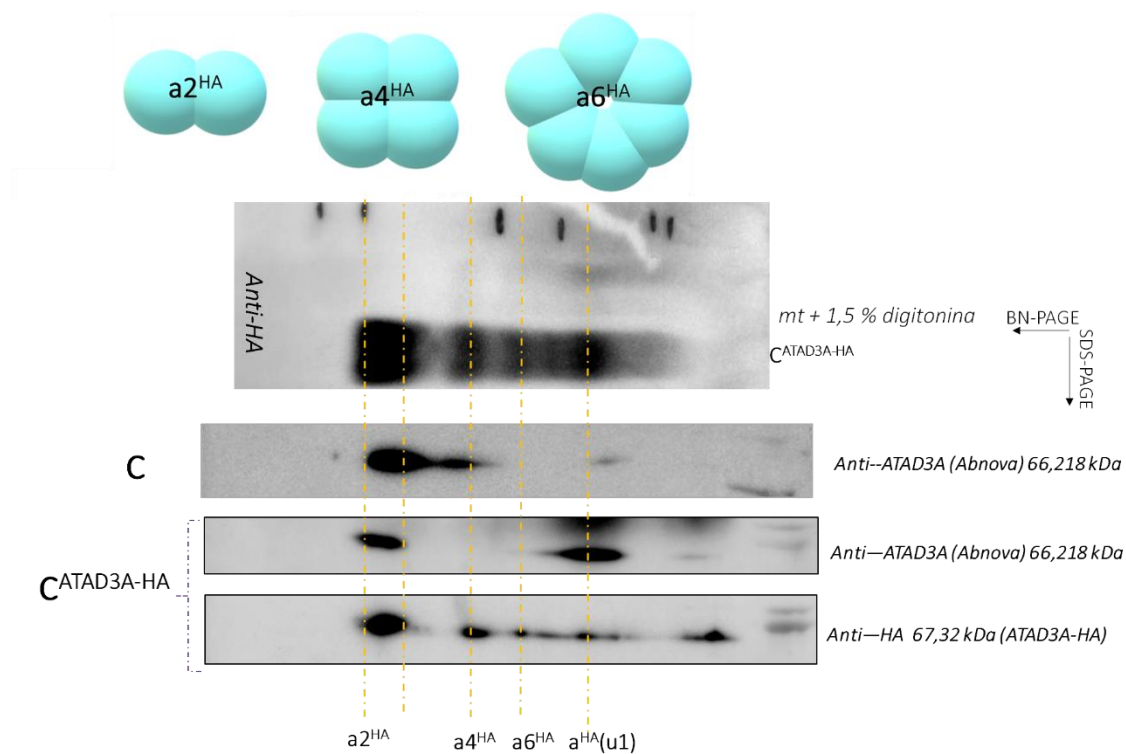


Figura 5.28. Imagen recopilación de la inmunodetección de ATAD3A-HA en 1D-Blue Native-PAGE (Figura 5.25) seguida de 2D-SDS-PAGE (Figura 5.27) de la fracción mitocondrial aislada de fibroblastos C y $C^{ATAD3A-HA}$. Las especies identificadas de ATAD3A-HA se relacionan entre ambas membranas con líneas amarillas. Se muestra un dibujo explicativo de las especies formadas por ATAD3A en la membrana (creado con Paint).

En fibroblastos que sobreexpresan ATAD3C se había observado, tras la separación mediante Blue Native-PAGE, que el complejo de alto peso molecular de ATAD3A (800-900 kDa) disminuye de tamaño (Figura 5.26). Tras la separación en segunda dimensión, se confirma que el punto correspondiente en fibroblastos C, a la derecha de la línea verde (Figura 5.27 A., anticuerpo anti-ATAD3A), se detecta a la izquierda de la línea azul en fibroblastos $C^{ATAD3C-HA}$ (Figura 5.27 C. membrana

1, anticuerpo anti-ATAD3A). El reservorio de ATAD3A de bajo peso molecular también se encuentra a menor tamaño (más a la izquierda en 2D) que el reservorio de fibroblastos C o C^{ATAD3A-HA}. En la Figura 5.29 se comparan únicamente las hibridaciones de la Figura 5.27 con anti-ATAD3A y anti-ATAD3C-HA para la línea de fibroblastos C^{ATAD3C-HA}.

En estos fibroblastos, la proteína ATAD3C-HA se detecta en tres puntos, uno a la izquierda de la línea azul, en el punto en que también detectamos ATAD3A, y otros dos a la izquierda de la línea roja (Figura 5.27 C. membrana 2, anticuerpo anti-HA). Estos puntos, corresponden con homodímeros y tetrámeros de ATAD3C-HA (banda c2^{HA} y c4^{HA} en Blue Native-PAGE, Figura 5.25).

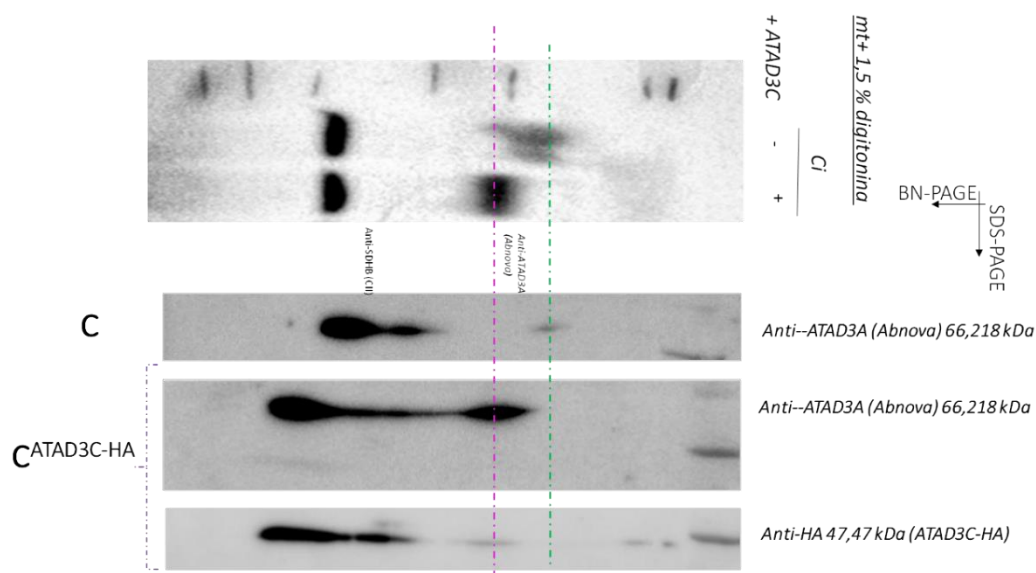


Figura 5.29 Imagen recopilación de la inmunodetección de ATAD3A y ATAD3C en 1D-Blue Native-PAGE (Figura 5.25) seguida de 2D-SDS-PAGE (Figura 5.27) de la fracción mitocondrial aislada de fibroblasto C y C^{ATAD3C-HA}. La línea verde señala el oligómero de ATAD3A de alto peso molecular y la línea morada el oligómero formado por ATAD3A y ATAD3C cuando se sobreexpresa ATAD3C-HA.

En fibroblastos que sobreexpresan ATAD3C también habíamos observado, mediante 1D-BN-PAGE, que se acumulaba el CIII₂ (Figura 5.26 B.) Este resultado también se confirmó mediante inmunodetección con anti-UQCRC2 tras la separación en segunda dimensión. En la Figura 5.27 A. membrana 1 y C. membrana 1, el punto correspondiente a CIII₂, que se encuentra en la línea verde es mucho más intenso en fibroblastos C^{ATAD3C-HA} que en C. Este resultado se puede observar también en la Figura 5.30 que recopila y compara la detección de los distintos complejos respiratorios en fibroblastos C y C^{ATAD3C-HA}.

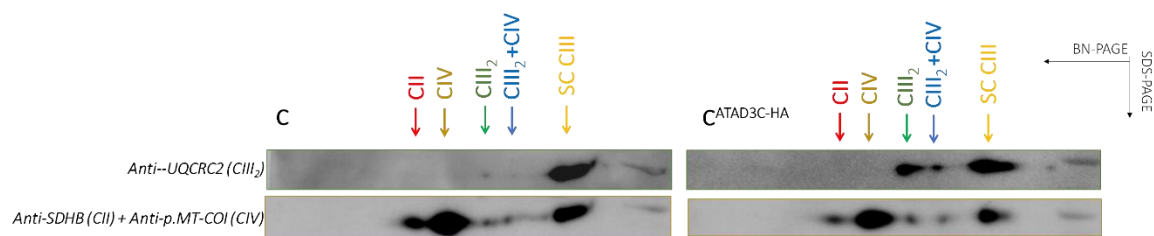


Figura 5.30 Imagen recopilación de las inmunodetecciones de los complejos respiratorios en 2D-SDS-PAGE (Figura 5.27) de la fracción mitocondrial aislada de fibroblastos C y C^{ATAD3C-HA}. Las flechas señalan los complejos respiratorios inmunodetectados en las membranas.

5.9. Estudio de la función mitocondrial en fibroblastos del paciente con mutaciones en *ATAD3C*

A pesar de no haber detectado *ATAD3C* en fibroblastos, vimos que *ATAD3C* puede dar lugar a una proteína que se ensambla formando oligómeros en la membrana mitocondrial de la misma manera que *ATAD3A* y que puede interactuar con *ATAD3A*. Por ello decidimos continuar el estudio de la función mitocondrial en fibroblastos del paciente.

5.9.1. Estudio de la morfología mitocondrial mediante microscopía electrónica

Mutaciones puntuales en *ATAD3A* en pacientes han llevado a la alteración en la ultraestructura de las crestas mitocondriales, pérdida de contacto entre la membrana externa e interna o crestas concéntricas (Peralta et al., 2019). Para determinar si las mutaciones en *ATAD3C* en el paciente alteraban la organización de las crestas mitocondriales, se estudió la morfología de las mitocondrias y de sus crestas mediante microscopía electrónica en fibroblastos C, C3 y P.

La ultraestructura mitocondrial normal se define por una forma tubular o esférica con una red de crestas bien definidas y una matriz electrodensa. Los fibroblastos analizados presentaron principalmente mitocondrias tubulares y muy alargadas, también se observaron mitocondrias circulares. No se observaron diferencias aparentes entre las mitocondrias de las células estudiadas, ni tampoco en sus crestas mitocondriales, que eran transversales y uniformes a lo largo de la mitocondria (Figura 5.31 A.).

La cuantificación del tamaño de las mitocondrias no mostró diferencias significativas entre las células del control y del paciente (Figura 5.31 B.). Se obtuvo mucha desviación estándar en los datos representados, puesto que se midieron todas las mitocondrias observadas en las preparaciones, independientemente de si eran alargadas o circulares, que podrían ser secciones de estas. El número de crestas mitocondriales con contactos en la membrana mitocondrial externa

fueron similares para ambas células C y P (Figura 5.31 C.). Estas comparaciones indican que las mutaciones en *ATAD3C* no interfieren en la estructura de las mitocondrias o sus crestas.

A.

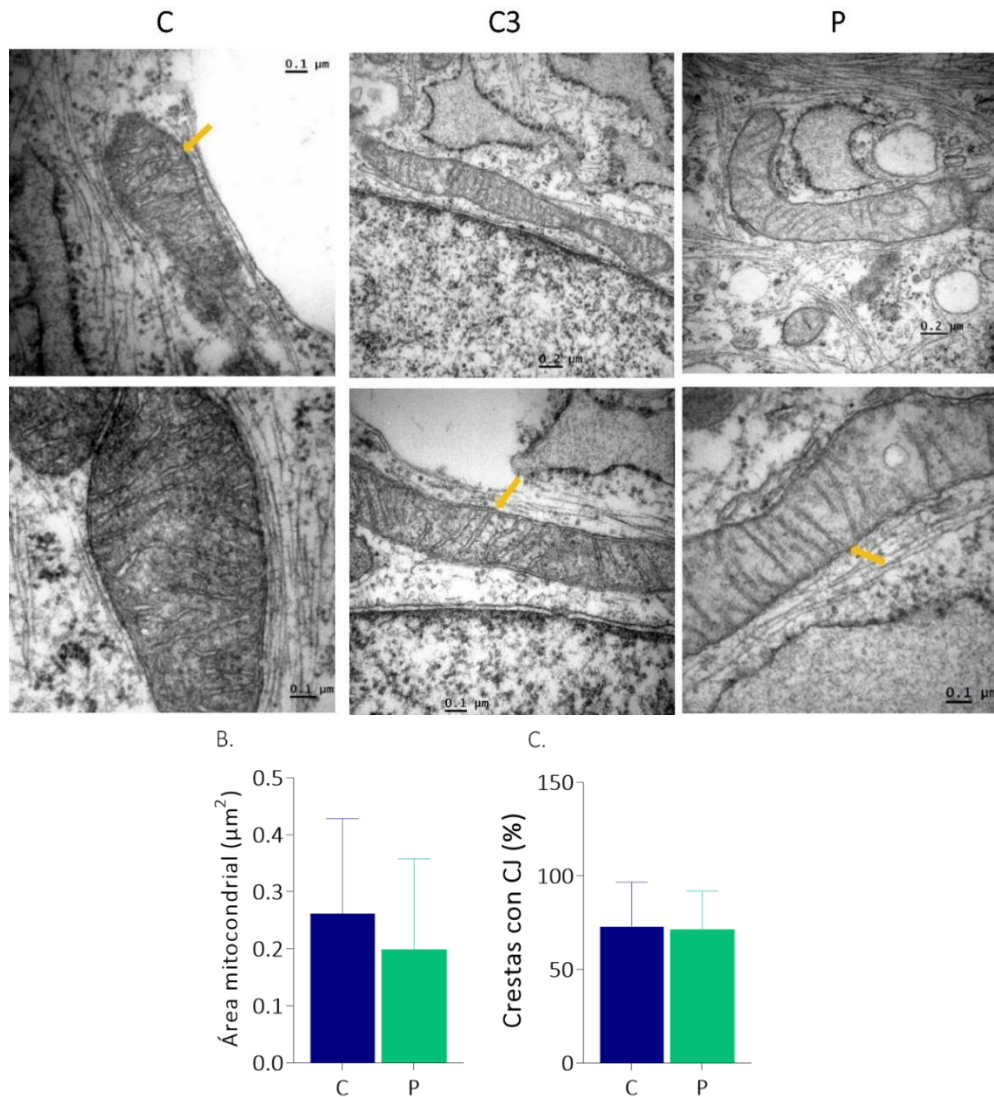


Figura 5.31. Ultraestructura mitocondrial de los fibroblastos control (C y C3) y paciente (P). A. Imágenes representativas de microscopía electrónica de los fibroblastos C, C3 y P. En vertical se muestran dos imágenes correspondientes a las mismas células. Se señalan ejemplos de crestas mitocondriales transversales y uniformes a lo largo de la mitocondria (flechas amarillas). B. Cuantificación del área mitocondrial (μm²). C. Cuantificación del número de crestas mitocondriales que contactan con la membrana mitocondrial externa (Cristae Junction) (%). Se observaron 40 mitocondrias para C y 49 mitocondrias para P. Los datos se representan como la media ± SD (desviación estándar). Y la significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05, comparando P con C.

5.9.2. Medida del crecimiento en cultivo y consumo de oxígeno

Para comprobar si los fibroblastos del paciente presentaban alguna deficiencia detectable en su crecimiento, se comparó el crecimiento de los fibroblastos P respecto a los fibroblastos derivados de un individuo control de edad similar, 3 años (C3), en medios de cultivo con glucosa y en medio de cultivo con galactosa.

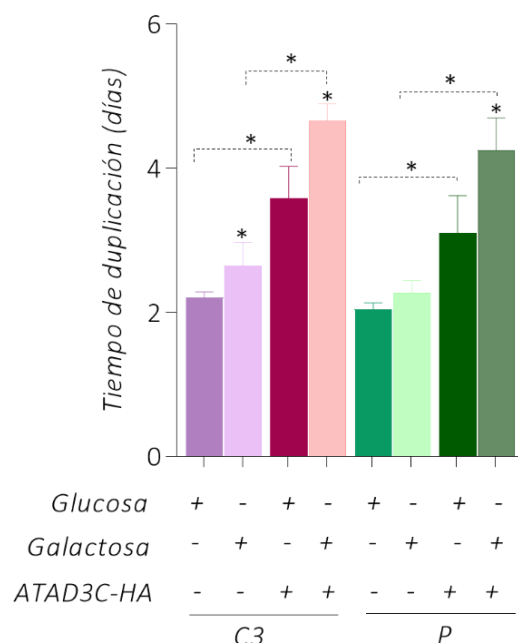


Figura 5.32. Tiempo de duplicación (días) de los fibroblastos C3, C3^{ATAD3C-HA}, P y P^{ATAD3C-HA} en glucosa y en galactosa. Se mantuvieron en cultivo hasta 10 días. Los datos se representan como la media \pm SD (n=3) del tiempo de duplicación en las células crecidas en un medio con glucosa o con galactosa. *Tiempo de duplicación (días):* C3 glucosa: $2,2 \pm 0,07$; C3 galactosa: $2,64 \pm 0,33$; C3^{ATAD3C-HA} glucosa: $3,58 \pm 0,43$; C3^{ATAD3C-HA} galactosa: $4,65 \pm 0,23$; P glucosa: $2,03 \pm 0,09$; P galactosa: $2,27 \pm 0,16$; P^{ATAD3C-HA} glucosa: $3,10 \pm 0,51$; P^{ATAD3C-HA} galactosa: $4,25 \pm 0,44$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, * $p < 0,05$, respecto la línea celular que se indica en cada comparación.

Los tiempos de duplicación, en días de fibroblastos P en glucosa ($2,03 \pm 0,091$) y en galactosa ($2,275 \pm 0,169$) fueron menores que los de C3 en glucosa ($2,207 \pm 0,075$) y en galactosa ($2,643 \pm 0,331$). Sin embargo, la tendencia de los fibroblastos P a crecer mejor en ambas condiciones no fue significativa (Figura 5.32).

Ambas líneas celulares aumentaron su tiempo de duplicación cuando se reemplazó la glucosa del medio de cultivo por galactosa. Este aumento fue significativo en el caso de las células C3, pero no lo fue en las células P.

Cuando se sobreexpresó ATAD3C-HA en los fibroblastos P, el tiempo de duplicación aumentó significativamente (152,7 %). Cuando se utilizó medio con galactosa, el tiempo de duplicación todavía fue superior respecto P en galactosa (186,8 %) (Figura 5.32).

A continuación se midió el consumo de oxígeno de fibroblastos derivados de un individuo control de 1 mes de edad (C) y derivados del paciente (P), utilizando un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®).

Los resultados de la respiración endógena de ambas líneas celulares no mostraron diferencias significativas, aunque, las células del paciente tendían a consumir más oxígeno que las del control (Figura 5.33).

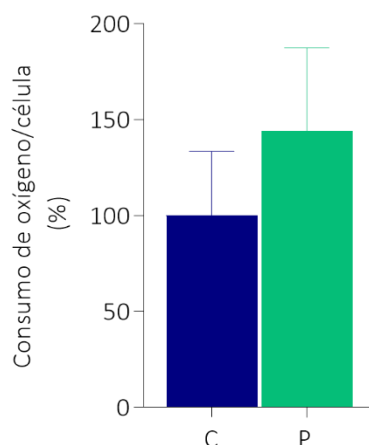


Figura 5.33 Respiración endógena por célula de los fibroblastos control (C) y paciente (P). Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del consumo de oxígeno por célula (% $\text{fmolO}_2/\text{ml}/\text{min}/\text{célula}$) ($n=3$). *Consumo de oxígeno/célula (%)*: C: $100 \pm 33,41$; P: $144,23 \pm 43,22$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, $*p < 0,05$. No hubo diferencias significativas entre P y C.

5.9.3. Medida de los niveles de DNA mitocondrial

El gen *ATAD3A* parálogo de *ATAD3C* se ha relacionado con el mantenimiento del mtDNA (Gerhold et al., 2015). Se cuantificaron los niveles de mtDNA en los fibroblastos C3, C y P, y se compararon respecto a los niveles de DNA nuclear mediante qPCR.

Las diferencias entre los tres fibroblastos no fueron significativas. Esto indica que las mutaciones que presenta el paciente no alteran el contenido de DNA mitocondrial en sus fibroblastos (Figura 5.34).

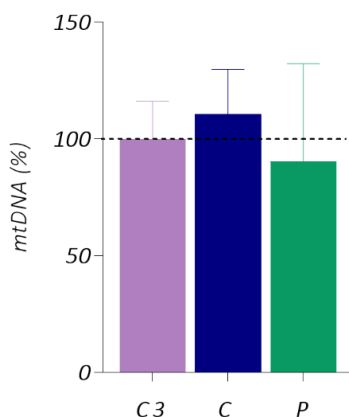


Figura 5.34. Número de copias de DNA mitocondrial (mtDNA) en fibroblastos control (C3 y C) y paciente (P). Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del % del contenido de DNA mitocondrial ($n=3$). *mtDNA (%)*: C3: $100 \pm 16,09$; C: $110,51 \pm 19,32$; P: $90,45 \pm 41,71$. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, $*p < 0,05$, comparando con C3 (la línea de puntos corresponde al contenido de mtDNA en las células C3 considerado el 100 %).

5.9.4. Estudio de la expresión de las proteínas ATAD3A y ATAD3B en fibroblastos

Para determinar si en fibroblastos del paciente están afectadas las proteínas ATAD3A y ATAD3B o a proteínas del sistema OXPHOS, fibroblastos C3 y P se analizaron (por triplicado) mediante geles SDS-PAGE e inmunodetección (Figura 5.35 A.).

La expresión de la proteína ATAD3A fue similar en los fibroblastos C3 y P con el anticuerpo frente ATAD3A. Sin embargo, la expresión de ATAD3B disminuyó significativamente en los fibroblastos P (Figura 5.35 A y B.).

No se encontraron diferencias de expresión entre las líneas P y C3 para la mayoría de las subunidades de los complejos respiratorios analizadas. Sin embargo, la expresión de la subunidad p.MT-CO1 del CIV fue significativamente mayor en los fibroblastos P que en C3 (Figura 5.35 B.) y la subunidad c de la ATP sintasa (ATP5MC1) mostró una tendencia a aumentar en los fibroblastos P (no fue significativo).

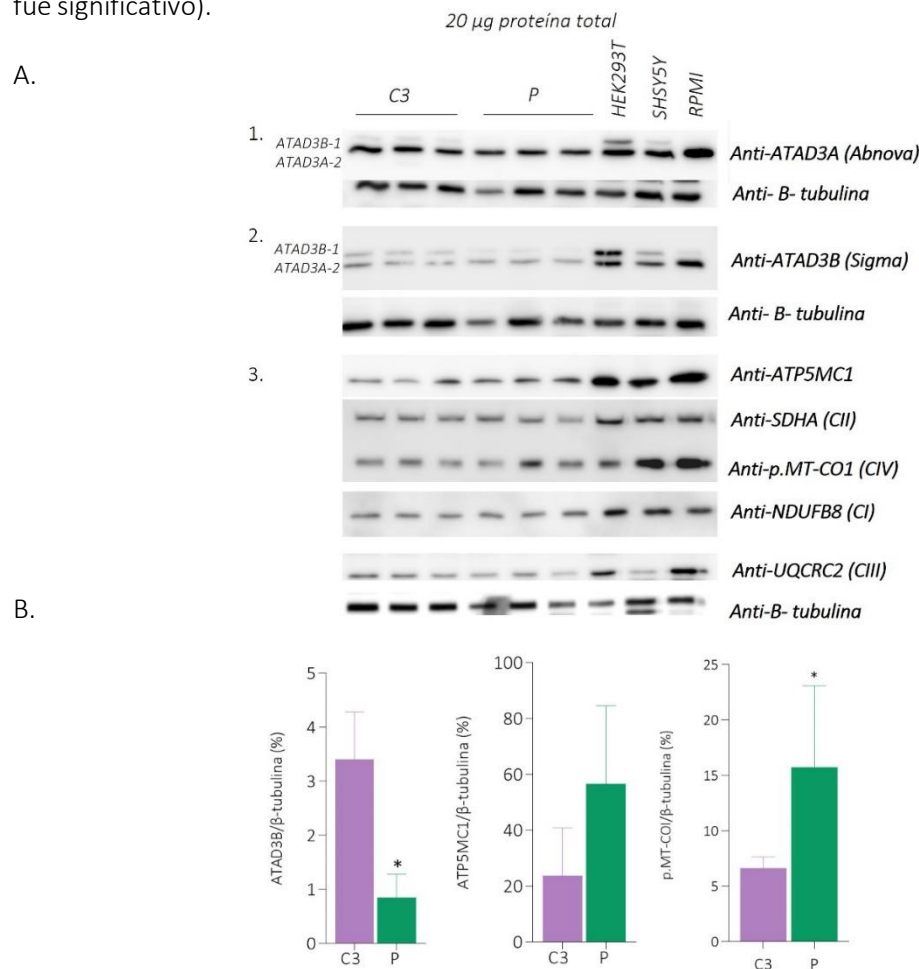


Figura 5.35. Cuantificación de los niveles de proteína ATAD3A y ATAD3B, y de proteínas del sistema OXPHOS en fibroblastos C3 y P (n=3), y en las líneas celulares HEK293T, SH-SY5Y y RPMI. A. Imagen de la inmunodetección de las proteínas separadas en geles SDS-PAGE. **B.** Representación gráfica de la cuantificación del Western Blot en los fibroblastos C3 y P (%). La β-tubulina se utilizó como control de carga en cada membrana analizada (1, 2, 3). Los datos se representan como la media ± SD (desviación estándar) de la expresión de las proteínas respecto la expresión de la tubulina. La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05, comparando con C3.

5.9.5. Estudio de los complejos de ATAD3A y ATAD3B y de los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial, utilizando Blue Native-PAGE

Puesto que la expresión de ATAD3B en geles SDS-PAGE disminuyó significativamente en los fibroblastos P (Figura 5.35 A y B.) estudiamos qué ocurre con los complejos que forman ATAD3B y ATAD3A en la membrana en condiciones nativas.

Se realizaron tres extracciones diferentes con detergentes suaves, que permiten que los complejos se mantengan intactos y no se disgreguen las proteínas que los componen. En la primera se aislaron mitoplastos a partir de fibroblastos C, C3 y P, y se trataron con 1 % de dodecilmaltósido (DDM). En segundo lugar, se aislaron mitocondrias a partir de fibroblastos C3 y P y se solubilizaron con 1,5 % de digitonina. Con el objetivo de aumentar el rendimiento en la purificación de mitocondrias, los fibroblastos C y P se inmortalizaron (*Apartado 7.1.13*), se aislaron mitocondrias y solubilizaron con 1,5 % de digitonina.

En primer lugar, se detectó una disminución de la expresión del complejo de alto peso molecular de ATAD3B (aproximadamente a 900 kDa) en los fibroblastos P respecto a los fibroblastos C3, no tan evidente respecto a control C (Figura 5.36 A. y B.). A continuación, se comprobó si los complejos de ATAD3A también se veían alterados en el paciente. Se observó una reducción de la cantidad del complejo de ATAD3A (800-900 kDa) en fibroblastos P_i en comparación con C_i (Figura 5.36 C.).

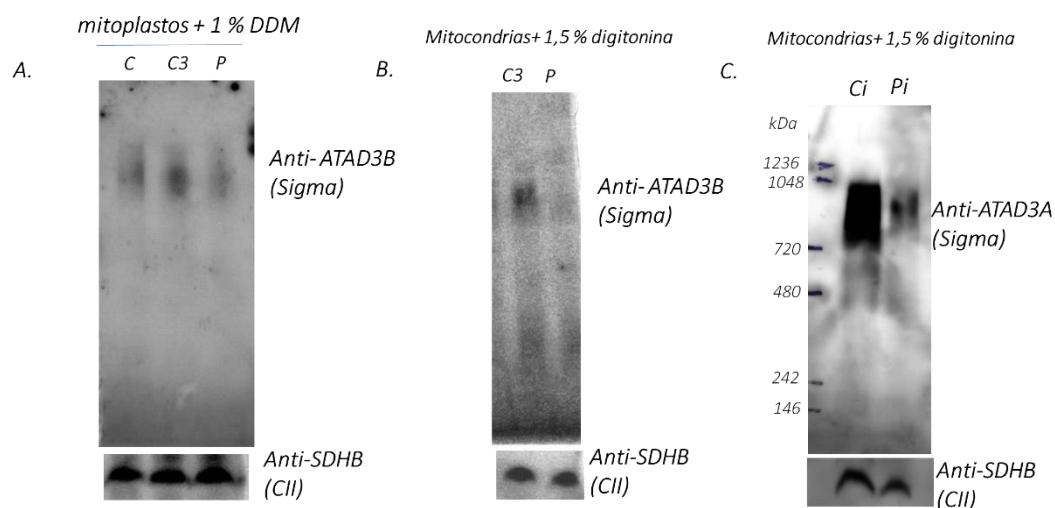


Figura 5.36. Imagen de la inmunodetección de las proteínas ATAD3A (C.) y ATAD3B (A. y B.) en complejos de alto peso molecular en la membrana mitocondrial interna. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitoplastos (A.) o mitocondrias (B. y C.) de fibroblastos C, C3 y P, mediante Blue Native-PAGE. Se cargaron 42,6 µg de la fracción mitocondrial solubilizada por calle.

La expresión de los complejos de alto peso molecular de ATAD3A y ATAD3B se vieron afectados en los fibroblastos del paciente, por ello, se estudió si también estaban afectados los complejos respiratorios en la membrana.

Se cuantificó la cantidad de los complejos respiratorios en los tres ensayos de Blue Native-PAGE respecto el complejo II (SDHB), considerándolos triplicados biológicos. No hubo diferencias entre fibroblastos control y paciente (Figura 5.37).

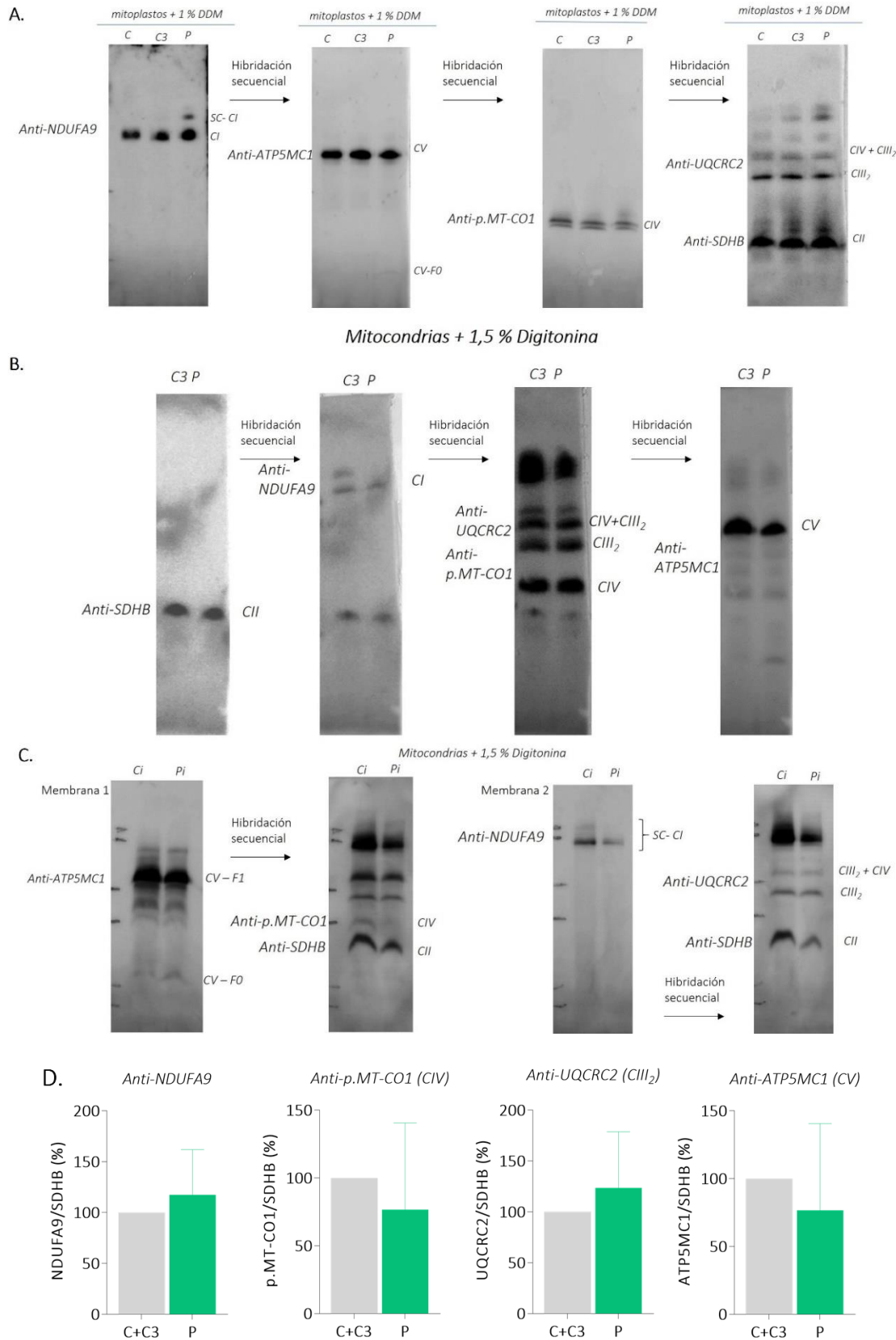


Figura 5.37. Cuantificación de la cantidad de los complejos respiratorios ensamblados en mitoplastos o mitocondrias. A-C. Imagen de las inmunodetecciones. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitoplastos (A.) o mitocondrias (B. y C.) de fibroblastos C, C3 y P, mediante Blue Native-PAGE. Se cargaron 42,6 µg de la fracción mitocondrial solubilizada por calle. **D. Representación gráfica de la cuantificación de la Blue Native-PAGE.** Los datos se representan como la media \pm SD (desviación estándar) del % de expresión cuantificada respecto a la expresión de SDHB (CII) en cada membrana (n=3). La significación estadística se evaluó con el test no paramétrico Mann-Whitney, *p < 0,05, comparando con C+C3 (cuantificación de los dos controles).

En el estudio de la función mitocondrial en fibroblastos de paciente, la única alteración que se detectó fue la reducción de la expresión de los complejos de alto peso molecular de ATAD3A y ATAD3B en la membrana.

5.10. Discusión

En este trabajo describimos el caso de un niño diagnosticado con parálisis cerebral, tetraparesia aspástica, retraso severo del lenguaje y trastorno del movimiento, que incluye temblor y mioclonías. Después de estudiar el exoma completo, se consideró que dos variaciones en heterocigosis compuesta en el gen *ATAD3C* pueden ser la causa de la patología. Se trataría del primer caso de patología mitocondrial debida a mutaciones en *ATAD3C*.

ATAD3C es un gen localizado en tándem en el cromosoma 1, en primates, en tándem con sus parálogos *ATAD3A* y *ATAD3B* (Harel et al., 2016). El locus *ATAD3* está altamente conservado en eucariotas superiores, y la alta homología existente entre los tres genes que lo constituyen confiere inestabilidad a la zona y facilita el fenómeno de recombinación homóloga no alélica (NAHR). Se han descrito recientemente deleciones recesivas y duplicaciones dominantes que causan enfermedad mitocondrial perinatal letal. Las deleciones en el locus están caracterizadas por hipoplasia pontocerebelosa y alteraciones durante el embarazo (Desai et al., 2017; Harel et al., 2016; Peeters-Scholte et al., 2017; Yap et al., 2021), y las duplicaciones por cardiomiopatía, hiperlactacidemia persistente, cataratas y encefalopatía (Frazier et al., 2021; Gunning et al., 2020). En un total de 34 casos no relacionados, los pacientes no superaron los 7 meses de vida, salvo una excepción de un paciente que vivió al menos 30 años (Desai et al., 2017). Además de los casos de reagrupamientos se han descrito 16 pacientes no relacionados con mutaciones puntuales dominantes y recesivas, todas ellas afectando al gen *ATAD3A*. La mayoría de estos pacientes presentaban hipotonía, neuropatía periférica y ataxia, e incluso algunos también tenían patología oftalmológica. Cuatro pacientes fallecieron poco después de nacer (Peeters-Scholte et al., 2017; Peralta et al., 2019; Yap et al., 2021), los restantes presentaron un fenotipo menos severo y algunos incluso alcanzaron la edad adulta (Cooper et al., 2017; Harel et al., 2016; Yap et al., 2021). No se han descrito mutaciones puntuales en los genes *ATAD3B* o *ATAD3C*. El estudio de las variaciones genéticas en ambos genes en más de 140.000 individuos ha llevado a incluir *ATAD3B* y *ATAD3C* en un grupo de genes cuya pérdida de expresión podría ser tolerable en humanos (Karczewski et al., 2020). Sin embargo, que se pueda tolerar la ausencia del gen no excluye que cuando el gen contiene mutaciones estas tengan efecto fenotípico. En nuestro paciente, una de las mutaciones en *ATAD3C* que se ha descrito previamente en *gnomAD* (c.152+1G>A) alteraría el proceso de *splicing* eliminando la expresión del gen. La segunda mutación (c.692T>C) ocurre dentro del dominio AAA⁺ ATPasa junto al dominio Walker B y los predictores dan alta probabilidad de que tenga efecto funcional. Una mutación en homocigosis en la posición equivalente en *ATAD3A* (p.Leu406Arg) se ha descrito como causante de patología severa en cuatro hermanos de padres consanguíneos (Peralta et al., 2019). Los pacientes que fallecieron a los pocos días de vida compartían con nuestro paciente síntomas como hipotonía

axial y temblor en las extremidades. En fibroblastos derivados de uno de los hermanos se observó disminución de los niveles de proteína ATAD3A y de la cantidad de complejo de alto peso molecular en el que se encuentra ATAD3A en la membrana mitocondrial. No se alteró la actividad o la estructura de los complejos respiratorios, indicando que *ATAD3A* no está directamente implicada en la función de los complejos OXPHOS. Sin embargo, se observaron malformaciones de las crestas mitocondriales, relacionando *ATAD3A* con el mantenimiento de la ultraestructura mitocondrial, como ya se había descrito previamente (Gerhold et al., 2015; Holt et al., 2007). En fibroblastos de nuestro paciente no está alterada la morfología mitocondrial, la respiración celular, el número de copias de mtDNA o la cantidad de complejos respiratorios ensamblados. Sin embargo, parece que el complejo o complejos de los que forma parte ATAD3A (800-900 kDa) y ATAD3B (aproximadamente 900 kDa) en la membrana mitocondrial pueden estar reducidos. La inmunodetección de dichos complejos tras Blue-Native puede dar resultados variables dependiendo del anticuerpo utilizado, por lo que para confirmarlo será necesario separar esos complejos en segunda dimensión.

El gen *ATAD3C* carece de cuatro exones si se compara con *ATAD3A*, por ello se ha considerado que podría ser un pseudogén sin importancia en la patología producida por alteraciones en el locus *ATAD3* en humanos (Harel et al., 2016, Yap et al., 2021). Se considera pseudogén a una copia defectuosa de otro gen que acumula mutaciones que evitan que den lugar a una proteína funcional (Cheetham et al., 2020). En los últimos años se han descrito muchos ejemplos de pseudogenes con función reguladora a través de diversos mecanismos. Pueden ser una fuente de moléculas de RNA reguladoras; pueden generar una proteína que ha perdido la función de la proteína a partir de la cual se generó pero que regula su función; o pueden tener actividad en la regulación del genoma mediada por la secuencia de DNA (Cheetham et al., 2020).

Además de estar truncado respecto a *ATAD3A*, la expresión del gen *ATAD3C* no es robusta, es menor que la expresión de *ATAD3A* y *ATAD3B* en todos los tejidos y líneas celulares estudiados y en muchos casos cercana al límite de detección de la técnica utilizada para medirla. Sin embargo, a pesar de la baja expresión, estudios de RNA-Seq han encontrado transcrito de *ATAD3C* en partes del cerebro como cerebelo, que es el órgano afectado en nuestro paciente con ataxia (Kuo, 2019), en hipotálamo y en hipocampo (Papatheodorou et al., 2020). Se expresa además en varias zonas del cerebro en desarrollo (Lindsay et al., 2016), por lo que podría ser importante en el desarrollo embrionario, como ocurre con el único gen *ATAD3* de *C. elegans*, *Drosophila* y ratón (Hoffmann et al., 2009). Mediante medidas por qPCR confirmamos que el gen *ATAD3C* tiene mayor expresión en la línea celular RPMI-8226 (derivada de sangre periférica de un paciente con mieloma múltiple), que en otras líneas en cultivo, indicando que su expresión puede aumentar en algunas situaciones patológicas.

A nivel de proteína, Wang y colaboradores, utilizando proteómica cuantitativa, detectaron la proteína ATAD3C en numerosos tejidos, aunque en baja cantidad, siendo el tejido pulmonar y la amígdala los que mayor expresión presentaron (D. Wang et al., 2019). En este trabajo, hemos detectado péptidos únicos de ATAD3C mediante LC-MS/MS en la línea celular HEK293T, tal y como describieron previamente (Garin-Muga et al., 2016). Por lo tanto, el gen *ATAD3C*, a pesar de su baja expresión y de estar truncado respecto a *ATAD3A*, da lugar a una proteína.

La proteína ATAD3C podría tener una función biológica independiente o podría ser una proteína reguladora de alguna de las otras proteínas del locus ATAD3. Presenta una homología de secuencia del 77,13 % con la proteína ATAD3A y del 78,7 % con ATAD3B. Tal como en sus parálogos, el análisis de su estructura primaria indica que presenta un dominio de hélice superenrollada que podría ser importante para las interacciones proteína-proteína en el proceso de oligomerización (Gilquin, Cannon, et al., 2010), y un dominio transmembrana. Su dominio AAA⁺ ATPasa en el extremo C-terminal según predicciones de *AlphaFold* (Jumper et al., 2021) tiene estructura secundaria y terciaria común con otros dominios AAA⁺ ATPasas (Miller & Enemark, 2016). Igual que sus parálogos, contiene los motivos Walker A y Walker B conservados, y un dominio SRH (Ogura et al., 2004), que permite clasificar las proteínas ATAD3 como AAA ATPasas. Únicamente observamos que carece del dedo de arginina (arginina 1) respecto a ATAD3A y ATAD3B.

Nuestros estudios de localización subcelular indican que ATAD3C es una proteína mitocondrial que tiene el extremo carboxilo terminal protegido por la membrana mitocondrial interna y el extremo amino en el espacio intermembrana. La misma topología se ha descrito para sus parálogos ATAD3A y ATAD3B (Baudier, 2018; Gilquin, Taillebourg, et al., 2010).

Las proteínas AAA⁺ ATPasas se caracterizan por oligomerizar para dar lugar a la forma biológicamente activa, que normalmente es un hexámero con un poro central formado por residuos de las seis subunidades (Erzberger & Berger, 2006; T Ogura & Wilkinson, 2001). Estas proteínas son capaces de ensamblar o desensamblar sustratos poliméricos trasladando sus subunidades a través del poro central del hexámero acoplando la hidrólisis de ATP a la translocación del sustrato a través del poro (Monroe & Hill, 2016). La unión de ATP, que interacciona con interdominios formados por dos monómeros adyacentes del hexámero, es necesaria para que pueda unirse la molécula de sustrato (Hanson & Whiteheart, 2005).

Los estudios de la oligomerización de AAA⁺ ATPasas utilizando diversas técnicas de análisis de proteínas han detectado la presencia de dímeros y tetrámeros en proceso de formación de los hexámeros, en presencia de niveles elevados de ATP y magnesio (Lee et al., 2004; Bieniossek et al., 2006; Kress et al., 2007; Serban et al., 2018). Los dímeros se asocian con tetrámeros de una misma

ATPasa generando el hexámero en forma de anillo cerrado. Tras la hidrólisis del ATP y liberación del sustrato, el anillo puede disociarse de nuevo en un dímero y un tetrámero (Serban et al., 2018).

Aunque se ha considerado que la proteína ATAD3A se asocia en hexámeros (Baudier, 2018) y puede formar hetero-oligómeros con ATAD3B (Merle et al., 2012), se han llevado a cabo muy pocos estudios moleculares. En este trabajo estudiamos la formación de oligómeros de las tres proteínas ATAD3 mediante estimación del peso molecular aparente tras la separación mediante SDS-PAGE y mediante 1D-Blue Native-PAGE seguida de 2D-SDS-PAGE. Las proteínas ATAD3A y ATAD3C sobreexpresadas en fibroblastos, mostraron un comportamiento similar. Se detectaron formando especies compatibles con homo-dímeros, homo-tetrámeros y homo-hexámeros en la membrana mitocondrial. Para ambas proteínas se detectó además un complejo de alto peso molecular, en los que los hexámeros estarían unidos a otras proteínas, en el caso de ATAD3A, entre 800 y 900 kDa (Frazier et al., 2021; Gilquin, Taillebourg, et al., 2010; Peralta et al., 2019). En los fibroblastos control, también detectamos en la membrana mitocondrial la proteína ATAD3A a bajo peso molecular (en 2D-SDS-PAGE), compatible con la existencia de un reservorio de homo-dímeros, confirmando que también la proteína endógena forma complejos a partir de dímeros.

Para ATAD3B no logramos una alta sobreexpresión en fibroblastos, a pesar de repetir la transfección aumentando el número de partículas virales. Mediante Western Blot detectamos tanto monómero como dímeros, pero en análisis de Blue Native no detectamos la presencia de oligómeros en la membrana mitocondrial. A ATAD3B se le ha atribuido la función de receptor de mitofagia que participa en la eliminación de mitocondrias disfuncionales (Shu et al., 2021). Esto podría ser la causa de la reducción del consumo de oxígeno que hemos encontrado en los fibroblastos que sobreexpresan ATAD3B y la dificultad de aumentar la sobreexpresión de la proteína en la línea celular. La isoforma 1, con la que hemos trabajado, se ha considerado la principal porque da una proteína (72,573 kDa) compatible con el tamaño que detecta el anticuerpo específico para ATAD3B. Sin embargo, algunos autores consideran que esa banda puede corresponder a proteína ATAD3A fosforilada (H. Y. Fang et al., 2010; Li et al., 2014). Sería necesario llevar a cabo el estudio de sobreexpresión y formación de oligómeros con la isoforma 3 de ATAD3B, que clonamos con facilidad a partir de células HEK293T, para determinar su comportamiento en los estudios moleculares.

En estudios previos se ha descrito que la sobreexpresión de ATAD3A puede causar fragmentación mitocondrial (Cooper et al., 2017), y la expresión del gen ortólogo en *Drosophila (bor)* produjo elongación de las mitocondrias sin afectar la viabilidad, indicando que se necesita una cantidad correcta de ATAD3A funcional para mantener la dinámica mitocondrial en equilibrio (Harel et al., 2016). Sin embargo, nosotros no observamos fragmentación mitocondrial tras la

sobreexpresión de *ATAD3A* en fibroblastos. Tampoco detectamos disminución del consumo de oxígeno.

Hemos detectado que la proteína *ATAD3C* interacciona con *ATAD3A* en experimentos de inmunoprecipitación, y que reduce el tamaño del complejo de *ATAD3A* (de 800-900 kDa hasta aproximadamente 700 kDa). La separación en segunda dimensión de este complejo de menor peso molecular confirmó que contenía subunidades de *ATAD3C*, ya sea por introducción de homodímeros de *ATAD3C*, o de heterodímeros de *ATAD3A* y *ATAD3C*. Estos resultados indican que *ATAD3C* puede ser una proteína reguladora de *ATAD3A*. La sobreexpresión de *ATAD3C* llevó además a la acumulación de complejo III dimérico en la membrana mitocondrial, que parece causada por la reducción del ensamblaje de $CIII_2$ en supercomplejos. Esta alteración puede explicar por qué la sobreexpresión de *ATAD3C* fue más tóxica para los fibroblastos, afectando al consumo de oxígeno, que la sobreexpresión de *ATAD3A*. Podríamos especular que la acumulación de $CIII_2$ se produce porque *ATAD3A* no lleva a cabo correctamente su función de mantenimiento de la estructura de la membrana mitocondrial en presencia de *ATAD3C*.

Nuestros estudios demuestran que la proteína *ATAD3C* puede regular la función de *ATAD3A* modificando el complejo que esta forma en la membrana mitocondrial y proporcionar un posible mecanismo por el que alteraciones en *ATAD3C* pueden llevar a patología en pacientes. Aunque parece confirmado que *ATAD3A* es el gen más importante del locus *ATAD3*, para considerar *ATAD3C* un pseudogén con función reguladora, sería necesario confirmar que no tiene función biológica de la proteína de la que derivó, *ATAD3A*. Sin embargo, a pesar de que se ha asociado su función a diversos procesos en la membrana mitocondrial, queda por elucidar cual es el sustrato translocado a través del poro de la AAA^+ ATPasa *ATAD3A*.

En resumen, en este trabajo se describe el primer caso de mutaciones en *ATAD3C* en un paciente. El paciente presenta un fenotipo que puede ser compatible con alteraciones descritas en la literatura en el locus *ATAD3*, sin embargo, pone de manifiesto la dificultad de asociar el fenotipo con las mutaciones, cuando los conocimientos del gen son escasos y no hay casos previos descritos. La confirmación de que el gen *ATAD3C* genera una proteína que puede interactuar con *ATAD3A* regulando la función de *ATAD3A* proporciona información molecular de cómo *ATAD3C* puede participar en la patología del paciente. Sin embargo, nuestros resultados de interacción se han obtenido al sobreexpresar la proteína *ATAD3C*. Se estudiará la oligomerización de *ATAD3A* en fibroblastos del paciente y en células reprogramadas a partir de fibroblastos del paciente (Cooper et al., 2017) antes de concluir que las mutaciones en *ATAD3C* suponen la causa etiológica del cuadro clínico del paciente.

5.11. Conclusiones

Las conclusiones que se han extraído de la realización de este estudio son:

1. La expresión del gen *ATAD3C* es menor que la expresión de *ATAD3A* o *ATAD3B* en líneas celulares y tejidos.
2. El gen *ATAD3C* da lugar a una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna con su extremo carboxilo protegido en la membrana mitocondrial interna y su extremo amino terminal expuesto en el espacio intermembrana.
3. La sobreexpresión de las proteínas *ATAD3A*, *ATAD3B* o *ATAD3C* en fibroblastos ha permitido identificar homo-dímeros unidos por puentes disulfuro en lisados celulares.
4. La sobreexpresión de las proteínas *ATAD3A*, *ATAD3B* o *ATAD3C* en fibroblastos ha permitido identificar en la membrana mitocondrial especies compatibles con homo-dímeros, tetrameros y hexámeros para *ATAD3A* y *ATAD3C* pero no para *ATAD3B*.
5. La separación en geles nativos seguida de segunda dimensión desnaturizante ha permitido detectar que en la membrana mitocondrial *ATAD3A* se acumula en forma de dímeros, además de encontrarse en un complejo de alto peso molecular.
6. La proteína *ATAD3C* interacciona con la proteína *ATAD3A* en la membrana mitocondrial interna alterando el complejo de alto peso molecular del que esta forma parte.
7. La presencia de *ATAD3C* lleva a la acumulación del dímero del complejo III₂ en la membrana mitocondrial.
8. Las mutaciones p.Leu231Pro y c.152+1G>A en el gen *ATAD3C* en los fibroblastos del paciente no alteran la formación de crestas en la membrana, la respiración celular, el número de copias de mtDNA o la cantidad de los complejos respiratorios ensamblados.
9. El gen *ATAD3C* podría ser el causante del fenotipo del paciente, pero son necesarios más estudios para confirmarlo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. Edición del genoma por CRISPR-Cas9

Hemos puesto a punto es la edición del genoma mediante el sistema Alt-R CRISPR-Cas9 (IDT). Se utilizó para silenciar los genes del locus *ATAD3* en la línea celular HEK293T. Debido al alto porcentaje de homología entre las secuencias de los tres genes, no se consiguió el diseño de una guía específica para *ATAD3C*. Por ello, se diseñaron dos guías de RNA comunes para los 3 genes. Se comprobaron las secuencias de los genes de numerosos clones utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar cada gen. Conseguimos dos clones, en el primero se detectaron pequeñas deleciones en las secuencias de *ATAD3B* y *ATAD3C*, y en el otro únicamente en *ATAD3B*. Los niveles de proteína de *ATAD3B* disminuyeron en ambos clones, sin embargo, debido a la falta de anticuerpo frente la proteína *ATAD3C* no se pudo confirmar su expresión. Puesto que la línea celular es aneuploide (Lin et al., 2014), aunque detectamos dos tipos de deleciones en un gen, puede que todavía se exprese alguna copia. Con estas guías se intentará editar el genoma de fibroblastos o incluso de iPSCs y, estudiar a nivel funcional el silenciamiento de los genes del locus *ATAD3*.

La técnica de edición del genoma mediante el sistema Alt-R CRISPR-Cas9 puede servirnos en el futuro como alternativa a la complementación genética. Podríamos eliminar la mutación o las mutaciones consideradas patológicas en genes nucleares que afectan a la función mitocondrial, en fibroblastos derivados de un pacientes, para confirmar su patogenicidad.

6.2. Estudio de la función mitocondrial de iPSCs derivadas de fibroblastos

Existen algunas variantes en el genoma humano que no pueden estudiarse en organismos modelo. El gen *ATAD3C* y sus parálogos solamente están presentes en el genoma de primates, por ello, una vez que se tenga información molecular sobre la función del gen, la enfermedad no puede estudiarse en modelos habituales de ratón o *Drosophila*. Sin embargo, la disponibilidad de fibroblastos del paciente permite generar células madre pluripotentes inducidas, iPSCs.

Los modelos en iPSCs están siendo una herramienta muy valiosa para el estudio de algunas enfermedades humanas, puesto que permiten el estudio de la mutación en diversos linajes celulares como tejido nervioso, muscular, etc. Las iPSCs son, por otro lado, otra posible fuente de terapia celular. En el futuro, se estudiará la función mitocondrial de las iPSCs derivadas de los fibroblastos del paciente con mutaciones en *ATAD3C* (generadas en el Banco de Células Madre de Barcelona, del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)). Se realizarán diferenciaciones a neurona y a cardiomiocito, y se estudiarán en ellas la función mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivos celulares

7.1.1. Líneas celulares

Los fibroblastos primarios y las líneas celulares establecidas y utilizados durante este trabajo se recogen en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Fibroblastos primarios y líneas celulares utilizados durante el desarrollo de la tesis.

Células	Tipo celular	Procedencia
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano	
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma procedente de médula ósea de una niña de 4 años	“SH-SY5Y ATCC® CRL-2266TM Homo sapiens bone marrow neuroblast.” https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo_country=es .
RPMI 8826	Células humanas de mieloma múltiple procedente de sangre periférica de un paciente de 61 años	RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™) https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-155.aspx?geo_country=es#
C (C _i) *	Fibroblastos primarios derivados de un individuo control de 1 mes	
C3 (C _{3i}) *	Fibroblastos primarios derivados de un individuo control de 3 años	Cedidos por el Hospital San Joan de Deu de Barcelona
P3	Fibroblastos primarios derivados de un paciente de 6 años con las mutaciones c.554_558delTTCTT; (p.Tyr187AsnfsTer65) y c.371T>C (p.Ile124Thr) en <i>NDUFA6</i>	Departamento de Neurología pediátrica del Hospital Vall d’Hebrón e Instituto de Investigación (VHIR) de Barcelona
P	Fibroblastos primarios derivados de una paciente de 4 años con las mutaciones c.2591A>G (p.Asn864Ser) y c.3649G>C (p.Ala1217Pro) en <i>POLG</i>	Instituto de Investigación Sant Joan de Déu (Barcelona)
P (P _i) *	Fibroblastos primarios derivados de un paciente de 3 años (en el momento de la extracción) con mutaciones c.692T>C (p.Leu231Pro) y c.152+1G>A en <i>ATAD3C</i>	Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid

*Cuando la línea se immortalizó se utilizó el plásmido lentiviral pLOX-Ttag-iresTK (Tronolab) (Anexo II, Figura 10.3), y la línea se nombró añadiendo el superíndice i.

7.1.2. Materiales y medios de cultivo celulares

Los fibroblastos primarios y las líneas celulares HEK293T y SHSY-5Y se crecieron en el medio de cultivo DMEM de Gibco (ThermoFisher Scientific) con 4,5 g/l de D-glucosa, L-glutamina y 1 mM de Piruvato de sodio, suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB, Invitrogen). Este medio se denominará a partir de ahora como DMEM completo.

Cuando fue necesario, como en la selección de clones modificados mediante CRISPR-Cas9, se adicionó uridina a una concentración final de 50 µg/ml.

Cuando se indica medio con baja glucosa, los fibroblastos se crecieron durante 3 días en el medio DMEM de Gibco con baja glucosa (ThermoFisher Scientific), 1 g/l D-glucosa, L-glutamina y 1 mM de Piruvato de sodio.

Los experimentos en que se indica medio con galactosa, las células se crecieron con el medio DMEM sin glucosa de Gibco (ThermoFisher Scientific) suplementado con 0,9 g/l de galactosa, 1 mM de piruvato de sodio y 10 % de SFB.

La línea celular RPMI 8826 se cultivó en el medio de cultivo RPMI, de Gibco (Invitrogen).

Las placas de cultivo celular de 9,2, 22,1, 60,1 y 147,8 cm², así como los frascos de cultivo de 25 y 75 cm², y las placas de 6, 12, 24 y 96 pocillos estériles empleadas para el cultivo de las células fueron adquiridas de la casa comercial TPP. Los tubos de 15 ml y 50 ml utilizados fueron de la casa comercial Corning®.

7.1.3. Siembra y cultivo celular

El trabajo con cultivos celulares tuvo lugar en condiciones de esterilidad, utilizando para ello una campana de flujo laminar vertical modelo *Biological Safety Cabinet Class II* de Nuaire y tomando las medidas necesarias para evitar contaminaciones. Durante el desarrollo de esta tesis se ha cultivado en ausencia de antibióticos, excepto en aquellos experimentos en los que se quiso evaluar el efecto de los mismos y durante la selección de las líneas celulares transducidas con un vector lentiviral resistente a un antibiótico. El material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó a 120 °C en un autoclave (Autoester Mod 4376, Selecta) durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y los reactivos se filtraron a través de filtros de jeringa Corning® de 0,2 µm de tamaño de poro (Sigma-Aldrich). Todo el material se limpió con etanol al 70 % antes de introducirlo en la campana. Los conductos empleados para succionar los medios de cultivo mediante bomba de vacío se lavaron con lejía al 20 % tras cada uso y al finalizar la sesión de trabajo. Todo el material en contacto directo con cultivos celulares fue desechado en los contenedores adecuados para ser procesado por empresas especializadas.

7.1.4. Mantenimiento de los cultivos celulares

Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células se precalentaron a 37 °C en un baño de agua.

Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador de Nuaire a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, renovando el medio periódicamente cada 2-3 días hasta llegar a una confluencia del 80 %. En este punto, se retiró el medio de cultivo por succión, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*, ThermoFisher Scientific) para eliminar las proteínas del suero que inhiben la tripsina, y posteriormente se incubaron con unos 0,012 ml/cm² de una solución conteniendo 0,05 % de tripsina (Sigma) y 0,02 % de EDTA (Panreac) en PBS (esterilizada mediante filtros Corning® de 0,2 µm de tamaño de poro, Sigma-Aldrich) durante 2-3 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se comprobó con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado, se resuspendieron en un volumen de medio 3-5 veces mayor que el volumen de la tripsina y se centrifugaron a 2000 x g en la centrífuga Hermle Z300 durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular obtenido fue procesado según el uso que se le fuera a dar.

7.1.5. Congelación y descongelación celular

Para la congelación de células se utilizaron criotubos de 2 ml de capacidad resistentes a N₂ líquido de la marca TPP. Las células para congelar se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80 % de confluencia en placas de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. El pellet celular obtenido, se resuspendió en 0,750 ml de medio de cultivo suplementado con un 20 % de SFB y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), compuesto orgánico que actúa como crioprotector.

Los criotubos se almacenaron en una caja de congelación con isopropanol a -80 °C durante al menos un día, para favorecer la congelación paulatina y uniforme (descenso de aproximadamente 1 °C/min). Tras 24 h, se pasaron a una caja almacenada en un congelador a -80 °C. Los criotubos se mantuvieron en un congelador a -80 °C durante un mínimo de 24 horas antes de trasladarlos al contenedor de N₂ (-196 °C), donde pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo sin sufrir deterioro.

La descongelación de los criotubos almacenados se realizó diluyendo la suspensión y eliminando el agente preservante (DMSO) con la mayor rapidez posible. Para ello, se tomó el vial indicado del tanque de N₂ líquido o del congelador a -80 °C, se resuspendió el contenido en 4 ml de medio de cultivo en un tubo de 15 ml, que se centrifugó a 2000 x g (en la centrífuga Hermle Z300) durante 5 minutos para eliminar el DMSO, que resulta tóxico a temperatura ambiente. El pellet se disgregó y las células se sembraron en una placa de cultivo adecuada. Una vez que las células se

adhirieron a la placa, se cambió el medio de cultivo para eliminar posibles trazas de DMSO que perjudicarían el crecimiento celular.

7.1.6. Recuento celular

El recuento celular se realizó con el aparato de conteo automático de células *Countess II FL Automated Cell Counter* (ThermoFisher Scientific). Este aparato está diseñado para el conteo de células (rango de concentraciones entre 1×10^4 y 1×10^7 células/ml) y la evaluación de su viabilidad utilizando la técnica estándar del azul tripán, siendo necesaria la misma cantidad de muestra que con un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El azul tripán es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, ya que éstas presentan su membrana plasmática desestructurada. Así, se mezclaron 20 µl de suspensión celular con la misma cantidad de azul tripán y se pipetearon 10 µl en el interior de la cámara desechable (*Countess™ cell counting chamber slides* de Invitrogen Thermo Fisher Scientific) por duplicado, de manera que las células fueron contadas de forma automática por el aparato en unos 30 segundos.

7.1.7. Tratamiento con fármacos

En los experimentos en que se utilizó ceftriaxona (*Ceftriaxone disodium salt hemi(heptahydrate)* (CFT) de Sigma), antibiótico de la clase de las cefalosporinas de tercera generación, se prepararon soluciones a 0,1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml, 1000 µg/ml y 1500 µg/ml de ceftriaxona en agua destilada estéril (Gibco, Fisher Scientific).

La lidocaína (*lidocaine hydrochloride*, de Sigma-Aldrich GmbH) es un anestésico local que suele suministrarse junto con ceftriaxona, para reducir la intensidad y frecuencia de dolor por la inyección (Mohamed & Kamal, 2018). En este trabajo, se prepararon soluciones a 0,05 mM, 0,2 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM de lidocaína disuelta en agua.

El AZT o azidotimidina (*3'-Azido-3'-deoxythymidine* de Ghentham Life Sciences), es un análogo del sustrato natural (nucleósido de timidina) de la transcriptasa inversa, y actúa inhibiéndola. Se preparó una solución de 10 µM de AZT disuelto en carbometilcelulosa.

De forma paralela a los tratamientos, se cultivaron controles de células tratadas únicamente con el vehículo en el que fue disuelta cada droga, con el fin de descartar efectos inespecíficos de los mismos.

7.1.8. Análisis y tratamiento de contaminación por *Mycoplasma sp.*

El control de contaminación por micoplasma se llevó a cabo periódicamente a partir de una alícuota del medio de cultivo tras 48 horas de contacto con las células. Para ello, se empleó un kit

comercial que se basa en la amplificación del DNA de los micoplasmas por PCR (*Mycoplasma Gel Detection Kit*, Biotools).

En caso de ser necesario, se procedió a la eliminación de los mismos empleando una combinación comercial de antibióticos (*BM Cyclin*, Roche), *BM cyclin 1* (derivado de pleuromitilina), 10 µg/ml, 3 días; y *BM cyclin 2* (derivado de tetraciclina), 5 µg/ml, 4 días. El ciclo se repitió tres veces, tras los cuales se volvió a comprobar la presencia de contaminación.

7.1.9. Estudios de proliferación celular: curvas de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento celular en distintos medios y en presencia de drogas se realizaron curvas de crecimiento en las que se evaluó el tiempo de duplicación celular.

Se sembraron fibroblastos primarios a una densidad de 25000 células en placas de cultivo de 6 pocillos para los primeros puntos de las curvas y placas de Petri de 60 mm o 100 mm para los últimos días del estudio. Una vez se adhirieron las células (entre 6 y 24 horas), se tripsinizó un pocillo de cada una de las condiciones en estudio y se procedió al recuento celular para establecer el tiempo cero de la curva de crecimiento.

Los contajes se realizaron a tiempo 0, 2, 6, 8, 10 días, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (*Apartado 7.1.6*) cada uno de ellos por cuadruplicado.

Para calcular el tiempo de duplicación celular, se representó gráficamente el número de células frente al tiempo transcurrido y se ajustó a una curva exponencial del tipo: $N = a \cdot e^{bt}$, donde N es el número de células y t el tiempo expresado en horas. A partir de esta ecuación, el tiempo de duplicación (DT) se obtuvo utilizando la fórmula: $DT = \ln 2/b$.

7.1.10. Inmunocitoquímica

Para determinar la localización subcelular de las proteínas de interés mediante inmunocitoquímica en las diferentes líneas celulares, las células se tripsinizaron y sembraron en pocillos de placa de 6 pocillos sobre cubreobjetos (*Microscope cover glasses 22 x 22 mm*, de VWR) debidamente esterilizados con etanol y secados. Se permitió la adherencia de las células al cubreobjetos, al menos durante 12 horas. Tras llegar a una confluencia de entre el 30 y el 50 %, se retiró el medio de las células y se efectuó un lavado con PBS.

Para teñir las mitocondrias, las células se incubaron con *MitoTracker® Red CMXRos* (ThermoFisher Scientific), colorante mitocondrial fluorescente cuya acumulación depende del potencial de membrana mitocondrial, en medio DMEM sin aditivos a una concentración final de 150 nM durante media hora a 37 °C. A continuación, las células se incubaron con medio completo

durante 30 minutos a 37 °C. Tras las incubaciones, se lavaron una vez con PBS durante 5 minutos en agitación.

Las células se fijaron en 2 % de paraformaldehído (Panreac) durante 15 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se lavaron seguidamente tres veces con PBS durante 5 minutos en agitación suave. Para permeabilizar las membranas celulares se incubaron en metanol frío al 100 % durante 15 minutos en agitación suave. Con objeto de rehidratar las preparaciones, se efectuaron tres lavados con PBS en las mismas condiciones que los anteriores.

Tras fijar y permeabilizar las células, se incubaron con el anticuerpo primario, diluido en una solución de BSA al 2 % en PBS a la concentración deseada, durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron las preparaciones tres veces con PBS en las mismas condiciones. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario *Alexa Fluor*® (con un fluoróforo que emita a la longitud de onda de interés) a una dilución de 1:500 en PBS al 2 % BSA durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, se volvieron a lavar las preparaciones tres veces con PBS en las mismas condiciones.

Los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos (Microscope) limpios y secos con una pequeña cantidad de solución de montaje *SlowFade*® *Gold Antifade Reagent with DAPI* (Invitrogen). Cuando las células se observaron mediante microscopía confocal se añadieron 25 µl de *DraQ5*™ *Fluorescent Probe Solution* (5 mM) a la solución de montaje. Las células fijadas quedan entre las dos superficies de vidrio y éstas últimas adheridas entre sí mediante solución de montaje. Finalmente, las preparaciones se dejaron secar en un ambiente fresco y protegido de la luz hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia Zeiss o en el microscopio confocal.

En algunas ocasiones, en lugar de utilizar *MitoTracker*® *Red CMXRos* para teñir las mitocondrias, se utilizó el anticuerpo frente SDHA (Thermo Fisher Scientific, Anexo II, Tabla 10.1), proteína que se localiza en la membrana interna mitocondrial, seguido del anticuerpo secundario *anti-mouse Alexa Fluor*® *594 goat* (Molecular Probes) que se visualizó a través del canal rojo (Em = 617 nm, Ex = 590 nm). La visualización de los núcleos con DAPI o DraQ5 se llevó a cabo a través del canal azul (Em= 446/33 nm, Ex= 390/40 nm). Y el anticuerpo de interés a través del canal verde, con el anticuerpo *anti-rat IgG(H+L) Alexa fluor 488* (Em = 519nm, Ex = 495nm).

En todos los casos se llevó a cabo paralelamente un control de anticuerpo secundario (mismo procedimiento, pero sin la incubación con anticuerpo primario) para descartar la existencia de uniones inespecíficas con el mismo.

7.1.11.Fijación de células en cultivo para microscopía electrónica

Para observar células en cultivo mediante microscopía electrónica se sembraron en la cámara de Permanox® de 8 pocillos de 0,8 cm²/pocillo (*Permanox® chamber slide* de Lab-Tek® Sigma Aldrich).

Dependiendo el tipo celular que se quería observar mediante microscopía electrónica, se sembró de 10000 a 35000 células por pocillo. Cuando se obtuvo una confluencia del 80-90 %, las células se fijaron en la cámara de Permanox®. En primer lugar, se eliminó el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS pH 7,4 (Gibco) a temperatura ambiente. La fijación de las células se llevó a cabo con 2,5 % de glutaraldehído (*Glutaraldehyde 25 % solution* de Electron Microscopy Science, EMS) en PB 0,1 M (para preparar PB 0,1 M se diluyó a la mitad PB 0,2 M en agua destilada; 500 ml de PB 0,2 M: 400 ml Na₂HPO₄ 0,2 M 4X dibásico + 100 ml NaH₂PO₄ 0,2M 1X monobásico), que se incubó durante 5 minutos a 37 °C, tiempo tras el cual se sustituyó por 2,5 % de glutaraldehído fresco y se mantuvo durante 1-2 horas a 4 °C. Finalmente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS 0,1 M y se conservaron las preparaciones en PB 0,1 M con 0,05 % de azida de sodio a 4 °C.

La cámara de Permanox®, sin su tapa, se sumergió en la solución de PB 0,1 M con 0,05 % de azida de sodio a temperatura ambiente en una botella de cristal Pyrex® previamente esterilizada.

Las muestras fueron procesadas y visualizadas en el Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI de la Universidad de Zaragoza. Se observaron con un microscopio de transmisión JEOL 1010 a 80 KV, y las imágenes se tomaron con una cámara Gatan Bioscan.

Para detectar diferencias entre varias líneas celulares se cuantificó el tamaño de las mitocondrias y se calculó el número de crestas que contactaban con la membrana mitocondrial externa (*Cristae Junction*, CJ) por mitocondria. Se utilizó el programa Image J (*National Institute of Health*) para delimitar el área de la mitocondrias después de establecer el valor del tamaño del pixel de acuerdo con la barra de escala de las imágenes en tiff. Los resultados se exportaron a Excel para analizar.

7.1.12.Generación de partículas virales y transducción de líneas celulares

Las partículas lentivirales se generaron y la transducción se realizó como se describe (<https://www.addgene.org/tools/protocols/plko/#E>).

Se sembraron células HEK293T en placas de 6 pocillos a una densidad de 0,45 x 10⁶ células. Tras 24 horas, se cambió el medio y añadió la mezcla compuesta por el reactivo *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* de Roche, mezcla de lípidos y otros componentes suministrados en etanol

al 80 %, los plásmidos de la envuelta (pMD2.G de Addgene, Anexo II, Figura 10.2 A.) y empaquetador junto con la polimerasa (psPAX2 de Addgene, Anexo II, Figura 10.2 B.) y el vector lentiviral con el gen de interés (pWPXLd-ires-Neo^R o pWPXLd-ires-Puro^R, Anexo II, Figura 10.4) generado con anterioridad (Apartado 7.3.9). La Tabla 7.2 recoge los reactivos necesarios para esta mezcla para un pocillo de placa de 6 pocillos (33 mm de diámetro).

Tabla 7.2. Reactivos requeridos para la transfección celular.

Placa 6 pocillos (33mm)		
Reactivo	Volumen	Cantidad
<i>X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent</i>	9 µl	
Plásmido lentiviral (Y µg/µl)	X µl (Y µg/µl x X µl = 1,5 µg)	1,5 µg
Plásmidos PMD2G + PsPAX2	X µl	1,5 µg
Medio sin aditivos	Hasta 200 µl	

Entre 8 y 12 horas después de añadir la mezcla de plásmidos, se cambió el medio de la placa de 6 pocillos. Paralelamente se sembraron las células para ser transducidas. El número de células dependió del tipo celular y del tamaño de la superficie donde se transducirán las células. En el caso de células HEK293T en placa de 100 mm se sembraron 3×10^6 células; en el caso de células SH-SY5Y en placa de 100 mm se sembraron $2,6 \times 10^6$ células, y en pocillo de placa de 6 p se sembraron $0,43 \times 10^6$ células. Cuando se trató de fibroblastos primarios, se sembraron $0,4 \times 10^6$ células para una placa de 100 mm.

48 horas después de añadir los plásmidos a las células se recogieron las partículas virales. Para ello, se recogió el sobrenadante del pocillo de placa de 6 pocillos y se centrifugó a $3750 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró con un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y se conservó a 4°C para su inmediata utilización o se alicuotó y congeló a -80°C .

Por otro lado, las células preparadas para ser transducidas se incubaron durante 15 minutos a 37°C con polibreno (Sigma) a una concentración de $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, polímero catiónico usado para incrementar la eficiencia de transducción de las células con retrovirus en cultivo celular. A continuación, se añadió un volumen de 50 µl por placa de 100 del sobrenadante con partículas virales. Como control negativo de la transducción, se sembró una placa de células que también se trató con polibreno.

Tras las 24 horas de la transducción con los virus, se retiró el medio de las células y se añadió medio con el antibiótico (Tabla 7.3). Las células se mantuvieron en selección durante 10 días, cambiando el medio diariamente.

Tabla 7.3. Concentraciones de antibiótico requeridas para la selección celular tras una transducción con un vector lentiviral.

Plásmidos lentivirales	Antibiótico	Concentración stock	Concentración de trabajo
pWPXLd Ires Neo ^R	Geneticina (Gibco)	50 mg/ml	400 µg/ml
pWPXLd Ires Puro ^R	Puomicina (Gibco, Life Technologies)	10000 µg/µl	HEK293T 1,5 µg/ml
			Fibroblastos 0,4 µg/ml

7.1.13. Inmortalización de cultivo primario

A excepción de algunos cultivos derivados de tumores, la mayoría de los cultivos celulares primarios tienen un periodo de vida limitado. Después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia por lo que dejan de dividirse. Por ello, algunos de los cultivos primarios establecidos se sometieron a la transfección con el plásmido lentiviral pLOX-Ttag-iresTK (Tronolab, Anexo II, Figura 10.3), que permite la inserción estable en el genoma de las células del antígeno *Large T* (Tag) del virus SV40 de simios, lo cual conduce a la desprogramación del ciclo celular sin necesidad de la expresión de otras oncoproteínas para la inmortalización del cultivo.

La transfección de las células de interés se realizó mediante infección viral siguiendo el procedimiento descrito en el *Apartado 7.1.12*, con alguna modificación. En este caso, las células transfectadas eficientemente con el vector pLOX-Ttag-iresTK fueron naturalmente seleccionadas, al entrar en senescencia aquellas que no fueron infectadas y que, consecuentemente, no expresaron el antígeno *large T*. Unos 10 días después, se pudo observar un cambio en la tasa de duplicación.

7.2. Cultivos bacterianos

7.2.1. Cultivos bacterianos

El trabajo realizado con cultivos bacterianos fue llevado a cabo en condiciones asépticas, trabajando bajo la atmósfera creada por el mechero Bunsen. Todo el material usado fue esterilizado previamente mediante tratamiento a 120 °C y 1 atm de presión durante 20 minutos en un autoclave (Autoester Mod 4376, Selecta). Una vez terminada la sesión de trabajo, se limpió con etanol al 70 % el área destinada al trabajo con bacterias y los residuos biológicos se desecharon convenientemente.

7.2.2. Medios de cultivo

Las cepas bacterianas usadas en este estudio se cultivaron en medio líquido LB (Luria-Bertani) bajo en sal: para un volumen de un litro, se disolvieron 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en agua destilada. El medio se esterilizó en un autoclave tal y como se ha descrito anteriormente. Una vez terminado el tratamiento de esterilización, la disolución se dejó enfriar hasta 55 °C y se añadió, cuando se requería, antibiótico en la cantidad conveniente, o se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Las placas de LB-agar se prepararon del mismo modo que el medio LB líquido, pero añadiendo 15 g de agar/litro, antes de esterilizar. Del mismo modo, una vez enfriado a 55 °C se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, o 50 µg/ml en el caso de kanamicina. A continuación, se vertieron unos 25 ml en cada placa de Petri de 10 cm, dejándolas solidificar. Finalmente, se almacenaron a 4 °C de forma invertida selladas con Parafilm® (Bemis) y protegidas de la luz, hasta su uso.

7.2.3. Preparación de bacterias competentes

A 10 ml de medio LB se le añadieron bacterias *E. coli* DH5α procedentes de un glicerol y se incubaron a 250 rpm a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se inocularon 2,5 ml del cultivo de bacterias en 250 ml de medio LB sin antibiótico en un Erlenmeyer de al menos medio litro de capacidad e incubaron a 250 rpm a 37 °C. Las bacterias se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una densidad óptica a $\lambda=590$ nm (OD₅₉₀), determinada mediante un espectrofotómetro (UNICAM UV 500, de Thermo Spectronic), de 0,4 (aproximadamente a las dos horas de la inoculación). El cultivo bacteriano se dividió en dos frascos previamente esterilizados y para detener el crecimiento, se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 1600 x g durante 7 minutos a 4 °C en la centrífuga Beckman Coulter™ Avanti™ J-25. Se desechó el sobrenadante y cada pellet se resuspendió en 12,5 ml de solución de cloruro cálcico (CaCl₂) y se incubaron en hielo durante 30 minutos.

Tras la incubación, las bacterias se centrifugaron a 1100 x g durante 10 minutos a 4 °C en la misma centrífuga. Seguidamente, el pellet de bacterias se resuspendió en 4 ml de la solución de cloruro cálcico y se prepararon para su congelación a -80 °C en alícuotas de 50 µl.

7.2.4. Transformación de bacterias DH5α por choque térmico

En la realización de este trabajo se utilizaron tanto bacterias competentes *MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells* (Thermo Fisher Scientific, 18258012), como bacterias competentes preparadas en el laboratorio (*Apartado 7.2.3*).

La transformación se llevó a cabo añadiendo 2 µl de la mezcla de ligación (ver Apartado 7.3.9.3) a 25 µl de bacterias *MAX Efficiency™ DH5α* o a 50 µl de bacterias competentes preparadas en el laboratorio, éstas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se realizó el choque térmico durante 45 segundos a 42 °C sin agitación, e inmediatamente las bacterias se transfirieron al hielo e incubaron durante 3 minutos.

Tras el choque térmico, se añadieron 250 µl de medio LB (sin antibiótico) o medio SOC (medio de caldo superóptimo con represión por catabolito; 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM, de Invitrogen™) a temperatura ambiente a las bacterias, y se incubaron en agitación horizontal (250 rpm) durante 1 h a 37 °C a fin de permitir su recuperación. Pasado este tiempo, la suspensión bacteriana se sembró en una placa de LB con el antibiótico de interés, kanamicina (50 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml) y se incubó toda la noche a 37 °C.

Se seleccionaron las bacterias que contuvieran vectores plasmídicos por la resistencia a kanamicina o ampicilina codificada en el vector y por la interrupción del gen letal *ccdB*. Por lo que, las colonias que crecieron en el medio con el antibiótico tenían el inserto clonado.

7.2.5. PCR de comprobación

Se verificó por PCR que las colonias que habían crecido sobre la placa con kanamicina o ampicilina contenían el gen de interés. Para ello, se *picaron* colonias individuales, se crecieron en 50 µl de medio LB. Se guardaron 20 µl de la suspensión bacteriana a 4 °C, y los 30 µl restantes se incubaron durante 5 min a 95 °C. Las bacterias lisadas se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga Sorvall Legen micro 17 y con el sobrenadante obtenido se preparó la reacción de PCR detallada en la Tabla 7.6 y Tabla 7.7 (*Apartado 7.3.6*) con la DNA Polimerasa *IBIAN*.

El producto amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (*Apartado 7.3.7*). 20 µl de bacterias seleccionadas, previamente conservados a 4 °C, se inocularon en 5 ml de medio LB con kanamicina o ampicilina, y se mantuvieron en agitación orbital (250 rpm) durante toda la noche a 37 °C.

7.3. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos

7.3.1. Aislamiento de DNA total a partir de cultivos celulares

7.3.1.1. Con fenol-cloroformo

Para el aislamiento de DNA a partir de líneas celulares en cultivo se resuspendió el pellet celular obtenido por tripsinización y lavado con PBS en 250 µl de tampón TE pH 7,5 (Tris 10 mM

/EDTA 1mM), y se añadieron 1,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Invitrogen) para degradar proteínas, 5 µl de Ribonucleasa A (10 mg/ml, Sigma) que cataliza la degradación del RNA, y 5 µl de SDS al 25 % (Sigma). La mezcla se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Tras la incubación, se trabajó en la campana de flujo para evitar la inhalación de los reactivos tóxicos. Se llevaron a cabo dos procesos de extracción con 1,5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, de Sigma), se agitó la muestra y centrifugó a 17000 x g durante 5 minutos. Tras cada extracción, se recogió la fase acuosa (superior) en un tubo nuevo. A continuación, se realizó una extracción con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, Panreac), se agitó y centrifugó en las mismas condiciones que en las primeras extracciones. La fase acuosa se recogió en un nuevo tubo y se realizó la precipitación del DNA mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y 1,5 volúmenes de isopropanol frío (-20 °C). Se mezclaron por inversión, momento en el cual se pudo observar el ovillo de DNA en suspensión, y se centrifugó a 17000 x g durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante. Finalmente se añadieron dos volúmenes de etanol frío (-20 °C) al 75 % y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Tras dejar secar el pellet, se resuspendió en 75-10 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8 o TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM). Se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

7.3.1.2. Con QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 de Epicentre®

Un método rápido para extraer DNA genómico para realizar PCR es la utilización de la solución 1.0 de *QuickExtract™ DNA Extraction*, de Epicentre® siguiendo el protocolo *QuickExtract DNA Extraction Protocol*. En esta tesis, se realizó este tipo de extracción para aislar el DNA durante la selección de clones modificados mediante CRISPR-Cas9.

Para cada 10⁴ células se añadieron 500 µl de la solución 1.0 de *QuickExtract* que se mezclaron mediante vórtex durante 15 segundos, e incubaron a 65 °C durante 6 minutos. A continuación, la mezcla se vorteoó durante 15 segundos e incubó a 98 °C durante 2 minutos. Tras la incubación, el DNA está preparado para utilizarse en la PCR o para congelar a -20 °C.

7.3.2. Aislamiento de RNA total a partir de cultivos celulares

Para extraer RNA se utilizó el Reactivo TRIzol® de Invitrogen. La extracción se realizó bajo la campana de flujo para evitar inhalar los reactivos tóxicos que se utilizaron. Además, para evitar la introducción accidental de RNAsas en la preparación y la consecuente degradación del RNA, se trabajó con material de trabajo estéril.

Se resuspendió el pellet celular obtenido por tripsinización y lavado con PBS en 500 µl de TRIzol®, el cual mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve los componentes

celulares. Se pipeteó hasta asegurarse de resuspender totalmente el pellet. Seguidamente el homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos formados entre proteínas y ácidos nucleicos.

A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo por mililitro de TRIzol® utilizado para realizar la separación de fases. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se observó la aparición de distintas fases: una fase orgánica inferior de color rosa compuesta de fenol-cloroformo, una interfase blanca y una fase acuosa incolora en la parte superior. El RNA se encontraba exclusivamente en la fase acuosa. La fase acuosa se transfirió a otro tubo para continuar con la precipitación del RNA. Se añadieron 500 µl de isopropanol (Panreac) por cada mililitro de TRIzol® utilizado, incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado para evitar arrastrar el RNA precipitado depositado en el fondo del tubo. Para lavar el precipitado, se utilizó 1 ml de etanol al 75 % en agua libre de RNAsas por cada mililitro de TRIzol® añadido. Se agitó con un vórtex y centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado de RNA se redisolvió en 60 - 100 µl de agua libre de RNAsas (Gibco) y se incubó en agitación durante 10 minutos a 60 °C en un termobloque (Eppendorf Thermomixer® comfort) para garantizar su correcta disolución. Las muestras se cuantificaron empleando el espectrofotómetro Nanovue™ (*Apartado 7.3.3*) y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

7.3.3. Cuantificación de material genético

Para determinar la concentración y la pureza del DNA o RNA en distintas muestras, se empleó el espectrofotómetro NanoVue™ de GE Healthcare que mide la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda. La medida se realizó depositando 2 µl de la muestra en la placa del aparato y se obtuvieron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm y la concentración en ng/µl. La pureza de la muestra viene dada por la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm (A260/A280), en el caso del DNA una pureza aceptable oscilaría entre 1,7-1,9 y en el del RNA próxima a 2.

7.3.4. Retrotranscripción de RNA total

El cDNA monocatenario se obtuvo mediante el kit *Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit* de Roche utilizando como molde el RNA total extraído a partir de células en cultivo (*Apartado 7.3.2*).

En primer lugar, el RNA, el oligo(dT)₁₈ y el agua se incubaron durante 10 minutos a 65 °C para asegurar la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA. Para todos los tipos celulares se partió de 1 µg de RNA (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Reactivos utilizados en la reacción de desnaturalización de RNA previa a la síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
RNA total	1 µg	Variable
Oligo (dT) ₁₈	2,5 µM	1
H ₂ O	-	Variable
Volumen total		13

Tras 5 minutos a 4 °C, se añadieron el resto de los reactivos recogidos en la Tabla 7.5 hasta completar un volumen de 20 µl. Cuando el RNA a retrotranscribir fue menor de 4 Kb se incubó media hora a 55 °C; cuando el RNA fue mayor de 4 Kb se incubó durante una hora a 50 °C. En ambos casos se inactivó la transcriptasa reversa incubando la mezcla durante 5 minutos a 85 °C.

Tabla 7.5. Reactivos utilizados en la reacción de síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
Transcriptasa reversa	20 U/µl	0,5
Tampón de reacción	5X	4
Inhibidor de RNAsas	40 U/µl	0,5
dNTPs	10 mM	2
Volumen total		20

7.3.5. Diseño de oligonucleótidos para amplificaciones por PCR

Para diseñar los oligonucleótidos para amplificar un gen, se accedió a la secuencia codificante de los genes en la base de datos *Ensembl* (Yates et al., 2020). De todos los transcritos, se eligió el canónico (según *Uniprot*, (Bateman et al., 2021)) excepto cuando se clonaron isoformas. En base a esta secuencia, se diseñó manualmente una pareja de oligonucleótidos, cuyas características se analizaron con la herramienta *OligoAnalyzer 3.1* de IDT (Anexo II, Tabla 10.3).

Para diseñar las parejas de oligonucleótidos se procuró que la temperatura de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos directo y reverso fuera lo más parecido posible entre sí y que el contenido en G+C estuviera comprendido entre un 40-60 %.

7.3.6. Amplificación de DNA mediante PCR

La PCR o la Reacción en Cadena de la Polimerasa, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA de interés. Las PCRs se realizaron en un termociclador, utilizando como molde el cDNA retrotranscrito a partir de RNA (*Apartado 7.3.2 y 7.3.4*) o el DNA total o genómico aislado como se ha descrito anteriormente (*Apartado 7.3.1*).

Las condiciones de la PCR varían en función de las características de la región de DNA que se desea amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada. La reacción se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante, generalmente con la enzima *IBIAN® Taq DNA Polymerase*, para PCR de comprobación, y la *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) para clonajes, realizándose en tubos de 200 µl y en un volumen final de 50 o 20 µl que contenían los reactivos recogidos en la Tabla 7.6.

Tabla 7.6. Reactivos necesarios para la reacción de PCR.

Reactivos para la reacción de PCR con <i>IBIAN® Taq DNA Polymerase</i>			Reactivos para la reacción de PCR con <i>Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase</i>		
Reactivo	Concentración final	Volumen (µl)	Reactivo	Concentración final	Volumen (µl)
Tampón de reacción 10X	1X	5	Tampón de reacción 5X	1X	4
Mix dNTPs (40mM)	800 µm (200 µm cada uno)	1	Mix dNTPs (10 mM)	200 µM cada uno	0,4
Oligonucleótido Directo (10 µM)	0,2 µM	1	Oligonucleótido Directo (10 µM)	0,5 µM	1
Oligonucleótido Reverso (10 µM)	0,2 µM	1	Oligonucleótido Reverso (10 µM)	0,5 µM	1
<i>IBIAN® Taq DNA Polymerase</i>	1,25 – 5 unidades	1	<i>Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase</i>	0,02 unidades/µl	0,2
DNA - cDNA		5	cDNA		2
H ₂ O		36	H ₂ O		11,4
Total		50	Total		20

Para minimizar el error debido a la manipulación de volúmenes pequeños y para facilitar el trabajo, se preparó una mezcla previa que contenía todos los reactivos necesarios para todas las muestras excepto el cDNA o el DNA. Para comprobar la ausencia de contaminación durante la

preparación de los reactivos, en cada experimento se utilizó, además de las muestras, un tubo adicional que contenía la mezcla de reacción pero que carecía de DNA (blanco).

Se estableció una temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligonucleótidos empleados. Las condiciones generales de amplificación se recogen en la Tabla 7.7.

Tabla 7.7. Condiciones generales de amplificación en la reacción de PCR.

IBIAN® Taq DNA Polymerase			Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase		
94 °C	2 minutos		98 °C	30 segundos	
94 °C	10 segundos	30 ciclos	98 °C	10 segundos	30 ciclos
55-68 °C*	20 segundos		55-68 °C*	20 segundos	
72 °C	30 segundos / 500 bp		72 °C	15-30 segundos / kb	
72 °C	5 minutos		72 °C	5 minutos	
4 °C	∞		4 °C	∞	

*Normalmente la temperatura de hibridación óptima es 5 °C menos que la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos.

La temperatura de hibridación (T_m , o *melting temperature*) de los oligonucleótidos para la PCR con la *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* se calculó mediante la herramienta de cálculo de T_m de Thermo Scientific disponible en la página web: www.thermoscientific.com/pcrwebtools.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados durante el presente trabajo se muestran en Anexo II, Tabla 10.3.

7.3.7. Separación electroforética de ácidos nucleicos

Para separar fragmentos de DNA según su tamaño se utilizaron geles de agarosa al 1 % (p/v) en TAE 1X. Durante el transcurso de este trabajo se realizaron geles con distinta porosidad según los objetivos.

Para la obtención de los geles se disolvió la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración requerida en 50 ml de TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Para disolver la agarosa, la solución se calentó en el microondas sin llegar a ebullición, cuando la temperatura de la disolución descendió, se adicionó bromuro de etidio a 10 mg/ml (concentración final en el gel de 0,8 µg/ml de bromuro de etidio), para poder realizar la observación posterior con luz UV. A continuación, se vertió en el soporte electroforético (de Bio-Rad), previamente sellado con cinta de carroceros y con los peines necesarios. Una vez polimerizado, se retiró la cinta de carroceros

y se colocó en la cubeta de electroforesis, que se llenó hasta cubrir el gel con TAE 1X y se retiraron los peines.

La carga de las muestras se realizó mezclando 5 µl de los productos de amplificación con unos 2 µl de tampón de carga (Ficoll 400 al 15 %, azul de bromofenol al 0,2 %, en tampón TAE 1X). Se confirmó el tamaño de las bandas utilizando marcadores de peso molecular de 100 bp a 2000 bp (*Low DNA Mass Ladder*, Life Technologies, Invitrogen) o de 1000 bp a 10000 bp (*High DNA Mass Ladder*, Life Technologies, Invitrogen).

Finalmente, se procedió a la separación electroforética aplicando un voltaje 100 V durante unos 30-40 minutos. El resultado se visualizó tras la exposición del gel a una fuente de radiación ultravioleta (Gel-Doc™, Bio-Rad).

7.3.8. Clonaje de productos de PCR

Para el clonaje de los distintos productos de PCR se utilizaron el vector pCR™-Blunt II-TOPO® (Life Technologies™) y pCR™-4Blunt-TOPO® (Life Technologies™) (Anexo II, Figura 10.1), haciendo uso del kit comercial *Zero Blunt® Topo® PCR Cloning Kit* (Life Technologies™) y siguiendo las instrucciones de éste durante el proceso. Los reactivos se muestran en la Tabla 7.8. Las distintas mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se transformaron las bacterias o se congelaron a -20 °C hasta su transformación.

Tabla 7.8. Reactivos para el clonaje de los productos de PCR en los vectores pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™-4Blunt-TOPO® de Life Technologies™.

Producto de PCR*	Solución de sal #	Vector	H ₂ O	Total
1-4 µl	1 µl	1 µl	Hasta 6 µl	6 µl

* La cantidad de producto de PCR añadido varió según la intensidad de banda en el gel de agarosa.

Solución de sal: NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M.

7.3.8.1. Clonación de ATAD3C, ATA3A y ATAD3B

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para clonar en los vectores de expresión la proteína ATAD3C, las isoformas Q9NVI7-1 y Q9NVI7-2 de ATAD3A (por homología de secuencia en los extremos amino y carboxilo, se diseñaron una pareja de oligonucleótidos para ambas isoformas) y las isoformas Q5T9A4-1 y Q5T9A4-3 de ATAD3B (se diseñaron dos oligonucleótidos directos, por diferencias en el comienzo de la secuencia, y se utilizó el mismo oligonucleótido reverso).

La clonación de *ATAD3C* (NCBI: NM_001039211, NP_001034300) se realizó a partir de cDNA de la línea celular RPMI 8226, mediante los oligonucleótidos *ATAD3C F* y *ATAD3C R* (Anexo II, Tabla 10.3). Se introdujo en el vector de expresión pCR-Blunt-II-TOPO utilizando los enzimas de restricción BamHI y PmeI. A continuación, la falta de un anticuerpo específico para la proteína *ATAD3C*, condujo a la clonación de la secuencia del péptido HA, (YPYDVPDYA; TACCCCTATGATGTGCCAGATTACGCC) derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe, que se trata de un péptido fácil de reconocer por anticuerpos específicos. El péptido HA se clonó tanto en el extremo amino de *ATAD3C*, mediante el oligonucleótido *ATAD3C-HA Nterminal F*; como en el extremo carboxilo de *ATAD3C*, mediante el oligonucleótido *ATAD3C-HA R*. Ambas amplificaciones se realizaron con la polimerasa *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* de ThermoFisher y, los insertos obtenidos, se clonaron en el vector de expresión pCR™-4Blunt-TOPO®.

El cDNA de la isoforma 2 de *ATAD3A* (NCBI: NM_001170535, NP_001164006) se obtuvo de la línea celular HEK293T con los oligonucleótidos *ATAD3A F (2)* y *ATAD3A R* (Anexo II, Tabla 10.3) mediante una PCR específica con la polimerasa *AccuPrime™ Pfx SuperMix* de Invitrogen. Se incluyeron los sitios de corte de los enzimas de restricción BamHI en el 5' y PmeI en el 3' de *ATAD3A* y se clonó en el vector de expresión pCR™-Blunt II-TOPO®.

A partir de HEK293T también se clonó el cDNA correspondiente a la isoforma 3 de *ATAD3B* (Q5T9A4-3) con los oligonucleótidos *ATAD3B small F* y *ATAD3B R* (Anexo II, Tabla 10.3). Sin embargo, no se consiguió clonar la isoforma 1 de *ATAD3B* a partir de cDNA de las líneas celulares HEK293T, fibroblastos y SH-SY5Y. Por tanto, se compró el clon 313B578 de bacterias en glicerol en Dharmacon (MHS6278-202827180, *MGC Human ATAD3B Sequence-Verified cDNA*), que contenían el vector de expresión pOTB7 con resistencia a cloranfenicol (25 µg/ml) con la isoforma 1 de *ATAD3B* (NCBI: NM_031921, NP_114127). A partir de ese vector, se consiguió aislar *ATAD3B* con los oligonucleótidos *ATAD3A F (2)* (común a *ATAD3A* y *ATAD3B*) y *ATAD3B R* (Anexo II, Tabla 10.3) mediante una PCR con la *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* de ThermoFisher incluyéndole los sitios de los enzimas de restricción BamHI en el 5' y PmeI en el 3' de la secuencia. A continuación, se clonó en el vector de expresión pCR™-4Blunt-TOPO® con los enzimas de restricción BamHI y PmeI.

Para realizar el análisis de inmunoprecipitación con el anticuerpo HA, se clonó el epítipo HA en el extremo carboxilo de *ATAD3A* y de *ATAD3B*, y se utilizaron los oligonucleótidos *ATAD3A-HA R* y *ATAD3B-HA R*, respectivamente.

7.3.9. Clonaje de insertos en vector lentiviral

Tras la transformación de bacterias DH5 α (Apartado 7.2.4) con los plásmidos pCRTM-Blunt II-TOPO[®] o pCRTM-4Blunt-TOPO[®] y los insertos, se realizó una PCR de comprobación (Apartado 7.2.5) para verificar por PCR que las colonias que habían crecido sobre la placa con kanamicina o ampicilina contenían el gen de interés. Las colonias que correctamente habían incorporado el gen de interés se inocularon en 5 ml de medio LB bajo en sal con el antibiótico correspondiente y se incubaron en agitación (250 rpm) durante toda la noche a 37 °C. Se extrajo el DNA plasmídico (*kit NucleoSpin[®] Plasmid EasyPure*, Macherey-Nagel), y finalmente, se comprobó el clonaje mediante secuenciación (Apartado 7.3.10), se procedió a la liberación de los distintos insertos y la posterior clonación en el vector lentiviral pWPXLd Ires Neo o pWPXLd Ires Puro (Anexo II, Figura 10.4), versiones modificadas de pWPXLd (Tronolab, Addgene #12258).

7.3.9.1. Digestión de plásmido e insertos

En los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los insertos mediante PCR (Apartado 7.3.6), se introdujeron las secuencias de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pme*I (New England BioLabs[®]). Mediante digestión enzimática (Tabla 7.9) se liberaron los insertos de pCRTM-Blunt II-TOPO[®] o pCRTM-4Blunt-TOPO[®]. De la misma forma se digirió el plásmido lentiviral pWPXLd Ires Neo o pWPXLd Ires Puro y se linealizó. Las mezclas se incubaron 1 hora a 37 °C. Tras este tiempo, a la mezcla de digestión del plásmido lentiviral se le añadió fosfatasa alcalina (CIAP, Invitrogen) para evitar la recirculación de éste, y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. El resto de las muestras se mantuvieron en hielo.

Tabla 7.9. Reactivos necesarios para realizar la liberación de los insertos de interés.

Plásmido	DNA	<i>Pme</i> I (actividad 10 UI/ μ l)	<i>Bam</i> HI (actividad 20 UI/ μ l)	Tampón Cut Smart	Agua
pWPXLd Ires Neo / Puro	1000 ng/[pWPXLd Ires Neo]	2 μ l	1 μ l	5 μ l	Hasta 50 μ l
pCR Blunt II TOPO [®] /pCR 4Blunt TOPO [®]	1000 ng/[inserto]	2 μ l	1 μ l	5 μ l	Hasta 50 μ l

A continuación, se realizó un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) en TAE 1X (Apartado 7.3.7). Se cargó todo el volumen de las muestras digeridas (25 μ l/pocillo) junto a 2 μ l de tampón de carga (Ficoll 400 al 15 %, azul de bromofenol al 0,2 %, en tampón TAE 1X). Como marcadores de peso molecular se usaron *High DNA Mass Ladder* y *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Finalmente, se aplicó un voltaje constante de 100 V hasta la correcta separación.

7.3.9.2. *Purificación de DNA desde gel de agarosa y cuantificación en gel de agarosa*

Tras la separación electroforética en un gel de agarosa al 0,7 % (p/v) utilizando tampón TAE 1X, se visualizó el gel bajo luz UV. Se cortaron las bandas de interés con un bisturí estéril. El DNA se purificó utilizando el kit comercial *DNA gel extraction kit* de Norgen Biotek Corp siguiendo paso a paso las instrucciones del fabricante.

Una vez purificadas las bandas de DNA, tanto del inserto como del plásmido, se llevó a cabo una cuantificación en gel de agarosa. Para ello, se realizó un gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE 1X (*Apartado 7.3.7*). Se cargaron 4 µl de marcador de peso molecular (*Low DNA Mass Ladder* o *High DNA Mass Ladder*) preparado en una proporción 1:1 con el tampón de carga *10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer* (ThermoFisher). Tras la separación electroforética, se procedió a la visualización bajo luz UV. La determinación de la concentración se realizó por comparación por intensidad de banda de las muestras con las bandas de marcador. Las concentraciones de las bandas del marcador son conocidas y añadiendo la misma cantidad de muestra que de marcador (2 µl) se pudo hacer una correlación de concentraciones de DNA.

7.3.9.3. *Reacción de ligación*

En la mezcla de ligación del inserto con el plásmido pWPXLd Ires Neo o Ires Puro debe de haber una proporción vector:inserto de 1:3. La cantidad de DNA de cada componente que hay que añadir a la mezcla viene dada por la ecuación: *Cantidad DNA (µg) = X femtomol/3000 · kb de fragmento*. Para calcular la cantidad de DNA del vector, X se sustituye por 10 femtomoles, y para la cantidad del inserto, por 30 femtomoles.

Una vez determinada la cantidad de DNA de inserto y vector necesaria, teniendo en cuenta las concentraciones de cada uno de ellos, se calculó el volumen a adicionar para la mezcla de ligación ($\text{volumen} = \text{cantidad DNA necesario} / [\text{DNA}]$). Así se mezcló el volumen de inserto y de vector necesario, junto con 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs®), 2 µl de tampón de ligación (New England BioLabs®) y agua hasta completar un volumen total de 20 µl. Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 16 °C. La mezcla de ligación se conservó a -20 °C hasta su uso.

Tras la ligación, se transformaron bacterias DH5α competentes por choque térmico (*Apartado 7.2.4*) y a continuación se realizó la PCR de colonias bacterianas (*Apartado 7.2.5*). Las positivas se crecieron en medio LB y se aisló el plásmido mediante el kit *NucleoSpin® Plasmid Transfection-grade* (Macherey-Nagel). Por último, se secuenció el plásmido para comprobar que el gen de interés se clonó en el vector lentiviral sin mutaciones (*Apartado 7.3.10*).

7.3.10. Preparación de muestras para la secuenciación

La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Las muestras se prepararon a la concentración solicitada por el servicio, dependiendo del tamaño del fragmento de DNA, en un volumen total de 15 μ l. En el caso de plásmidos de 3-20 kb, la concentración requerida fue de 100 ng/ μ l; para plásmidos >20 kb, de 200 ng/ μ l. En el caso de productos de PCR: para los menores de 500 pb, la concentración necesaria fue de 10 ng/ μ l; de 500 a 1000 pb, 20 ng/ μ l; de 1000 a 1500 pb, 30 ng/ μ l; y de 1500 a 2500 pb, 40 ng/ μ l. A las muestras se les adicionó 1,5 μ l de los oligonucleótidos pertinentes para la secuenciación a una concentración de 5 μ M. Finalmente, los resultados se analizaron con el programa de alineamiento de secuencias *Codon Code Aligner v3.7.1*.

7.3.11. Mutagénesis dirigida

Mediante el *Kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* de Agilent Technologies y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se generaron las mutaciones de interés en las secuencias clonadas.

El método utiliza la DNA polimerasa *PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase* de elevada fidelidad para la replicación de ambas cadenas del plásmido. Se partió de plásmido de doble cadena (pCRTM-Blunt II-TOPO[®] o pCRTM-4Blunt-TOPO[®]) que contiene el gen a mutar y dos oligonucleótidos complementarios a las cadenas opuestas del vector, ambos conteniendo la mutación deseada. Los reactivos y pasos del protocolo se recogen en la Tabla 7.10. En primer lugar, se desnaturalizó el DNA del vector, se hibridaron los oligonucleótidos diseñados previamente y se extendieron con la DNA polimerasa *PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase*. Se generó un plásmido mutado que contiene *mellas* en las dos cadenas de DNA. A continuación, el producto se trató con Dpn I, una endonucleasa específica de DNA metilado y hemimetilado, para digerir el DNA inicial (el DNA aislado de la mayoría de las cepas de *E.coli* es metilado y, por tanto, susceptible a la digestión por Dpn I) y seleccionar el DNA amplificado en la PCR, que contiene la mutación. El vector que se obtuvo conteniendo la mutación deseada fue, entonces, transformado en bacterias competentes DH5 α (*Apartado 7.2.4*).

El último paso fue comprobar que la mutación se había generado mediante la secuenciación del plásmido aislado de bacterias (*Apartado 7.3.10*). Si esto era positivo, se realizó la clonación del inserto de interés que contenía la mutación generada en un plásmido lentiviral y posterior generación de las células transducidas, siguiendo los protocolos descritos en los *Apartados 7.3.9 y 7.1.12*.

Tabla 7.10. Reactivos y programa utilizado para la reacción de mutagénesis dirigida.

Reactivos		Concentración	Volumen
Buffer de reacción		10X	5 µl
pCR™-Blunt II-TOPO® o pCR™-4Blunt-TOPO® + gen de interés		50 ng	X µl
Primer F		125 ng	1,14 µl
Primer R		125 ng	1,14 µl
dNTPs		10 µM	1 µl
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase			1 µl
Agua			Hasta 50 µl
Programa PCR			
95 °C 30 s			
95 °C 30 s	14 ciclos		
55 °C 1 min			
68 °C 1 min/kb			
4 °C ∞			

Se realizó mutagénesis dirigida en *ATAD3C* para introducir la mutación c.692T>C (p.Leu231Pro, L231P) del paciente, utilizando *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (de Stratagene), con los oligonucleótidos Primer F *ATAD3C* mutagénesis y Primer R *ATAD3C* mutagénesis (Anexo II, Tabla 10.3).

7.3.12. Sistema *Alt-R CRISPR-Cas9*

Para la edición del genoma se utilizó el sistema *Alt-R CRISPR-Cas9* de IDT. Se basa en el sistema de CRISPR nativo bacteriano de *S. Pyogenes*, que requiere de dos moléculas cortas de RNA, una secuencia de RNA CRISPR (crRNA) específica del gen que se quiere editar, y una conservada, crRNA transactivado (tracrRNA), que interactúan mediante homología parcial para formar el dúplex crRNA:tracrRNA que normalmente se llama como la guía de RNA (gRNA). La guía de RNA junto con la enzima Cas9 se introducen en las células mediante la lipofección, se encuentran en un liposoma catiónico que entra en la célula por endocitosis. La gRNA dirige y provoca que Cas9 corte la doble cadena de DNA *targets*, activando el sistema de recombinación no homóloga (NHEJ) o generando un sitio para la inserción de DNA exógeno donador por el sistema de reparación directa (HDR) (Figura 7.1).

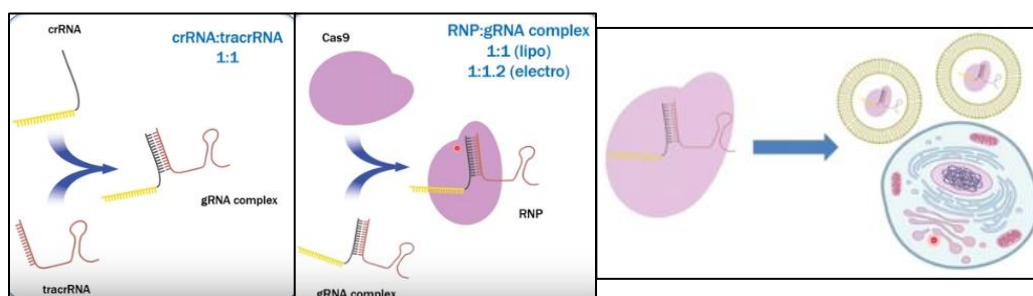


Figura 7.1 Edición del genoma mediante CRISPR-Cas9 mediado por ribonucleoproteínas (RNP) de la web de CRISPR-Cas9 de IDT. El crRNA, secuencia específica del RNA del gen a editar, y el tracrRNA, secuencia conservada, forman el dúplex crRNA:tracrRNA mediante homología parcial. La guía crRNA:tracrRNA junto con la enzima Cas9 y la lipofectamina forman los complejos que se introducen en las células.

A continuación, se detallan los procedimientos que se siguieron:

En primer lugar, se prepararon los oligonucleótidos de RNA o guías Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA a 100 μM en agua libre de nucleasas. Se mezclaron con el tracrRNA a concentraciones equimolares a 1 μM y seguidamente se calentaron a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y se dejaron enfriar hasta 20-25 $^{\circ}\text{C}$ (crRNA:tracrRNA).

A continuación, se produjeron las ribonucleoproteínas (RNP). Para ello, primero se preparó la enzima *Cas9 Alt-R S.p.* en solución de trabajo (HEPES 20 mM; KCl 150 mM, pH 7.5) a 1 μM de concentración final. Y se mezclaron los reactivos recogidos en la Tabla 7.11 (añadiéndolos en el orden en el que se describen), para cada guía de RNA (gRNA), y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 7.11. Reactivos necesarios para la producción de RNP.

Reactivo	Volumen por pocillo
Buffer de Trabajo HEPES 20 mM; KCl 150 mM, pH 7,5	21,4 μl
Reactivo <i>Cas9 PLUSTM</i>	0,6 μl
Enzima Cas9 (1 μM)	1,5 μl
Guía oligo RNA (1 μM): crRNA:tracrRNA	1,5 μl

A continuación, se mezclaron los reactivos de la Tabla 7.12, y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para formar los complejos de transfección.

Tabla 7.12. Reactivos necesarios para formar los complejos de transfección.

Reactivo	Volumen
RNP (preparado anteriormente)	25 µl
Reactivo de transfección CRISPRMAX: Lipofectamina*	1,2 µl
PBS 1X	23,8 µl
Volumen total	50 µl

*Lipofectamine® CRISPRMAX, transfection reagent, Invitrogen CMAX00003.

Durante la incubación, se prepararon las células a transfectar, se diluyeron a 400000 células/ml en medio DMEM sin aditivos. Primero, se añadieron 50 µl de la mezcla de transfección a cada pocillo de la placa de 96 pocillos, y seguidamente, 100 µl de las células diluidas, consiguiendo una concentración final de células de 40000 células/pocillo, y una concentración final de RNP de 10 nM. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, 5 % CO₂.

Cuando las células crecieron, se recogieron los clones y el DNA o RNA se extrajo para analizar mediante secuenciación si se había producido un cambio de uno o varios nucleótidos (*Apartado 7.3.10*).

Las guías y los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo se recogen en la **Tabla 7.13**.

Tabla 7.13. Guías de RNA Alt-R CRISPR-Cas9 utilizadas en este trabajo y los oligonucleótidos utilizados para secuenciarlas.

Gen al que van dirigidas	Guía Alt-R CRISPR-Cas9 gRNA	Secuencia de la guía	Oligonucleótido	Secuencia
ATAD3A, ATAD3B, ATAD3C	ATAD3-36 <			

7.3.13. Medida de expresión de transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real

7.3.13.1. Genes estudiados

En este trabajo se midió la cantidad de transcritos de varios genes nucleares mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Los transcritos *ATAD3A*, *ATAD3B*, *ATAD3C* y el gen de referencia *β -actina* se estudiaron mediante la tecnología TaqMan®. Por otro lado, mediante el reactivo *Sybr Green* (Roche) se determinó la expresión de la polimerasa mitocondrial gamma (*POLG*) y del factor de ensamblaje *NDUFA6* y el gen de referencia *β -actina*.

7.3.13.2. Tecnología TaqMan®

La expresión de los genes se determinó mediante la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real en el sistema ViiA7 de Applied Biosystems utilizando las sondas TaqMan® de Thermo Fisher Scientific.

Esta técnica permite la detección y cuantificación de una sonda fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR durante la reacción.

La tecnología TaqMan® permite medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés *quencher*); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia, que está relacionada con la cantidad de amplicón producido (Heid et al., 1996).

Para cada muestra, además de los genes deseados (marcados con el fluoróforo FAM), se realizó la amplificación de un gen de referencia, en nuestro caso la *β-actina* (marcada con el fluoróforo VIC), que cumple una serie de características necesarias para actuar como tal: se expresa en todas las muestras y su expresión es cuantitativamente constante e intensa.

Se utilizó como molde el cDNA previamente sintetizado (*Apartado 7.3.4*). La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de Applied Biosystems, añadiendo a cada uno de ellos los reactivos que se muestran en la Tabla 7.14. Las condiciones de reacción se recogen en la Tabla 7.15.

Tabla 7.14. Mezcla de reacción para determinar la expresión de genes por PCR a tiempo real.

Componentes de la mezcla de reacción de PCR	Concentración	Volumen por reacción (μl)
<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>	20 X	0,5
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>	2 X	5
cDNA	Directamente de la reacción de RT	2
Agua libre de RNasas	-	2,5
Volumen total		10

Tabla 7.15. Programa para realizar la qPCR.

Parámetro	Incubación UNG	Activación polimerasa	PCR (40 ciclos)	
	Incubación	Incubación	Desnaturalización	Anillamiento/Extensión
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

Las sondas que se utilizaron se recogen en la Tabla 7.16:

Tabla 7.16. Sondas TaqMan utilizadas en este trabajo.

Gen	Código de la sonda - Casa comercial
<i>ATAD3A</i>	Hs01587333_m1, Thermo Fisher Scientific
<i>ATAD3B</i>	Hs02577779_Mh, Thermo Fisher Scientific
<i>ATAD3C</i>	Hs03008589_g1, Thermo Fisher Scientific
<i>β-actina</i>	Hs99999903_m1, Thermo Fisher Scientific

7.3.13.3. Estudio de la especificidad de las sondas TaqMan de *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* utilizando plásmidos control

La casa comercial ThermoFisher describe para las sondas pre-diseñadas la longitud del amplicón o secuencia donde se une la sonda, una secuencia de 25 pares de bases, y el punto medio de la secuencia del amplicón (*assay location*). Tanto para *ATAD3A* (posición *assay location* 1391 y longitud del amplicón 163 nucleótidos) como para *ATAD3B* (posición *assay location* 1391 y longitud del amplicón 165 nucleótidos), esta secuencia se encuentra dentro de la secuencia de cDNA anteriormente clonada. Hay que destacar que la sonda TaqMan frente *ATAD3B* es capaz de detectar la isoforma canónica 1 como la isoforma 3, resultando imposible determinar cuál de las dos isoformas se detectan. En la Figura 9.1 de Anexo I se recoge el alineamiento de ambas isoformas indicando su homología. Por el contrario, para *ATAD3C* (posición *assay location* 2287 y longitud del amplicón 160 nucleótidos) la secuencia donde se une la sonda se localiza en la zona 3' UTR (región no traducida), que no se clonó junto con la zona codificante. Por tanto, para obtener un plásmido control, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar una secuencia de 540 pb en el extremo 3' UTR de *ATAD3C* (TaqMan *ATAD3C* 540 F y TaqMan *ATAD3C* 540 R, Anexo II, Tabla 10.3) con la polimerasa *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase* y se clonó en el vector de expresión pCR™-4Blunt-TOPO®.

Para determinar la especificidad de las sondas, se realizaron diluciones seriadas (10, 100, 1000 y 10000 copias) de los vectores (pCR™-4Blunt-TOPO® con las secuencias de los genes ATAD3A, ATAD3B y región 3' UTR de ATAD3C clonadas). Se realizó una qPCR y se utilizaron las diferentes sondas frente a los tres vectores de expresión. Únicamente se detectó señal de amplificación cuando la sonda TaqMan era la específica del plásmido.

7.3.13.4. Estudio de la eficiencia de la qPCR con las sondas TaqMan específicas de ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en líneas celulares

Para determinar la eficiencia de la qPCR con las sondas TaqMan específicas de ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en las líneas celulares se midió su eficiencia (Pfaffl, 2001). Se realizaron diluciones seriadas del cDNA de cada línea celular y se llevó a cabo una qPCR con las sondas específicas para ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C. Se representó el ciclo Ct (ciclo umbral) obtenido en cada dilución frente a las diluciones de cDNA. Se obtuvo la eficiencia aplicando la siguiente fórmula: $\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente de la recta})}$. Una pendiente de $-3,3 \pm 10 \%$ refleja una eficiencia del $100 \% \pm 10 \%$ (Eficiencia = 2). Una reacción de qPCR con menos eficiencia tendría menor sensibilidad. Los gráficos Ct vs. diluciones de cDNA de cada línea celular y sonda TaqMan, así como las eficiencias calculadas para las sondas utilizadas se pueden observar en la Figura 7.2.

La Tabla 7.17 recoge la eficiencia de las sondas TaqMan para ATAD3A, ATAD3B o ATAD3C para fibroblastos C y para las líneas celulares HEK293T y RPMI.

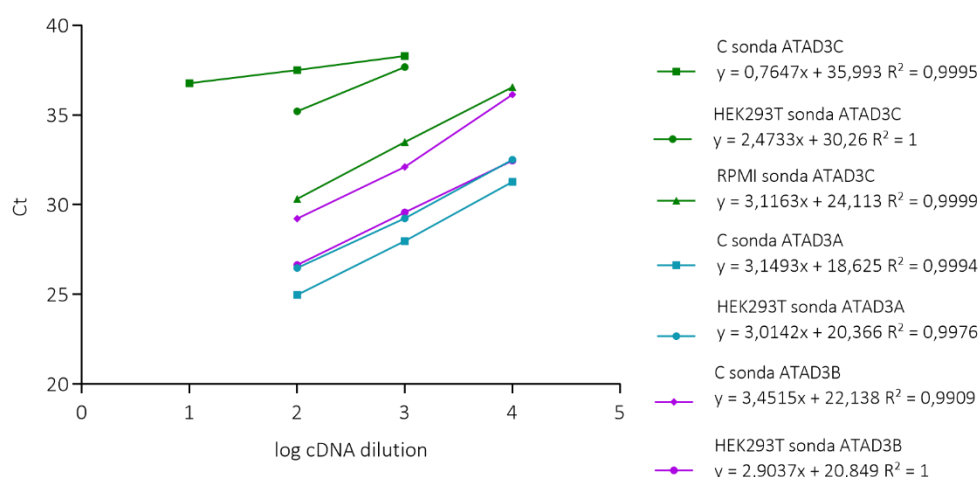


Figura 7.2 Gráfico que representa los ciclos (Ct) obtenidos en la qPCR con las sondas TaqMan respecto el logaritmo de las diluciones del cDNA de las líneas celulares de fibroblastos C y de las líneas celulares HEK293T y RPMI. Las ecuaciones de las rectas obtenidas se anotaron en la leyenda. La pendiente de la recta se aplica en la fórmula: $\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente de la recta})}$. Las eficiencias calculadas se recogen en la Tabla 7.17.

Tabla 7.17. Eficiencias calculadas para las sondas TaqMan utilizadas para detectar la expresión de *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* mediante qPCR.

Sonda TaqMan	Línea celular	Pendiente de la recta	Eficiencia de qPCR
ATAD3A	Fibroblastos C	-3,1493	2,0774514
	HEK293T	-3,0142	2,1466586
ATAD3B	Fibroblastos C	-3,4515	1,9486287
	HEK293T	-2,9	2,2122163
ATAD3C	Fibroblastos C	-0,7647	20,309647
	HEK293T	-2,4733	2,5369863
	RPMI	-3,11	2,0967343

7.3.13.5. Sybr Green

Cuando la expresión de los genes se determinó utilizando *Sybr Green*, un fluorocromo que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena, permitiendo detectar la generación de productos específicos durante la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real, se utilizó en el sistema Light Cycler 2.0 de Roche.

Se preparó la mezcla de reacción en los capilares adecuados para el Light Cycler 2.0 de Roche, se centrifugaron a 1,3 x g durante 1 minuto y se introdujeron en el carrusel del aparato. Las etapas que se llevaron a cabo se recogen en la Tabla 7.18.

Tabla 7.18. Reactivos y programa para realizar la qPCR utilizando Sybr Green

Reactivos	Volumen	Cuantificación			
Mezcla de oligonucleótidos 5µM	0,5 µl	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Mezcla SYBR Green	2 µl	Desnaturalización	95 °C	10 min	1
cDNA	1 µl	Desnaturalización	95 °C	10 s	55
Agua	6,5 µl	Anillamiento	60 °C	10 s	
Volumen total/capilar	10 µl	Extensión	72 °C	10 s	

Tras la qPCR, las muestras se analizaron con el programa *LightCycler Software 4.05*.

Se analizaron duplicados o triplicados de todas las medidas. Los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en Anexo II, Tabla 10.3. Para evitar posibles contaminaciones, las muestras se

prepararon en campana de flujo laminar y el material se irradió previamente con luz UV. Las muestras con *Sybr Green* se mantuvieron en todo momento preservadas de la luz.

7.3.14. Cuantificación del número de copias de DNA mitocondrial por qPCR

Para medir los niveles de mtDNA se utilizaron sondas TaqMan® con las que se determinaron simultáneamente el genoma mitocondrial y el nuclear (Marcuello et al., 2005). La sonda mitocondrial (fluoróforo FAM, Em=518 nm, Ex=494 nm) está diseñada para que hibride en una zona muy conservada del mtDNA (en el gen *MT-RNR1*), mientras que la nuclear (fluoróforo VIC, Em=554 nm, Ex=538 nm) lo hace en el gen de la *RNasa P*, que se encuentra en monocopia en el genoma haploide. Los resultados se expresan como relación DNA mitocondrial/ DNA nuclear.

En la Tabla 7.19 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y de la sonda mitocondrial.

Tabla 7.19. Oligonucleótidos necesarios para cuantificar el número de copias de mtDNA por qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm
MT-L (directo)	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4 °C
MT-H (reverso)	CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA	58,2 °C
Sonda MT-FAM	FAM-TGC CAG CCA CCG CG	69,3 °C

La sonda específica de *RNasa P* marcada con el fluoróforo VIC se obtuvo de la casa comercial Applied Biosystems (*TaqMan® RNase P Control Reagents Kit* de Applied Biosystems), la cual ya contenía los oligonucleótidos en el mismo tubo (la casa comercial no proporciona las secuencias de éstos). De esta casa comercial también se obtuvo el Master Mix (*TaqMan® Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems) necesario para realizar la qPCR, con la DNA polimerasa, Uracil-N glicosilasa (UNG, enzima utilizado para eliminar productos de PCR residuales de previas amplificaciones de PCR), dNTPs con dUTP, *ROX™ Passive Reference* (colorante inerte cuya fluorescencia no cambia durante la reacción, se añade para normalizar las diferencias entre pocillos que pudieran ocurrir dadas por artefactos como el error de pipeteo o limitaciones del instrumento) y el buffer.

Para realizar las rectas estándar se partió de una mezcla de dos plásmidos: uno presentaba un inserto con la región del mtDNA del gen *MT-RNR1* y otro el gen de la *RNasa P*. Esta mezcla contenía 9×10^6 copias del gen mitocondrial y 9×10^4 copias del gen nuclear. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas 1:3 en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

Para preparar las muestras, se ajustó la concentración de DNA a aproximadamente 2 ng/μl.

Los volúmenes de la reacción y las condiciones se recogen en la Tabla 7.20. Y las reacciones tuvieron lugar en el StepOne™ System de Applied Biosystems siguiendo las condiciones universales recogidas en la Tabla 7.20.

Tabla 7.20. Mezcla de reacción y condiciones universales para cuantificar el número de copias de DNA mitocondrial por qPCR.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen de reacción	Condiciones para qPCR		
<i>2X TaqMan™ Gene Expression Master Mix</i>		10 µl			
Oligonucleótido Directo 12S-F	5 µM	0,5 µl	50 °C	2 min	
Oligonucleótido Reverso 12S-R	5 µM	0,5 µl	95 °C	10 min	40 ciclos
Sonda mitocondrial-FAM	5 µM	0,5 µl	95 °C	15 s	
RNAse P-VIC	20X	1 µl	60 °C	1 min	
H ₂ O		2,5 µl	50 °C	30 s	
DNA total		5 µl			
Volumen Total		µl			

7.3.15. Medida de depleción del DNA mitocondrial y cinética de repoblación

Para determinar la cinética de recuperación del DNA mitocondrial, se analizó la ratio de mtDNA respecto nDNA tras la depleción por bromuro de etidio (EtBr) y recuperación del mtDNA en las líneas celulares. El bromuro de etidio es un conocido intercalante del DNA con efectos mutagénicos, que impide la replicación del DNA mitocondrial, provocando de esta manera que se produzca un descenso progresivo en el número de copias. Su efecto, no obstante, es reversible, y por ello tras aplicar este medio se sustituyó con medio normal.

Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Cuando se encontraban al 80 % de confluencia, se indujo la depleción de DNA mediante la sustitución del medio por medio de tratamiento (o medio de depleción, medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 50 ng/ml de bromuro de etidio (stock 500 µg/ml) y 50 µg/ml de uridina (stock 10 mg/ml)) durante 8 días. Se recogieron células a diferentes tiempos (0, 4, 8 días) para posteriormente extraer el DNA y cuantificar el número de copias de mtDNA (*Apartado 7.3.14*). Tras la exposición, se permitió la recuperación de las líneas celulares durante 12 días con medio DMEM completo, y se recogieron las células a diferentes tiempos (5, 10, 20 días) para extraer el DNA y cuantificar el número de copias de mtDNA.

Todas las células se mantuvieron entre el 50 y el 80 % de confluencia para asegurar que se encontraran en fase de crecimiento exponencial. El experimento se realizó por triplicado.

7.4. Análisis de proteínas

7.4.1. Preparación de extractos celulares totales

Para extraer las proteínas a partir de extractos celulares totales, se partió de células cultivadas en una placa de 100 mm de diámetro al 80 % de confluencia, mantenidas en medio de baja glucosa (1 g/l) durante 3 o 4 días, que se tripsinizaron y recogieron, se lavaron con PBS, se centrifugaron y el pellet se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso.

El pellet de células se resuspendió en el tampón RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 10 % NP-40, deoxicalato de sodio 2,5 %, EDTA 10 mM, Millipore) con 1X de la mezcla de inhibidores de proteasas (*cOmplete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack* de Roche). La suspensión celular se incubó en la rueda giratoria (rotator SB2, Stuart®) durante 15 minutos a 4 °C, favoreciendo la rotura de las membranas celulares por acción del detergente. A continuación, esta suspensión se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos a 4 °C (Eppendorf centrifuge 5415 R) para eliminar los restos celulares. Finalmente, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se procedió a la medida de la concentración de proteínas en las muestras mediante el método Bradford (*Apartado 7.4.2*). Las proteínas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

7.4.2. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método Bradford

La cuantificación de la concentración proteica de los extractos celulares se llevó a cabo por espectrofotometría utilizando el método Bradford (Bio-Rad) en un espectrofotómetro (UNICAM UV 500, de Thermo Spectronic). Este procedimiento está basado en la medida de la cantidad de proteínas totales presente en un homogenado celular mediante una reacción colorimétrica entre el colorante y las proteínas en solución. El complejo colorante-proteína causa un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. La cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente.

Para ello, se prepararon diferentes diluciones de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida (1 mg/ml), con el objetivo de construir una recta de calibrado que constara de los siguientes puntos: 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 µg de proteína/µl, el reactivo Bradford (200 µl) y agua hasta 1 ml. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegida de la luz, se midió la absorbancia a 595 nm. Para calcular la concentración de proteína en las muestras se

interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida, teniendo en cuenta la dilución realizada. Las muestras se midieron por duplicado o triplicado.

Al representar los valores de Absorbancia (595 nm) frente a la concentración de proteína BSA (mg/ml), se obtuvo la recta patrón, que se ajusta a una ecuación del tipo $y = ax + b$, donde a es la pendiente de la recta y b la ordenada en el origen. Comparando esta ecuación con la Ley de Beer-Lambert, la pendiente a se corresponde con el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 595 nm. La concentración de proteínas en la muestra es:

$$[\text{proteína}] = \frac{\text{Abs medida} - \text{ordenada en el origen}}{\epsilon}$$

7.4.3. Purificación de fracción mitocondrial

7.4.3.1. *Preparación de mitoplastos y solubilización con digitonina para Blue Native-PAGE*

La extracción de mitoplastos se realizó partiendo de pellet celulares siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. Para la obtención de mitoplastos (mitocondrias sin membrana externa) se recogieron 2 millones de células y se lavaron dos veces con PBS frío. A continuación, se resuspendió el pellet celular en 200 μ l de PBS frío, se añadieron 200 μ l de digitonina 8 mg/ml en PBS, y se incubó en hielo durante 10 minutos. Tras la incubación, se añadió 1 ml de PBS frío y centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se repitió el último paso, se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet a -80 °C hasta su uso.

El pellet se resuspendió en 75 μ l de Ácido Aminocaproico 0,75 M y Bis-Tris/HCl 50 mM pH 7 y 7,5 μ l de DDM 10 % (concentración final de DDM 1 %), se incubó en la rueda giratoria durante 20 minutos a 4 °C y se centrifugó a máxima velocidad (18000 x g) durante 30 minutos a 4 °C (centrífuga Eppendorf® 5415 R). El sobrenadante se recogió en un tubo nuevo y se cuantificó la cantidad de mitoplastos presente en cada muestra mediante el método Bradford (*Apartado 7.4.2*). Se cargaron en el gel de Blue Native-PAGE de 8 a 10 μ g de mitoplastos por pocillo (*Apartado 7.4.5.2*).

7.4.3.2. *Extracción de mitocondrias*

La purificación de mitocondrias se realiza con el fin de poder analizar mediante electroforesis nativa Blue Native-PAGE e inmunodetección los complejos de la cadena respiratoria y otras proteínas de interés de nuestras líneas celulares, control y mutantes.

7.4.3.3. Extracción de mitocondrias a partir de la línea celular HEK293T

La extracción de mitocondrias se realizó siguiendo el protocolo de Fernandez-Vizarra et al., 2006.

Para la extracción y purificación de mitocondrias se partió de 15 a 25 placas de 150 mm de diámetro de células con una confluencia del 80-90 %. Se tripsinizaron y recogieron en un tubo de 50 ml. Los pellets celulares se lavaron dos veces con PBS frío y centrifugaron a 600 x g durante 8 minutos a 4 °C. En el último lavado, las células se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron en las mismas condiciones que anteriormente. Se midió el volumen ocupado por las células y se mantuvieron en hielo durante todo el protocolo.

Las células se resuspendieron en la mitad del volumen ocupado por las células de medio hipotónico IB 0,1X (dilución 1:100 a partir de IB 10X (NaCl 0,35 M, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl 0,35 M pH 7,8) para facilitar la rotura de las células. Se pipeteó la suspensión celular en un homogeneizador de vidrio de 2 o 5 cm³ adecuado para homogeneizar la muestra. La suspensión celular que quedó en el tubo de 15 ml se recogió con la otra mitad del volumen original ocupado por las células de IB 0,1 X y se pipeteó junto con el resto de suspensión celular.

A continuación, se realizó la rotura de las células mediante homogeneización realizando 25 *strokes* o movimientos manuales verticales rápidos en el homogeneizador de tejidos Teflón tipo Potter. Inmediatamente, se añadió una décima parte del volumen inicial ocupado por las células de IB 10X (NaCl 0,35 M, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl 0,35 M pH 7,8), con el fin de hacer el medio isotónico. Las células homogeneizadas se transfirieron a varios tubos de 1,5 ml y centrifugaron a 1600 x g durante 3 minutos a 4 °C en la centrifuga Eppendorf® 5415R, precipitando las células que no se han roto y los núcleos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml. Y el pellet se resuspendió en la mitad de su volumen con el medio hipotónico IB 0,1X y se transfirió al tubo de cristal. El resto de suspensión celular que quedó en el tubo de 1,5 ml se transfirió al mismo tubo de cristal con la otra mitad de su volumen de medio hipotónico IB 0,1 X. Se realizaron 25 *strokes* en el homogeneizador y se añadió una décima parte del volumen del pellet de IB 10X. Se centrifugaron en tubos de 1,5 ml a 1600 x g durante 3 minutos a 4 °C.

A continuación, el sobrenadante se mezcló con el sobrenadante obtenido en la primera centrifugación, y se centrifugó en las mismas condiciones que anteriormente. El pellet que se obtuvo se guardó y el sobrenadante se centrifugó a 17900 x g durante 2 minutos a 4 °C consiguiendo la precipitación de las mitocondrias.

Se realizaron dos lavados del pellet mitocondrial con medio A (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), seguidos de centrifugaciones a 17900 x g durante 5 minutos a 4 °C, y un último lavado con medio de mitoplastos (manitol 250 mM, sacarosa 70 mM, HEPES 2 mM, pH 7,4). Se realizó la cuantificación del enriquecido mitocondrial mediante el método Bradford (*Apartado 7.4.2*). A continuación, las mitocondrias se resuspendieron en la solución *Thomas Langer* (Mg-Acetato 4 mM, Aminocaproico 5 mM, NaCl 50 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 30 mM, pH 7,4, (Koppen et al., 2007)) e inhibidor de proteasas (*cOmplete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack* de Roche), para evitar la degradación de las proteínas, a una concentración final de 5 µg/µl. Las mitocondrias se conservaron a -80 °C hasta su uso.

7.4.3.4. Extracción de mitocondrias a partir de fibroblastos primarios

La extracción y purificación de mitocondrias de fibroblastos se realizó siguiendo el protocolo de (Schägger & Pfeiffer, 2000) con algunas modificaciones (Acín-Pérez et al., 2008), en el que se requieren solamente de 5 a 10 placas de células 150 mm de diámetro.

Se partió de al menos 5 placas de fibroblastos 150 mm al 80 % de confluencia. Las células se tripsinizaron en el menor tiempo posible, se recogieron en PBS suplementado al 10 % con SFB y se mantuvieron siempre a en hielo a partir de este momento, con el fin de inhibir la acción de las proteasas.

Tras centrifugar las células a 460 x g durante 5 minutos (Centrífuga Eppendorf® 5415 R), el pellet celular se lavó dos veces con PBS 1X frío mediante resuspensión y centrifugación. A continuación, el pellet de células se congeló a -80 °C durante, como mínimo, 10 minutos para facilitar la ruptura celular. El proceso se puede parar en este momento conservando las células a -80 °C.

El pellet celular se descongeló lentamente en hielo y se resuspendió en tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7,2), en una proporción aproximada de volúmenes tampón: pellet celular de 7:1. La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo en un homogeneizador de vidrio de 2 cm³, y se homogeneizó mediante 10 “pops” o *strokes* o movimientos manuales verticales rápidos para conseguir la rotura de las células al sacar el émbolo del homogeneizador, en el homogeneizador de tejidos Teflón tipo. Rápidamente, se le añadió 1 volumen de tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7,2) y, tras mezclar bien, se centrifugó a 1000 g (en la centrífuga Beckman Coulter Allegra X30R) durante 5 minutos a 4 °C, para eliminar los núcleos y las células que no se han roto.

A continuación, y opcionalmente, se recogió el sobrenadante y el pellet se rehomogeneizó en las mismas condiciones que la primera vez. Los sobrenadantes de las dos homogeneizaciones se

mezclaron, se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 17900 x g durante 2 minutos a 4 °C. El pellet de mitocondrias obtenido se suspendió en medio A (sacarosa 320 mM, Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), se dividieron las mitocondrias en dos tubos de 1,5 ml y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones que la primera vez. Este paso de lavado y centrifugación se repitió hasta tener todas las mitocondrias en un único tubo.

El pellet de mitocondrias resultante se resuspendió en 500 µl de medio A, de los que se tomaron 4 µl para medir la concentración de proteínas de la muestra por duplicado mediante el método Bradford (*Apartado 7.4.2*). A continuación, se volvió a sedimentar la muestra a 17900 x g durante 2 minutos a 4 °C, y se resuspendió en el volumen necesario de solución de *Thomas Langer* (Mg-Acetato 4 mM, Aminocaproico 5 mM, NaCl 50 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 30 mM, pH 7.4, (Koppen et al., 2007)) para que la concentración final fuese 5 µg/µl, además se añadió la mezcla de inhibidores de proteasas 1X (*cOmplete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack* de Roche) para evitar la degradación de las proteínas. Las mitocondrias se conservaron a -80 °C hasta su uso.

7.4.3.5. Obtención de enriquecido mitocondrial a partir de tejido (músculo)

La muestra de músculo se homogeneizó con el buffer de homogeneización (sacarosa 250 mM, imidazol 20 mM, inhibidor de proteasas AEBSF 1 mM). A continuación, se centrifugó la muestra homogeneizada a 20000 x g durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet. Tras descongelar la muestra, se lisó con el buffer de lisis (ácido aminocaproico 5 mM, NaCl 50 mM, imidazol/HCl 50 mM pH 7, inhibidor de proteasas AEBSF 1 mM). Seguidamente se añadió DDM (10 %) e incubó durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 100000 x g durante 15 minutos a 4 °C, y se recogió el sobrenadante.

En la microfuga se centrifugaron a 17000 rpm durante 88 minutos. Se recogió el sobrenadante, se realizó la cuantificación de las proteínas mediante Bradford y se almacenó a -80 °C.

7.4.3.6. Preparación de mitocondrias obtenidas de extractos celulares para análisis en Blue Native-PAGE

Tras la extracción de mitocondrias (*Apartado 7.4.3.3 y 7.4.3.4*), éstas se solubilizaron utilizando detergentes suaves, que permiten que los complejos respiratorios se mantengan intactos y no se disgreguen las proteínas que los componen. Se utilizó el dodecilmaltósido (DDM, Sigma) a una concentración de 1,5 % de DDM en la solución, o la digitonina (Sigma) que se utilizó a una concentración de 1,5 % digitonina en la solución. Las muestras se incubaron en la rueda giratoria durante 20 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se

recogió el sobrenadante y se cargó en un gel Blue Native o SDS-PAGE (*Apartados 7.4.5.2 y 7.4.5.1*) o se congeló a -80 °C hasta su uso.

7.4.3.7. Separación de proteínas mitocondriales solubles y de membrana

Para determinar la localización submitocondrial de ATAD3C, se realizaron dos tratamientos con mitocondrias intactas siguiendo el protocolo de Ryan et al., 2001.

Se llevó a cabo la rotura física de las mitocondrias aisladas. Para ello, un pellet de 400 µg de mitocondrias frescas se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM. Posteriormente, se realizó el procedimiento de congelado-descongelado (*Freeze-thawing*), congelando la muestra en nitrógeno líquido durante 30 segundos y descongelándola en el baño a 37 °C, seguido de un vórtex para favorecer la descongelación. Tras cinco ciclos de congelación-descongelación, se sonicó la muestra dos veces durante 5 segundos a 20 % amplitud y ciclo de 0,5 % en un sonicador UP 200S Ultrasonic Processor, Hielscher, Germany, de este modo se realizó la rotura de las membranas de las mitocondrias. Las muestras se centrifugaron a 18000 x g durante 1 hora a 4 °C, y se obtuvieron dos fases: las proteínas que precipitaron probablemente estarían unidas a la membrana y, las proteínas que se localizaban en el sobrenadante eran proteínas solubles de la matriz o espacio intermembrana. El precipitado se resuspendió en la solución de Tris-Cl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM e inhibidor de proteasas y, junto con el resto de las fracciones mitocondriales, se cargaron en un gel desnaturizante SDS-PAGE (*Apartado 7.4.5.1*).

Para separar las proteínas asociadas a la membrana de las integradas en la membrana, se llevó a cabo una extracción con carbonato sódico a pH 11,3. Para ello, se partió de alícuotas de 400 µg de mitocondrias purificadas que se centrifugaron a 17900 x g durante 4 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se incubó en la solución alcalina de carbonato sódico Na₂CO₃ 0,1 M pH 11,3 e inhibidor de proteasas durante 30 minutos en hielo (mezclándola cada 5 minutos), y posteriormente, se centrifugó a 18000 x g durante 1 hora a 4 °C. Tras esta extracción, la mayoría de las proteínas integrales de membrana permanecen en el pellet mientras que en el sobrenadante se encuentran las proteínas solubles o no embebidas en la membrana. El pellet se resuspendió en la solución alcalina Na₂CO₃ 0,1 M pH 11,3 e inhibidor de proteasas y, junto con el resto de las fracciones, se cargaron en un gel desnaturizante de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se analizaron por inmunodetección con anticuerpos específicos (*Anexo II, Tabla 10.1*).

7.4.3.8. Tratamiento de mitocondrias con Tripsina y Proteinasa K

Para determinar la localización submitocondrial de las proteínas de interés se realizaron tratamientos de mitocondrias intactas recién aisladas con tripsina (Sigma) y proteinasa K (Invitrogen).

Para ello, se prepararon alícuotas de 50 µg de mitocondrias (10 µl de mitocondrias a una concentración de 5 µg/µl), se centrifugaron a 17900 x g durante 5 minutos a 4 °C, y el pellet de mitocondrias se resuspendió en 20 µl de buffer de *Tomas Langer* o medio hipotónico (HEPES 20 mM pH 7,5).

Por un lado, se añadió 1 µl de tripsina a 0,1 µg/µl en cada alícuota de 50 µg de mitocondrias (concentración de tripsina final 5 µg/ml) y se incubaron durante 2, 5, 10 y 20 minutos en un baño a 30 °C. Se detuvo la reacción con 25 µl de PBS al 10 % SFB. Las alícuotas se centrifugaron a 17900 x g durante 5 minutos a 4 °C.

Por otro lado, 50 µg de mitocondrias con 0,2, 1, 2 o 4 µg de proteinasa K se incubaron durante 15 minutos a 25 °C con agitación ocasional. Para detener la reacción, las alícuotas se dejaron en hielo y se añadieron 2 mM de inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) en etanol. Por último, se centrifugaron a 17900 x g durante 5 minutos a 4 °C.

En ambos casos, las proteínas de los pellets del enriquecido mitocondrial se extrajeron mediante RIPA 1X (*Apartado 7.4.1*) y se cargaron en un gel de SDS-PAGE (*Apartado 7.4.5.1*).

7.4.4. Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-HA

Para determinar interacciones entre proteínas se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo contra el epítipo HA unido a bolas magnéticas (*Pierce Anti-HA Magnetic Beads*, Thermo Scientific). La inmunoprecipitación se realizó siguiendo el protocolo de (Callegari et al., 2016) con algunas modificaciones.

Tras la extracción de mitocondrias, 200 µg de mitocondrias se solubilizaron en el buffer de Solubilización con digitonina (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, EDTA 1 mM, 1 % Digitonina e inhibidor de proteasas (*cOmplete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack*, de Roche)) en un agitador orbital en horizontal (Orbital Shaker SO3, Stuart Scientific) en movimiento (110 rpm) durante 30 minutos a 4 °C.

Las mitocondrias solubilizadas se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C en la centrífuga 5427 R de Eppendorf. Al sobrenadante se le añadió buffer de Solubilización sin digitonina (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, EDTA 1 mM, inhibidor de proteasas 1X). A

continuación, la muestra se incubó en una rueda giratoria durante dos horas y media a 4 °C con 0,2 mg de bolitas magnéticas unidas al anticuerpo anti-HA prelavadas 3 veces con el buffer de lavado (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, EDTA 1 mM, Digitonina 0,2 %, inhibidor de proteasas 1X). Tras la incubación, las proteínas unidas a las proteínas con epítipo -HA unidas a su vez a las bolitas magnéticas se separaron del resto con ayuda de un imán que las atrajo hacia un lateral del tubo, mientras se eliminaba el sobrenadante. Las bolitas se lavaron y volvieron a separar de la solución de lavado 10 veces.

Finalmente, las proteínas se eluyeron de las bolas magnéticas resuspendiendo la mezcla de proteínas y bolas magnéticas en *1 X Laemmli Sample Buffer* en condiciones no reductoras (glicerol 5 % (v/v), SDS 2%, azul de bromofenol 0,01 % (p/v), Tris HCl 0,04 M pH 6,8) e incubando la solución durante 5 minutos a 95 °C. Seguidamente, se analizaron en un gel de SDS-PAGE (*Apartado 7.4.5.1*) y se realizó un Western Blot (*Apartado 7.4.7*) o se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

7.4.5. Electroforesis de proteínas

7.4.5.1. *Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular.

Los geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE o SDS-Tris-Glicina) están formados por dos fases que difieren en composición y función. La fase superior, que se conoce como fase de concentración, contiene un 2 % (p/v) de poliacrilamida. La inferior, llamada fase de resolución, puede contener un porcentaje variable de acrilamida-bisacrilamida en función del tamaño de las proteínas que nos interesa separar, siendo menor el porcentaje cuanto más grande es la proteína, en general del 8-14 % (p/v). En el desarrollo de esta tesis se prepararon geles SDS-PAGE (Tabla 7.21) utilizando el sistema de Mini-Protean de Bio-Rad.

Tabla 7.21. Componentes necesarios para preparar los geles separador y concentrador para la electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

	Gel separador			Gel concentrador
	8 %	12,5 %	14 %	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8)	1,333 ml	2,125 ml	2,33 ml	0,333 ml
Tampón 4X*	1,250 ml	1,25 ml	1,25 ml	0,5 ml
H₂O mili-Q	2,420 ml	1,5 ml	1,42 ml	1,167 ml
APS 20 %	15 µl	30 µl	30 µl	20 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

*Tampón 4X: Tampón del gel separador 4X: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%, EDTA 8 mM. Tampón del gel concentrador 4X: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM.

En primer lugar, se preparó el gel separador y se vertió entre los cristales que forman el soporte (de 1 mm de anchura), dejando 1,6 cm por encima para el gel concentrador. Seguidamente, se añadió una capa de isopropanol para formar un frente recto y evitar la posible entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Tras la polimerización del gel separador, se eliminó el isopropanol y se lavó la superficie con agua destilada. Seguidamente se añadió la mezcla del gel concentrador hasta rebosar, se insertó el peine para delimitar los pocillos y se dejó polimerizar. A continuación, se retiró el peine y se montaron los geles en vertical en la cubeta de electroforesis. Tras añadir el tampón de electroforesis (running buffer 1X) a la cubeta, se limpiaron los pocillos a presión con ayuda de una jeringuilla, para eliminar la acrilamida que se hubiera podido quedar en ellos y facilitar la entrada de las proteínas. Se cargaron las muestras de proteínas mezcladas con el tampón de carga *Laemmli Buffer 4X* (Glicerol 10 %, Tris- HCl 160 mM pH 6,8, SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v), β-mercaptoetanol 4 % (v/v)). El marcador de pesos moleculares que se empleó fue el *Precision Plus Protein™ Standards*, de Bio-Rad.

La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 12 mA por gel hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador y llegaron al separador, momento en el que se incrementó la intensidad a 20 mA hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel.

7.4.5.2. *Electroforesis nativa: Blue Native*

La electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida permite la resolución electroforética de complejos proteicos en su estado nativo, incluidos los complejos que integran la cadena de transporte electrónico que se encuentran en la membrana mitocondrial interna (Schägger, 1995; Wittig et al., 2006). El colorante azul de Coomassie G-250, presente en el buffer del cátodo, se une

a los complejos y les confiere una carga neta negativa que permite su movilidad electroforética sin alterar su estado nativo.

Para llevar a cabo este tipo de electroforesis, se utilizaron los geles en gradiente *NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels* (1.0 mm, 10-well) de Invitrogen™. Tras la limpieza de los pocillos con un papel de filtro, se montó el gel en el soporte adecuado, a 4 °C, y se añadieron los tampones comerciales del *1X NativePAGE™ Running Buffer* y *NativePAGE™ Cathode Buffer Additive*, de Novex® de Life technologies, diluidos en agua destilada. Las mitocondrias solubilizadas con un detergente suave se mezclaron con 1/5 de su volumen de tampón de carga (Blue G 5 %) y se cargaron en el gel. La mayor parte de las veces también se cargó el marcador de pesos moleculares *NativeMark™ Unstained Protein Standard* de Invitrogen™.

La electroforesis se llevó a cabo en el soporte *XCell Surelock™ Mini-Cell Electrophoresis System* (Novex by Life Technologies) a 4 °C y a 100 V durante 1 hora y 15 minutos, tras este tiempo el tampón del cátodo se cambió por un tampón de la misma composición, pero con menor concentración de Coomassie G (10 veces menos). A continuación, el gel corrió a 150 V durante 1 hora más, después, se aumentó el voltaje a 200 V durante 20-40 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, los complejos proteicos separados en el gel se transfirieron a membranas de PVDF y las proteínas de interés se analizaron por Western Blot (*Apartados 7.4.6 y 7.4.7*).

7.4.5.3. Electroforesis en segunda dimensión: Blue Native-2D

Tras la separación de proteínas nativas mediante Blue Native (*Apartado 7.4.5.2*), en algunos casos, se realizaron geles desnaturalizantes de SDS-PAGE-Tricina (Schägger, 2006), técnica que permite la separación de las subunidades de los complejos en función de su peso molecular.

Para realizar la segunda dimensión, se recortaron los carriles del gel Blue Native de primera dimensión, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en 1 % de SDS y 1 % de β -mercaptoetanol en agua para que se dissociaran los complejos. A continuación, se dispusieron de forma horizontal en el pocillo único del gel concentrador sobre un gel separador SDS-PAGE-Tricina previamente elaborado (Figura 7.3).

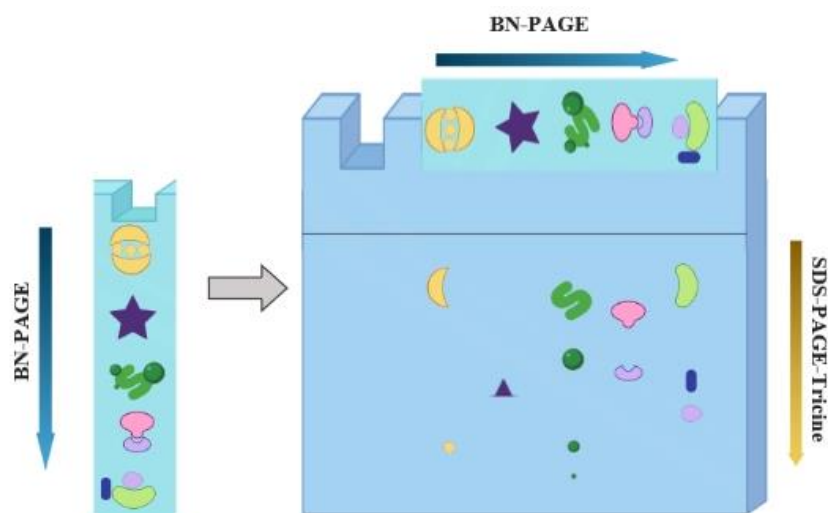


Figura 7.3 Diagrama de la electroforesis Blue Native y de la segunda dimensión SDS-PAGE-Tricina.

Los geles de SDS-PAGE-Tricina que se utilizaron fueron de 1,5 mm de grosor. Se prepararon de acuerdo con la Tabla 7.22.

Tabla 7.22. Reactivos utilizados para realizar geles de SDS-PAGE-Tricina.

	4 % gel concentrador		10 % gel separador	
	1 gel 1,5mm	2 geles 1,5mm	1 gel 1,5mm	2 geles 1,5mm
Acrilamida Bisacrilamida-3 (AB-3)	500 μ l	1 ml	2,4 ml	4,8 ml
Gel Buffer 3 X	1,5 ml	3 ml	4 ml	8 ml
Agua MiliQ	4 ml	8 ml	5,6 ml	11,2 ml
APS 20 %	90 μ l	180 μ l	120 μ l	240 μ l
TEMED	4,5 μ l	9 μ l	6 μ l	12 μ l

La electroforesis se llevó a cabo a 30 V hasta que el carril de la Blue Native entró en el gel separador, entonces se incrementó el voltaje a 80 V hasta que el frente llegó al final del gel.

La composición de los reactivos utilizados para este tipo de geles se muestra en la Tabla 7.23.

Tabla 7.23. Composición de los reactivos utilizados en los geles SDS-PAGE-Tricina.

Tampón del cátodo 10 X	Tris 1 M, Tricina 1 M, SDS 1 %, pH 8,25
Tampón del ánodo 10 X	Tris 1 M, HCl 0,225 M, pH 8,9
Tampón del Gel 3 X	Tris 3 M, HCl 1 M, SDS 0,3 %, pH 8,45
Acrilamida-Bisacrilamida-3 (AB-3)	48 g acrilamida y 1,5 g de bisacrilamida en 100 ml de agua

7.4.6. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

La transferencia de las proteínas desde el gel de electroforesis a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia húmeda, utilizando el sistema *Mini Trans-Blot® Cell* de Bio-Rad. Para ello, se cortó un rectángulo de la membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno *Hybond-P* de Amersham) adecuado al tamaño del gel, se activó con metanol durante 10 segundos y se lavó con agua destilada. A continuación, la membrana se sumergió en el tampón de transferencia frío o BSN (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % (v/v)) durante unos minutos. Simultáneamente, se prepararon cuatro papeles Whatman® (Sigma) y dos esponjas para cada gel junto con los soportes. Cuando todo estaba equilibrado en buffer BSN, se procedió a montar el sistema, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 7.4). La transferencia se realizó a 80 V durante 2 horas a 4 °C.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante la tinción reversible con *Rojo Ponceau* (Sigma), que tiñe las proteínas y permite observar todas las proteínas presentes en la membrana. Tras observar que efectivamente la transferencia se había realizado de forma adecuada, la membrana se lavó con agua destilada varias veces.

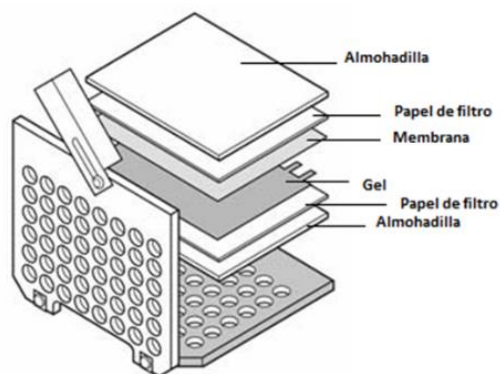


Figura 7.4 Montaje del casete para la transferencia húmeda.

7.4.7. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

Tras la electrotransferencia de las proteínas, la membrana de PVDF se incubó con PBS-T (Tween20 al 0,1 % en PBS, Tampón Fosfato Salino, PBS 1X: NaCl 150 mM, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 8 mM, K_2HPO_4 1,6 mM, pH 7,4) al 5 % p/v de leche desnatada en polvo durante toda la noche a 4 °C o durante 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos y evitar así falsos positivos en la detección proteica.

7.4.7.1. Incubación con anticuerpos

Antes de realizar la incubación con el anticuerpo primario, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante 3 lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. Tanto los lavados como las

incubaciones se llevaron a cabo en cubetas con agitación suave a temperatura ambiente. La membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido a la proporción adecuada (Anexo II, Tabla 10.1) en una disolución de PBS-T al 0,05 % de leche desnatada en polvo o durante toda la noche a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se retiró la solución y se realizaron tres lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, ratón o rata, según el origen del anticuerpo primario) conjugado con una peroxidasa de rábano se diluyó a la proporción correspondiente en PBS-T al 0,05 % de leche y se incubó de 30 minutos a 1 hora. Finalmente, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron los últimos 3 lavados de 10 minutos con PBS-T.

7.4.7.2. Detección quimioluminiscente

Para detectar las proteínas presentes en la membrana se utilizó un sistema de inmunodetección indirecta. Este sistema se basa en la utilización de un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que detecta al primario y que, además, está conjugado con una peroxidasa, que al entrar en contacto con su sustrato quimioluminiscente (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* de Thermo Scientific), el luminol, produce una señal luminosa.

La membrana se incubó durante 1 minuto con el sustrato quimioluminiscente. La luz emitida en dicha reacción fue detectada por el aparato Amersham Imager 600 de GE Healthcare Life Science programado para realizar exposiciones de distinta duración.

El tiempo de exposición dependió de la cantidad de muestra cargada en el gel y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado. Una vez obtenidas las imágenes, las bandas fueron cuantificadas con el programa *ImageQuant TL* de Amersham.

7.4.7.3. Reutilización de membranas

Con el fin de eliminar los anticuerpos unidos a las proteínas fijadas en la membrana y hacer posible la reutilización de ésta en otra inmunodetección, la membrana se sumergió en solución de *stripping* (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) y se incubó durante 30 minutos a 58 °C. Transcurrido este tiempo, es necesario volver a bloquear la membrana con PBS-T al 5 % p/v de leche desnatada en polvo durante toda la noche a 4 °C o durante 1 hora a temperatura ambiente.

7.4.8. Tinción de geles con azul de Coomassie

Los geles se tiñeron en una solución de 0,1 % de azul de Coomassie G-250 en 50 % Metanol y 10 % Ácido Acético durante una hora. A continuación, se realizaron varios lavados con la solución de desteñir (metanol al 40 % en agua destilada). Los resultados mejoraron si una vez que se observan las bandas se retiraba la solución de desteñir y se dejaba el gel en agua destilada un día.

7.5. Análisis de la interacción de proteínas mediante proteómica

La preparación de muestras, identificación de péptidos en el espectrómetro de masas y el análisis de datos obtenidos se realizaron en la Unidad de Proteómica del Instituto Nacional (PRB3-ISCIII) de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

7.5.1. Preparación de las muestras

Las bandas de proteínas recortadas del gel o la solución de proteínas se redujeron con DTT, se añadió iodoacetamida y se digirieron con Tripsina (*Trypsin sequencing grade*; Roche) durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos procedentes de la digestión de las bandas o muestras en dilución se desalaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 en punta (*ZipTip*, Merck Millipore). Los péptidos fueron disueltos con acetonitrilo al 80 % y ácido trifluoroacético 0,1 %. Finalmente, las muestras se secaron por centrifugación a vacío en el Speed-vac y resuspendieron en 2 % AN, 0,1 % ácido fórmico, antes del análisis Nano LC-MS/MS.

7.5.2. Cromatografía líquida y análisis de espectrómetros de masas

Para detectar los péptidos de las diferentes proteínas ATAD3, se realizó un método combinado.

Los péptidos se analizaron por nano-cromatografía líquida (*nano Easy-nLc 1000*, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive HF* (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Los péptidos se concentraron “on-line” por cromatografía de fase reversa (RP) usando una precolumna *Acclaim PepMap 100* (ThermoScientific) 20 mm x 75 µm ID, C18 de 3 µm diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro y entonces separados en una columna *C18 Picofrit* (Thermo Scientific Easy Spray Column, *PepMap RSLC C18n* de 500 mm x 75 µm ID, 2 µm de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para spray, operando a un flujo de 250 nl/min. Los péptidos se eluyeron utilizando un gradiente desde el 2 % hasta el 35 % de buffer B en 90 minutos, hasta 45 % de buffer B en 10 minutos más (Buffer A: 0,1 % AF en Agua; Buffer B: 0,1 % AF en ACN).

El nano-HPLC está acoplado on-line a la fuente nanoelectrospray del espectrómetro de masas Q-exactive HF con el que se analizaron los péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica.

La adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1,8 Kv para el electrospray y el ión *transfer tube* que guía los iones desde el espray hasta el interior del espectrómetro de masas tenía una temperatura de 280 °C. Se utilizó un método de proteómica dirigida combinado para detectar las proteínas ATAD3 en la muestra, además de otras proteínas.

En este método combinado los péptidos fueron detectados en modo Full scan MS con una resolución de 60.000 en un rango de masas m/z de 225-1800 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en modo de adquisición dependiente de la información (*Data-dependent acquisition* (DDA)) del MS con una resolución de 30.000. Así, en cada microscan se seleccionaron hasta 15 precursores con carga de 2+ a 8+, en función de su intensidad (*threshold*: $2,1 \times 10^4$), con exclusión dinámica de 10 segundos, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de ± 2 unidades de m/z , en un tiempo máximo de 120 ms para su fragmentación por HCD (*High Collision Dissociation*) con una energía de colisión normalizada del 20 %. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo.

7.5.3. Identificación de proteínas

7.5.3.1. Identificación contra bases de datos

Se adquirieron entre 33.000 y 44.000 espectros MS/MS en el análisis de cada una de las muestras analizadas.

7.5.3.2. Parámetros de Búsqueda

Los datos de MS/MS se analizaron de doble forma. Primero, a través de la herramienta informática *Proteome Discoverer v.2.2* (Thermo Scientific) con el motor de búsqueda *MASCOT 2.6* (MatrixScience, Londres, RU) para identificar los péptidos frente a la base de datos *DataBase* con la secuencia FASTA de las proteínas diana, la base de datos de contaminantes (secuencia 247) y *SwissProt DataBase* con restricción taxonómica para humanos (553089 secuencias; 2017/02/21). Los parámetros empleados en Mascot para las búsquedas para identificar péptidos fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0,02 Da, 2 puntos de corte perdidos para la tripsina, carbamidometil cisteína como modificación fija y oxidación de metionina, como modificación variable. Los scores resultantes de *MASCOT* fueron ajustados por el algoritmo *percolator*, que consigue discriminar mejor entre las identificaciones correctas e incorrectas de los péptidos.

Se consideraron proteínas “correctamente” identificadas aquellas que estaban por debajo de un FDR del 1 % y tenían al menos 1 péptido único identificado con un intervalo de confianza (CI) que superara el 99 % (la probabilidad de que el péptido identificado se debiera al azar es menor del 1 % ($p < 0,01$)).

En segundo lugar, se utilizó la herramienta informática *Skyline* v 20.1 para asignar los precursores y transiciones a los péptidos seleccionados en el método de proteómica dirigida y comprobar la detección de cualquiera de las proteínas ATAD3.

Los resultados de identificación obtenidos se incorporaron como librería de espectros en *Skyline* con el fin de confirmar la concordancia (dotp) entre las transiciones y las secuencias (espectros MS/MS) de los péptidos. En la mayoría de los casos en los que existía confirmación por MS/MS, la concordancia superaba el 90 % y como mínimo el 80 %.

Tras un primer análisis de los resultados en *Skyline*, se eliminaron aquellos péptidos, precursores y transiciones que no fueron detectadas, filtrando el método.

7.6. Estudio funcional del sistema de fosforilación oxidativa

7.6.1. Medida de niveles de ATP mitocondrial

Para la medida de los niveles de ATP mitocondrial se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo blanco (Casa comercial Nunc), especiales para medidas de luminiscencia. En el ensayo se midió la cantidad de ATP por el método luciferina/luciferasa y el número de células viables mediante fluorescencia. Para cada medida se utilizaron 6 pocillos por línea celular, es decir, un total de 12 pocillos/línea celular. 10-14 horas antes del ensayo se sembraron 2×10^4 células por pocillo, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) hasta un volumen de 200 μ l. El día del ensayo, se realizaron dos lavados con PBS de todos los pocillos y se añadieron 100 μ l de medios de cultivo correspondientes para cada ensayo (Tabla 7.24). Se incubaron 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Tabla 7.24. Reactivos utilizados para el ensayo de ATP mitocondrial y número de células viables.

Reactivo	ATP mitocondrial	Número de células viables
Medio de cultivo	DMEM libre (sin glucosa) *	DMEM libre (sin glucosa) *
Piruvato	1 mM	1 mM
2-deoxi-glucosa*	5 mM	-
Celltiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega)*	-	μ l/pocillo

* El uso de medios sin glucosa y suplementados con piruvato impiden la síntesis de ATP por la vía glucolítica. Además, el uso de 2-deoxi-glucosa inhibe la primera enzima de esta vía. El reactivo *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* es metabolizado por las células viables produciendo fluorescencia a una longitud de onda de 600 nm.

Tras las 2 horas, se midió la fluorescencia (600 nm) en los pocillos destinados a la estimación de número de células. A continuación, en los pocillos destinados a la medida de ATP, se añadió un volumen de la solución luciferina/luciferasa (*CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay*, Promega), se agitó durante 1-2 minutos, para permitir el lisado celular, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron las medidas de luminiscencia. Para ambas medidas se utilizó el lector de placas NOVOSTar MBG (Labtech).

7.6.2. Medida de actividades enzimáticas de los complejos en espectrofotómetro

7.6.2.1. *Preparación de extractos celulares para ensayos enzimáticos de complejos respiratorios*

Para realizar ensayos enzimáticos de complejos respiratorios se prepararon extractos celulares totales a partir de células en cultivo. Para ello, se partió de dos placas de 100 mm de diámetro, se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron las células y se resuspendieron en PBS con 10 % de suero. Tras la centrifugación, las células se lavaron dos veces con PBS 1 X. A continuación, el pellet se resuspendió en 400 µl de buffer A (MOPS KOH 20 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM), se añadieron 400 µl de solución de digitonina 0,2 mg/ml en buffer A y se mezclaron e incubaron durante 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 5000 x g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante que contenía la fracción citosólica. El pellet se resuspendió en 600 µl de buffer B (MOPS KOH 20 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, EDTA Na₄ 1 mM), y se incubó durante 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 10000 x g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Los pellets se pueden almacenar a -80 °C hasta tres meses para usarse en ensayos enzimáticos o medir inmediatamente.

Antes de realizar el ensayo enzimático, el pellet se resuspendió en 200 µl de buffer fosfato potásico 10 mM a pH 7,4. Las células se rompieron tras someterlas a tres ciclos de *freeze-thawing* en los cuales la mezcla se congeló en N₂ (l) y se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37 °C. A continuación, se midió la concentración de proteína de la muestra y se continuó con el ensayo enzimático.

7.6.2.2. *Ensayos enzimáticos*

Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (UNICAM UV 500, de Thermo Spectronic) termostatzado mediante un sistema Peltier PCB150 de DBS y los datos se registraron utilizando la herramienta informática *Vision 32*. Las muestras se depositaron en cubetas

de plástico de 1 ml y se incubaron a la temperatura de medida durante un tiempo antes de añadir el iniciador de la reacción y registrar la actividad.

7.6.2.3. *Medida del complejo IV (Citocromo c oxidasa)*

La citocromo c oxidasa es la última enzima de la cadena de transporte de electrones, midiendo su actividad se determinó la funcionalidad del sistema OXPHOS en la línea celular. Para ello, se midió la reacción de oxidación del citocromo c en homogenados celulares.

Primero, se preparó una disolución de citocromo c al 1 % (10 mg/ml) reducido en tampón fosfato (10 mM pH 7,4). Se añadió ditionito de sodio, agente reductor, para reducir totalmente el citocromo c, y se agitó e incubó en hielo durante 1 hora.

A continuación, se prepararon las cubetas con 100 µl de tampón fosfato 100 mM pH 7, 100 µl de BSA (en EDTA 10 mM a pH 7,4) y 670 µl de agua destilada, y calentaron a 38 °C. Una vez atemperadas, se añadieron 100 µl de citocromo c e incubaron a 38 °C durante 2 minutos. Seguidamente, se realizó un vórtex a 30 µl de muestra y se añadieron a la cubeta. Se realizó la medida de la oxidación del citocromo c como disminución de la absorbancia a $\lambda=550$ nm durante 2 minutos.

Cada muestra se midió por triplicado. La fórmula que se usó para calcular la actividad citocromo oxidasa específica (Unidades: nmol/(min*mg prot)) fue la siguiente (se debe tener en cuenta que para obtener la actividad específica se necesitó medir previamente la concentración de proteína que hay en cada muestra mediante el método de Bradford):

$$\frac{\Delta Abs(550nm)/min * 1000 * Volumen total (ml)}{\epsilon (= 21 \text{ ml/nmol} * cm) * Volumen muestra (ml) * [prot] \text{ mg/ml} * 1 \text{ cm}}$$

7.6.2.4. *Medida de la actividad citrato sintasa*

La citrato sintasa (CS) es una enzima que cataliza la reacción de condensación tipo aldólica del acetato, proveniente del acetyl-CoA, y del oxalacetato para formar citrato. La citrato sintasa se utilizó como marcador enzimático cuantitativo para la presencia de mitocondrias intactas.

Para determinar la actividad de la citrato sintasa, se midió el incremento de la absorbancia a $\lambda=412$ nm que se produce debido a la formación de la forma aniónica del DTNB tras añadir 250 µM de oxalacetato. Primero, se prepararon las cubetas con 100 µl de tampón Tris-HCl 750 mM pH 8, 100 µl de DTNB (0,4 mg/ml), 20 µl de Tritón X-100 al 5 %, 50 µl de Acetyl-CoA 8 mM (7 mg/ml), 650 µl de agua y 30 µl de muestra, que se preincubaron durante 2 minutos a 30 °C. A continuación, se añadieron 50 µl de oxalacetato 10 mM (1,32 mg/ml) y se midió la absorbancia durante 2 minutos.

Cada muestra se midió por triplicado. A continuación, se detalló el cálculo de la actividad específica de la citrato sintasa (Unidades: nmol/(min*mg prot)).

$$\varepsilon (= 13,8 \text{ ml/nmol} * \text{cm}) * \text{Volumen muestra (ml)} * [\text{prot}] \text{ mg/ml} * 1 \text{ cm}$$

$$\frac{\Delta \text{Abs}(412\text{nm})/\text{min} * 1000 * \text{Volumen total (ml)}}{\varepsilon}$$

7.6.3. Medida de actividades enzimáticas de los complejos en gel

Para la medida de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria en gel, se separaron los complejos mediante electroforesis no desnaturizante Blue Native-PAGE.

Tras la electroforesis, para la detección del complejo I el gel se incubó a temperatura ambiente un mínimo de 20 minutos en la solución de detección que se describe en la Tabla 7.25. Cuando una banda proporcional a la actividad de CI apareció en el gel, se realizó una captura en el aparato Amersham Imager 600 de GE Healthcare. A continuación, se realizaron lavados con agua ultrapura Milli-Q®, con el fin de eliminar la solución de detección del complejo I.

En el mismo gel nativo Blue Native-PAGE (o en uno nuevo), para la detección del complejo IV, se requirió de una incubación previa de media hora con el tampón fosfato TPK 50 mM, pH 7,2. Tras la incubación, se añadió la solución de detección que se recoge en la Tabla 7.25 y dejó actuar durante toda la noche. Cuando el CIV se pudo observar, se capturó una imagen con Amersham Imager 600.

Se paró la reacción cuando se eliminó la solución y se fijó el gel con 10 % de ácido acético y 40 % de metanol.

Tabla 7.25. Soluciones de detección para medir las actividades de CI y CIV.

CI	Nitro Blue tetrazolium chloride (NTB) (2,5 mg/ml) + NADH (0,1 mg/ml) en Tris-HCl 5 mM, pH 7,4
CIV	0,05 % de Diaminobenzidina (DAB) + Citocromo c (5 mM) en TPK 50 mM, pH 7,2

7.6.4. Consumo de oxígeno en electrodo de alta resolución en células intactas

El consumo de oxígeno se midió en un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®), asociado a la herramienta informática *DatLab* utilizado para la adquisición y análisis de datos o en un sistema *Oxytherm+* de Hansatech Instruments. En ambos casos se introdujeron las células en una cámara cerrada del aparato y se midió la velocidad del consumo de oxígeno (Chance & Williams, 1955).

Para las medidas en un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®), se partió de células en crecimiento exponencial que se tripsinizaron, se centrifugaron, se contaron y se resuspendieron a 1

millón de células por mililitro de medio DMEM bajo en glucosa (ThermoFisher Scientific). Se introdujeron 2 ml en la cámara de medida, se cerró la cámara, y se midió la caída de la concentración de oxígeno con el tiempo, se obtuvo así la denominada respiración endógena o basal. Las unidades en las que se obtuvo el consumo de oxígeno fueron de pmol de $O_2/s \times 10^6$ células.

Para analizar el efecto de fármacos en el consumo de oxígeno, se añadieron concentraciones crecientes a la cámara de medida. Finalmente, se añadió KCN para obtener la mediada del consumo de oxígeno residual no debido a cadena respiratoria.

Se realizaron al menos tres medidas independientes por línea celular, alternando las dos cámaras de medida del aparato.

Cuando se utilizó el sistema *Oxytherm+* de Hansatech Instruments. Se recogieron las células en crecimiento exponencial y se contaron. El pellet celular obtenido se diluyó de tal forma que en 500 μ l (volumen introducido en la cámara de medida) hubiera 1,3 millones de células. Después de introducir la muestra, se cerró la cámara, y una vez que se estabilizó el flujo registró la respiración endógena.

Seguidamente, se añadió KCN obtener la medida del consumo de oxígeno residual no debido a cadena respiratoria.

7.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando *StatView 6.0*. Los datos se expresan como la media \pm SD (desviación estándar). El test Mann-Whitney *non-parametric* se utilizó para evaluar la significación estadística entre grupos experimentales, en los capítulos I y III. Los valores *p value* menores de 0,05 (* $p < 0,05$) se consideraron estadísticamente significativos.

Además, también se realizó un test estadístico ANOVA t-test (*unpaired*) para analizar los datos del capítulo II, considerándose significativos los valores de *p* menores de 0,05 o de 0,001 (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- al Madhoun, A., Alnaser, F., Melhem, M., Nizam, R., Al-Dabbous, T., & Al-Mulla, F. (2019). Ketogenic diet attenuates cerebellar atrophy progression in a subject with a biallelic variant at the ATAD3A locus. *The Application of Clinical Genetics*, 12, 79–86. <https://doi.org/10.2147/TACG.S194204>
- Alston, C. L., Rocha, M. C., Lax, N. Z., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2017). The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of Pathology*, 241(2), 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- Al-Zubeidi, D., Thangarajh, M., Pathak, S., Cai, C., Schlaggar, B. L., Storch, G. A., Grange, D. K., & Watson Jr., M. E. (2014). Fatal Human Herpesvirus 6–Associated Encephalitis in Two Boys With Underlying POLG Mitochondrial Disorders. *Pediatric Neurology*, 51(3), 448–452. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.04.006>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrews, B., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2013). Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 18934–18939. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1319247110>
- Arnaudo, E., Shanske, S., DiMauro, S., Schon, E. A., Moraes, C. T., Schon, E. A., & Dalakas, M. (1991). Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *The Lancet*, 337(8740), 508–510. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91294-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91294-5)
- Atanassova, N., Fusté, J. M., Wanrooij, S., Macao, B., Goffart, S., Bäckström, S., Farge, G., Khvorostov, I., Larsson, N.-G., Spelbrink, J. N., & Falkenberg, M. (2011). Sequence-specific stalling of DNA polymerase γ and the effects of mutations causing progressive ophthalmoplegia[†]. *Human Molecular Genetics*, 20(6), 1212–1223. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq565>
- Attardi, G., & Schatz, G. (1988). Biogenesis of Mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*, 4(1), 289–331. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001445>

- Azova, S., Rajabi, F., Modi, B. P., Mansfield, L., Jonas, M. M., Drobysheva, A., Boyd, T. K., Wassner, A. J., & Smith, J. R. (2021). Graves' disease in a five-month-old boy with an unusual treatment course. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 34(3), 401–406. <https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0549>
- Baide-Mairena, H., Gaudó, P., Marti-Sánchez, L., Emperador, S., Sánchez-Montanez, A., Alonso-Luengo, O., Correa, M., Grau, A. M., Ortigoza-Escobar, J. D., Artuch, R., Vázquez, E., del Toro, M., Garrido-Pérez, N., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Bayona-Bafaluy, M. P., & Pérez-Dueñas, B. (2019). Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF6 cause isolated bilateral striatal necrosis and progressive dystonia in childhood. *Molecular Genetics and Metabolism*, 126(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2019.01.001>
- Bailey, C. M., Kasiviswanathan, R., Copeland, W. C., & Anderson, K. S. (2009). R964C mutation of DNA polymerase gamma imparts increased stavudine toxicity by decreasing nucleoside analog discrimination and impairing polymerase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2610–2612. <https://doi.org/10.1128/AAC.01659-08>
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., & Sazanov, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11871>
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Silva, A. da, Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Castro, L. G., ... Zhang, J. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Batlloiri, M., Molero-Luis, M., Ormazabal, A., Montero, R., Sierra, C., Ribes, A., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., O'Callaghan, M., Pias, L., Nascimento, A., Palau, Francesc., Armstrong, J., Yubero, D., Ortigoza-Escobar, J. D., García-Cazorla, A., & Artuch, R. (2018). Cerebrospinal fluid monoamines, pterins, and folate in patients with mitochondrial diseases: systematic review and hospital experience. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(6), 1147–1158. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0224-x>
- Baudier, J. (2018). ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria–endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biological Reviews*, 93(2), 827–844. <https://doi.org/10.1111/brv.12373>
- Bayona-Bafaluy, M. P., Iglesias, E., López-Gallardo, E., Emperador, S., Pacheu-Grau, D., Labarta, L., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2020). Genetic aspects of the oxidative phosphorylation

- dysfunction in dilated cardiomyopathy. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108334>
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2005). Calcium and mitochondria: Mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1742, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.015>
- Bianciardi, L., Imperatore, V., Fernandez-Vizarra, E., Lopomo, A., Falabella, M., Furini, S., Galluzzi, P., Grosso, S., Zeviani, M., Renieri, A., Mari, F., & Frullanti, E. (2016). Exome sequencing coupled with mRNA analysis identifies NDUFAF6 as a Leigh gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 119(3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.09.001>
- Bieniossek, C., Schalch, T., Bumann, M., Meister, M., Meier, R., & Baumann, U. (2006). *The molecular architecture of the metalloprotease FtsH*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600031103
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D., & Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708444200>
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L., & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755–767. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.05.034>
- Callegari, S., Richter, F., Chojnacka, K., Jans, D. C., Lorenzi, I., Pacheu-Grau, D., Jakobs, S., Lenz, C., Urlaub, H., Dudek, J., Chacinska, A., & Rehling, P. (2016). TIM29 is a subunit of the human carrier translocase required for protein transport. *FEBS Letters*, 590(23), 4147–4158. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12450>
- Camacho-Carvajal, M. M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., & Schamel, W. W. A. (2004). Two-dimensional Blue Native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: A proteomics approach. *Molecular and Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.T300010-MCP200>
- Catania, A., Ardisson, A., Verrigni, D., Legati, A., Reyes, A., Lamantea, E., Dlodato, D., Tonduti, D., Imperatore, V., Pinto, A. M., Moroni, I., Bertini, E., Robinson, A., Carrozzo, R., Zeviani, M., & Ghezzi, D. (2018). Compound heterozygous missense and deep intronic variants in NDUFAF6 unraveled by exome sequencing and mRNA analysis. *Journal of Human Genetics*, 63(5), 563–568. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0423-1>
- Cavalier-Smith, T. (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature*, 326(6111), 332–333. <https://doi.org/10.1038/326332a0>

- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. *Journal of Biological Chemistry*, 217(1), 383–394. <http://www.jbc.org/content/217/1/383.short>
- Cheetham, S. W., Faulkner, G. J., & Dinger, M. E. (2020). Overcoming challenges and dogmas to understand the functions of pseudogenes. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Issue 3, pp. 191–201). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0196-1>
- Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2012). Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9–10), 1035–1054. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2011.11.009>
- Cogliati, S., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>
- Cohen, B. H., & Naviaux, R. K. (2010). The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods*, 51(4), 364–373. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2010.05.008>
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., & Deléage, G. (2000). NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3), 147–150. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01540-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01540-6)
- Cooper, H. M., Yang, Y., Ylikallio, E., Khairullin, R., Woldegebriel, R., Lin, K.-L., Euro, L., Palin, E., Wolf, A., Trokovic, R., Isohanni, P., Kaakkola, S., Auranen, M., Lönnqvist, T., Wanrooij, S., & Tynismaa, H. (2017). ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Human Molecular Genetics*, 26(8), 1432–1443. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx042>
- Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18(1), 257–275. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>
- Desai, R., Frazier, A. E., Durigon, R., Patel, H., Jones, A. W., Rosa, I. D., Lake, N. J., Compton, A. G., Mountford, H. S., Tucker, E. J., Mitchell, A. L. R., Jackson, D., Sesay, A., di Re, M., van den Heuvel, L. P., Burke, D., Francis, D., Lunke, S., McGillivray, G., ... Spinazzola, A. (2017). ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awx094>

- Dimmock, D., Tang, L.-Y., Schmitt, E. S., & Wong, L.-J. C. (2010). Quantitative Evaluation of the Mitochondrial DNA Depletion Syndrome. *Clinical Chemistry*, 56(7), 1119–1127. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.141549>
- Distelmaier, F., Koopman, W. J. H., van den Heuvel, L. P., Rodenburg, R. J., Mayatepek, E., Willems, P. H. G. M., & Smeitink, J. A. M. (2009). Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*, 132(4), 833–842. <https://doi.org/10.1093/brain/awp058>
- Emperador, S., López-Gallardo, E., Hernández-Ainsa, C., Habbane, M., Montoya, J., Bayona-Bafaluy, M. P., & Ruiz-Pesini, E. (2019). Ketogenic treatment reduces the percentage of a LHON heteroplasmic mutation and increases mtDNA amount of a LHON homoplasmic mutation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1128-z>
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 533–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105031>
- Erzberger, J. P., & Berger, J. M. (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101933>
- Fang, F., Liu, Z., Fang, H., Wu, J., Shen, D., Sun, S., Ding, C., Han, T., Wu, Y., Lv, J., Yang, L., Li, S., Lv, J., & Shen, Y. (2017). The clinical and genetic characteristics in children with mitochondrial disease in China. *Science China Life Sciences*, 60(7), 746–757. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9080-y>
- Fang, H. Y., Chang, C. L., Hsu, S. H., Huang, C. Y., Chiang, S. F., Chiou, S. H., Huang, C. H., Hsiao, Y. T., Lin, T. Y., Chiang, I. P., Hsu, W. H., Sugano, S., Chen, C. Y., Lin, C. Y., Ko, W. J., & Chow, K. C. (2010). ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.062034>
- Fernandez-Vizarra, E., Fernandez-Silva, P., & Enríquez, J. (2006). Isolation of Mitochondria from Mammalian Tissues and Cultured Cells. In *Cell Biology, Four-Volume Set* (Vol. 2, pp. 69–77). <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50082-4>
- Fernández-Vizarra, E., López-Calcerrada, S., Formosa, L. E., Pérez-Pérez, R., Ding, S., Fearnley, I. M., Arenas, J., Martín, M. A., Zeviani, M., Ryan, M. T., & Ugalde, C. (2021). SILAC-based complexome profiling dissects the structural organization of the human respiratory supercomplexes in SCAFIKO cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1862(7). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148414>

- Fernandez-Vizarra, E., & Zeviani, M. (2020). Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13995>
- Filigrana, R., Mennuni, M., Alsina, D., & Larsson, N. G. (2020). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? In *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14021>
- Finsterer, J. (2004). Mitochondriopathies. *European Journal of Neurology*, 11(3), 163–186. <https://doi.org/10.1046/j.1351-5101.2003.00728.x>
- Finsterer, Josef. (2008). Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatric Neurology*, 39(4), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.013>
- Formosa, L. E., Dibley, M. G., Stroud, D. A., & Ryan, M. T. (2018). Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 76, 154–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.011>
- Frazier, A. E., Compton, A. G., Kishita, Y., Hock, D. H., Welch, A. E., Amarasekera, S. S. C., Rius, R., Formosa, L. E., Imai-Okazaki, A., Francis, D., Wang, M., Lake, N. J., Tregoning, S., Jabbari, J. S., Lucattini, A., Nitta, K. R., Ohtake, A., Murayama, K., Amor, D. J., ... Thorburn, D. R. (2021). Fatal Perinatal Mitochondrial Cardiac Failure Caused by Recurrent De Novo Duplications in the ATAD3 Locus. *Med*. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.06.004>
- Frickey, T., & Lupas, A. N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *Journal of Structural Biology*, 146(1–2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.020>
- Garin-Muga, A., Odriozola, L., Martínez-Val, A., del Toro, N., Martínez, R., Molina, M., Cantero, L., Rivera, R., Garrido, N., Dominguez, F., Sanchez Del Pino, M. M., Vizcaíno, J. A., Corrales, F. J., & Segura, V. (2016). Detection of Missing Proteins Using the PRIDE Database as a Source of Mass Spectrometry Evidence. *Journal of Proteome Research*, 15(11), 4101–4115. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00437>
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M., & Spelbrink, J. N. (2002). Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4), 1583–1596. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0399>
- Gerhold, J. M., Cansiz-Arda, S., Lohmus, M., Engberg, O., Reyes, A., van Rennes, H., Sanz, A., Holt, I. J., Cooper, H. M., & Spelbrink, J. N. (2015). Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep15292>

- Gibaud, M., Pauvert, O., Gueden, S., Durigneux, J., & Van Bogaert, P. (2019). Opsoclonus in a child with neuroborreliosis: Case report and review of the literature. *Archives de Pédiatrie*, 26(2), 118–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcped.2018.11.013>
- Gilquin, B., Cannon, B. R., Hubstenberger, A., Moulouel, B., Falk, E., Merle, N., Assard, N., Kieffer, S., Rousseau, D., Wilder, P. T., Weber, D. J., & Baudier, J. (2010). The Calcium-Dependent Interaction between S100B and the Mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the Role of This Complex in the Cytoplasmic Processing of ATAD3A. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01468-09>
- Gilquin, B., Taillebourg, E., Cherradi, N., Hubstenberger, A., Gay, O., Merle, N., Assard, N., Fauvarque, M.-O., Tomohiro, S., Kuge, O., & Baudier, J. (2010). The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(8), 1984–1996. <https://doi.org/10.1128/MCB.00007-10>
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., & Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 1817–1827. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2009.04.010>
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H. J., Arnold, S., Brandt, U., & Nijtmans, L. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*, 25(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.002>
- Gunning, A. C., Strucinska, K., Muñoz Oreja, M., Parrish, A., Caswell, R., Stals, K. L., Durigon, R., Durlacher-Betzer, K., Cunningham, M. H., Grochowski, C. M., Baptista, J., Tysoe, C., Baple, E., Lahiri, N., Homfray, T., Scurr, I., Armstrong, C., Dean, J., Fernandez Pelayo, U., ... Ellard, S. (2020). Recurrent De Novo NAHR Reciprocal Duplications in the ATAD3 Gene Cluster Cause a Neurogenetic Trait with Perturbed Cholesterol and Mitochondrial Metabolism. *American Journal of Human Genetics*, 106(2), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.01.007>
- Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(2), 107–141. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)

- Hagiya, H., Miyawaki, K., Yamamoto, N., Yoshida, H., Kitagawa, A., Asaoka, T., Eguchi, H., Akeda, Y., & Tomono, K. (2017). Ceftriaxone-induced Neurotoxicity in a Patient after Pancreas-Kidney Transplantation. *Internal Medicine*, 56(22), 3103–3107. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8774-16>
- Hanson, P. I., & Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: Have engine, will work. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1684>
- Harel, T., Yoon, W. H., Garone, C., Gu, S., Coban-Akdemir, Z., Eldomery, M. K., Posey, J. E., Jhangiani, S. N., Rosenfeld, J. A., Cho, M. T., Fox, S., Withers, M., Brooks, S. M., Chiang, T., Duraine, L., Erdin, S., Yuan, B., Shao, Y., Moussallem, E., ... Lupski, J. R. (2016). Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *American Journal of Human Genetics*, 99(4), 831–845. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.007>
- Hartmannová, H., Piherová, L., Tauchmannová, K., Kidd, K., Acott, P. D., Crocker, J. F. S., Oussedik, Y., Mallet, M., Hodaňová, K., Stránecký, V., Přistoupilová, A., Barešová, V., Jedličková, I., Živná, M., Sovová, J., Hůlková, H., Robins, V., Vrbachý, M., Pecina, P., ... Kmoch, S. (2016). Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFAF6. *Human Molecular Genetics*, 25(18), 4062–4079. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw245>
- Haschke Ph.D., R. H., & Fink M.D., B. R. (1975). Lidocaine Effects on Brain Mitochondrial Metabolism in Vitro. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 42(6), 737–739.
- He, J., Mao, C. C., Reyes, A., Sembongi, H., di Re, M., Granycome, C., Clippingdale, A. B., Fearnley, I. M., Harbour, M., Robinson, A. J., Reichelt, S., Spelbrink, J. N., Walker, J. E., & Holt, I. J. (2007). The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609158>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 467–481. <https://doi.org/10.1042/EBC20170114>

- Hoffmann, M., Bellance, N., Rossignol, R., Koopman, W. J. H., Willems, P. H. G. M., Mayatepek, E., Bossinger, O., & Distelmaier, F. (2009). *C. elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. *PloS One*, 4(10), e7644–e7644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007644>
- Hofhaus, G., Weiss, H., & Leonard, K. (1991). Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Journal of Molecular Biology*, 221(3), 1027–1043. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80190-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80190-6)
- Hofmann, K., & Stoffel, W. (1993). *Tmbase A Database of Membrane Spanning Protein Segments*.
- Holt, I. J., He, J., Mao, C.-C., Boyd-Kirkup, J. D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A., & Spelbrink, J. N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: Organizing an independently minded genome. *Mitochondrion*, 7(5), 311–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.06.004>
- Issop, L., Fan, J., Lee, S., Rone, M. B., Basu, K., Mui, J., & Papadopoulos, V. (2015). Mitochondria-Associated membrane formation in hormone-stimulated leydig cell steroidogenesis: Role of ATAD3. *Endocrinology*, 156(1), 334–345. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1503>
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., & Jap, B. K. (1998). Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *Science*, 281(5373), 64 LP – 71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>
- Jain, S., Showman, A. C., & Jewett, M. W. (2015). Molecular Dissection of a *Borrelia burgdorferi* *In Vivo* Essential Purine Transport System. *Infection and Immunity*, 83(6), 2224 LP – 2233. <https://doi.org/10.1128/IAI.02859-14>
- Johnstone, T., Wang, J., Ross, D., Balanda, N., Huang, Y., Godfrey, R., Groden, C., Barton, B. R., Gahl, W., Toro, C., & Malicdan, M. C. v. (2020). Biallelic variants in two complex I genes cause abnormal splicing defects in probands with mild Leigh syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.008>
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kasamatsu, H., & Vinograd, J. (1974). Replication of Circular DNA in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, 43(1), 695–719. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.43.070174.003403>
- Kasiviswanathan, R., Longley, M. J., Chan, S. S. L., & Copeland, W. C. (2009). Disease mutations in the human mitochondrial DNA polymerase thumb subdomain impart severe defects in mitochondrial DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19501–19510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011940>
- Kim, K. B., Kim, S. M., Park, W., Kim, J. S., Kwon, S. K., & Kim, H.-Y. (2012). Ceftioxone-induced neurotoxicity: case report, pharmacokinetic considerations, and literature review. *Journal of Korean Medical Science*, 27(9), 1120–1123. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.9.1120>
- Kohda, M., Tokuzawa, Y., Kishita, Y., Nyuzuki, H., Moriyama, Y., Mizuno, Y., Hirata, T., Yatsuka, Y., Yamashita-Sugahara, Y., Nakachi, Y., Kato, H., Okuda, A., Tamaru, S., Bornha, N. N., Banshoya, K., Aigaki, T., Sato-Miyata, Y., Ohnuma, K., Suzuki, T., ... Okazaki, Y. (2016). A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genetics*, 12(1), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005679>
- Koppen, M., Metodiev, M. D., Casari, G., Rugarli, E. I., & Langer, T. (2007). Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2), 758–767. <https://doi.org/10.1128/MCB.01470-06>
- Kress, W., Mutschler, H., & Weber-Ban, E. (2007). Assembly Pathway of an AAA+ Protein: Tracking ClpA and ClpAP Complex Formation in Real Time. *Biochemistry*, 46(21). <https://doi.org/10.1021/bi602616t>
- Kuo, S. H. (2019). Ataxia. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 25, Issue 4, pp. 1036–1054). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000753>

- Lacroix, C., Kheloufi, F., Montastruc, F., Bennis, Y., Pizzoglio, V., & Micallef, J. (2019). Serious central nervous system side effects of cephalosporins: A national analysis of serious reports registered in the French Pharmacovigilance Database. *Journal of the Neurological Sciences*, 398, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.018>
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., & Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, 340(6140), 1567 LP – 1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
- Larsson, N.-G., & Clayton, D. A. (1995). Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 151–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001055>
- Lebre, A. S., Rio, M., Faivre d’Arcier, L., Vernerey, D., Landrieu, P., Slama, A., Jardel, C., Laforet, P., Rodriguez, D., Dorison, N., Galanaud, D., Chabrol, B., Paquis-Flucklinger, V., Grevent, D., Edvardson, S., Steffann, J., Funalot, B., Villeneuve, N., Valayannopoulos, V., ... Boddaert, N. (2011). A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *Journal of Medical Genetics*, 48(1), 16–23. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079624>
- Lee, H., & Yoon, Y. (2016). Mitochondrial fission and fusion. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1725–1735. <https://doi.org/10.1042/BST20160129>
- Lee, Y. S., Kennedy, W. D., & Yin, Y. W. (2009). Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell*, 139(2), 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.050>
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A., & Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2653 LP – 2662. <https://doi.org/10.1242/jcs.01134>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O’Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., ... Williams, A. L. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature19057>

- Leonard, J. V., & Schapira, A. H. V. (2000). Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *The Lancet*, 355(9200), 299–304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05225-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05225-3)
- Lewis, W., & Dalakas, M. C. (1995). Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Medicine*, 1(5), 417–422. <https://doi.org/10.1038/nm0595-417>
- Li, S., Lamarche, F., Charton, R., Delphin, C., Gires, O., Hubstenberger, A., Schlattner, U., & Rousseau, D. (2014). Expression analysis of ATAD3 isoforms in rodent and human cell lines and tissues. *Gene*, 535(1), 60–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.062>
- Li, S., & Rousseau, D. (2012). ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(1), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9424-5>
- Lim, S. E., & Copeland, W. C. (2001). Differential Incorporation and Removal of Antiviral Deoxynucleotides by Human DNA Polymerase γ . *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23616–23623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101114200>
- Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Roy, N. van, Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., van de Peer, Y., Tavernier, J., & Callewaert, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Complete Genomics Inc*, 120, 12. <https://doi.org/10.1038/ncomms5767>
- Lindsay, S. J., Xu, Y., Lisgo, S. N., Harkin, L. F., Copp, A. J., Gerrelli, D., Clowry, G. J., Talbot, A., Keogh, M. J., Coxhead, J., Santibanez-Koref, M., & Chinnery, P. F. (2016). HDBR Expression: A Unique Resource for Global and Individual Gene Expression Studies during Early Human Brain Development. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00086>
- Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, J. A. M., Trijbels, J. M. F., Janssen, A. J. M., Triepels, R. H., Sengers, R. C. A., & van den Heuvel, L. P. (2000). Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Human Mutation*, 15(2), 123–134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200002\)15:2<123::AID-HUMU1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200002)15:2<123::AID-HUMU1>3.0.CO;2-P)
- Lupas, A. N., & Martin, J. (2002). AAA proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), 746–753. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00388-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00388-3)
- Macarez, R., Bazin, S., Lagauche, D., Soullié, B., Giordano, P., May, F., & Guigon, B. (2006). Onset of Leber's hereditary optic neuropathy in association with borreliosis. *Journal Français d'ophtalmologie*, 28, 1095–1100.

- Marcuello, A., González-Alonso, J., Calbet, J. A. L., Damsgaard, R., López-Pérez, M. J., & Díez-Sánchez, C. (2005). Skeletal muscle mitochondrial DNA content in exercising humans. *Journal of Applied Physiology*, 99(4), 1372–1377. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00289.2005>
- Martin, K., Jackson, C. F., Levy, R. G., & Cooper, P. N. (2016). Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001903.pub3>
- McKenzie, M., Tucker, E., Compton, A., Lazarou, M., George, C., Thorburn, D., & Ryan, M. (2011). Mutations in the Gene Encoding C8orf38 Block Complex I Assembly by Inhibiting Production of the Mitochondria-Encoded Subunit ND1. *Journal of Molecular Biology*, 414, 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.012>
- Merle, N., Féraud, O., Gilquin, B., Hubstenberger, A., Kieffer-Jacquinet, S., Assard, N., Bennaceur-Griscelli, A., Honnorat, J., & Baudier, J. (2012). ATAD3B is a human embryonic stem cell specific mitochondrial protein, re-expressed in cancer cells, that functions as dominant negative for the ubiquitous ATAD3A. *Mitochondrion*, 12(4), 441–448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.05.005>
- Miller, J. M., & Enemark, E. J. (2016). Fundamental Characteristics of AAA+ Protein Family Structure and Function. In *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2016/9294307>
- Mitchell, A. L., Elson, J. L., Howell, N., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *Journal of Medical Genetics*, 43(2), 175–179. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032474>
- Mohamed, D., & Kamal, M. (2018). Enhanced HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of the co-administered drugs ceftriaxone sodium and lidocaine hydrochloride in human plasma following an intramuscular injection and application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 32(10), e4322. <https://doi.org/10.1002/bmc.4322>
- Monroe, N., & Hill, C. P. (2016). Meiotic Clade AAA ATPases: Protein Polymer Disassembly Machines. In *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.004>
- Montero, R., Yubero, D., Villarroja, J., Henares, D., Jou, C., Rodríguez, M. A., Ramos, F., Nascimento, A., Ortez, C. I., Campistol, J., Perez-Dueñas, B., O'Callaghan, M., Pineda, M., Garcia-Cazorla, A., Oferil, J. C., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., Emperador, S., Meznaric, M., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2016). GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148709>
- Montoya, J. (2010). *Del Genoma Mitocondrial a la Enfermedad*. Prensas Universitarias de Zaragoza.

- Montoya, J., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M. J., & Ruiz-Pesini, E. (2009). 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(5), 476–483. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.09.003>
- Montoya, J., López-gallardo, E., & Emperador, S. (2012). Enfermedades del ADN mitocondrial, Capítulo VII. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 129–154.
- Morten, K., Ashley, N., Wijburg, F., Hadzic, N., Parr, J., Jayawant, S., Adams, S., Bindoff, L., Bakker, H., Mieli-Vergani, G., Zeviani, M., & Poulton, J. (2007). Liver mtDNA content increases during development: A comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion*, 7, 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.09.001>
- Nass, M. M. K., & Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics: I. Fixation and Electron Staining Reactions. *Journal of Cell Biology*, 19(3), 593–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>
- Naviaux, R. K. (2000). Mitochondrial DNA disorders. *European Journal of Pediatrics*, 159 Suppl, S219–26. <https://doi.org/10.1007/pl00014407>
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. v. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.9.1.27>
- Nguyen, K. V, Sharief, F. S., Chan, S. S. L., Copeland, W. C., & Naviaux, R. K. (2006). Molecular diagnosis of Alpers syndrome. *Journal of Hepatology*, 45(1), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.12.026>
- Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental Gerontology*, 56, 175–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027>
- Nouws, J., Nijtmans, L. G. J., Smeitink, J. A., & Vogel, R. O. (2011). Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options. *Brain*, 135(1), 12–22. <https://doi.org/10.1093/brain/awr261>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>

- Ogura, T., & Wilkinson, A. J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(7), 575–597. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x>
- Ogura, Teru, Whiteheart, S. W., & Wilkinson, A. J. (2004). Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, 146(1–2), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.008>
- Okamoto, A., Tanaka, M., Sumi, C., Oku, K., Kusunoki, M., Nishi, K., Matsuo, Y., Takenaga, K., Shingu, K., & Hirota, K. (2016). The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. *BMC Anesthesiology*, 16(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12871-016-0273-3>
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S.-E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., & Mootha, V. K. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1(4), 188–211. <https://doi.org/10.1177/1.4.188>
- Papatheodorou, I., Moreno, P., Manning, J., Fuentes, A. M. P., George, N., Fexova, S., Fonseca, N. A., Füllgrabe, A., Green, M., Huang, N., Huerta, L., Iqbal, H., Jianu, M., Mohammed, S., Zhao, L., Jarnuczak, A. F., Jupp, S., Marioni, J., Meyer, K., ... Brazma, A. (2020). Expression Atlas update: From tissues to single cells. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D77–D83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz947>
- Pasquier, C., Promponas, V., Palaios, G., Hamodrakas, I., & Hamodrakas, S. (1999). *A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm* (Vol. 12, Issue 5). OUP. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00170724v2>
- Peeters-Scholte, C. M. P. C. D., Adama Van Scheltema, P. N., Klumper, F. J. C. M., Everwijn, S. M. P., Koopmans, M., Hoffer, M. J. V., Koopmann, T. T., Ruivenkamp, C. A. L., Steggerda, S. J., van der Knaap, M. S., & Santen, G. W. E. (2017). Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: Not just of scientific relevance. *Brain*, 140(11), e66. <https://doi.org/10.1093/brain/awx239>

- Perales-Clemente, E., Fernández-Vizarra, E., Acín-Pérez, R., Movilla, N., Bayona-Bafaluy, M. P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., & Enríquez, J. A. (2010). Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), 3038–3047. <https://doi.org/10.1128/MCB.00025-10>
- Peralta, S., Goffart, S., Williams, S. L., Diaz, F., Garcia, S., Nissanka, N., Area-Gomez, E., Pohjoismäki, J., & Moraes, C. T. (2018). ATAD3 controls mitochondrial cristae structure in mouse muscle, influencing mtDNA replication and cholesterol levels. *Journal of Cell Science*, 131(13), jcs217075. <https://doi.org/10.1242/jcs.217075>
- Peralta, S., González-Quintana, A., Ybarra, M., Delmiro, A., Pérez-Pérez, R., Docampo, J., Arenas, J., Blázquez, A., Ugalde, C., & Martín, M. A. (2019). Novel ATAD3A recessive mutation associated to fatal cerebellar hypoplasia with multiorgan involvement and mitochondrial structural abnormalities. *Molecular Genetics and Metabolism*, 128(4), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.10.012>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 9).
- Pfeffer, G., Horvath, R., Klopstock, T., Mootha, V. K., Suomalainen, A., Koene, S., Hirano, M., Zeviani, M., Bindoff, L. A., Yu-Wai-Man, P., Hanna, M., Carelli, V., McFarland, R., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Smeitink, J., & Chinnery, P. F. (2013). New treatments for mitochondrial disease - No time to drop our standards. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 474–481). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.129>
- Pitceathly, R. D. S., Keshavan, N., Rahman, J., & Rahman, S. (2021). Moving towards clinical trials for mitochondrial diseases. In *Journal of Inherited Metabolic Disease*. <https://doi.org/10.1002/jimd.12281>
- Rath, S., Sharma, R., Gupta, R., Ast, T., Chan, C., Durham, T. J., Goodman, R. P., Grabarek, Z., Haas, M. E., Hung, W. H. W., Joshi, P. R., Jourdain, A. A., Kim, S. H., Kotrys, A. V., Lam, S. S., McCoy, J. G., Meisel, J. D., Miranda, M., Panda, A., ... Mootha, V. K. (2021). MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>
- Robinson, B. H.-M. in E. (1996). Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects. In *Mitochondrial Biogenesis and Genetics Part B* (Vol. 264, pp. 454–464). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)64041-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)64041-5)

- Rodenburg, R. J. (2016). Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.02.012>
- Rodenburg, R. J. (2018). The functional genomics laboratory: functional validation of genetic variants. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0146-7>
- Ryan, M. T., Voos, W., & Pfanner, N. (2001). Chapter 11 Assaying protein import into mitochondria. *Methods in Cell Biology*, 65, 189–215. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)65012-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)65012-X)
- Sabatini, D. D., & Blobel, G. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions: II. Location of the polypeptides in rough microsomes. *Journal of Cell Biology*, 45(1), 146–157. <https://doi.org/10.1083/jcb.45.1.146>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225–IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Saneto, R. P., & Naviaux, R. K. (2010). Polymerase gamma disease through the ages. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(2), 163–174. <https://doi.org/10.1002/ddrr.105>
- Saxton, W. M., & Hollenbeck, P. J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, 125(9), 2095 LP – 2104. <https://doi.org/10.1242/jcs.053850>
- Schägger, H. (1995). Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods in Enzymology*, 260, 190–202. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)60137-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)60137-6)
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
- Schatz, G., Haslbrunner, E., & Tuppy, H. (1964). Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 15(2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(64\)90311-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(64)90311-0)
- Schon, K. R., Ratnaïke, T., van den Ameële, J., Horvath, R., & Chinnery, P. F. (2020). Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. In *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.06.009>

- Schwartz, R. M., & Dayhoff, M. O. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science*, 199(4327), 395–403. <https://doi.org/10.1126/science.202030>
- Serban, A. J., Breen, I. L., Bui, H. Q., Levitus, M., & Wachter, R. M. (2018). Assembly– disassembly is coupled to the ATPase cycle of tobacco Rubisco activase. *Journal of Biological Chemistry*, 293(50), 19451–19465. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005047>
- Shu, L., Hu, C., Xu, M., Yu, J., He, H., Lin, J., Sha, H., Lu, B., Engelender, S., Guan, M., & Song, Z. (2021). ATAD3B is a mitophagy receptor mediating clearance of oxidative stress-induced damaged mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, 40(8), 1–19. <https://doi.org/10.15252/emj.2020106283>
- Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 255–270. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>
- Smigrodzki, R., Parks, J., & Parker, W. D. (2004). High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson’s disease and aging. *Neurobiology of Aging*, 25(10), 1273–1281. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.02.020>
- Sperl, W., Wortmann, S., Feichtinger, R. G., & Mayr, J. A. (2020). The switch in the diagnosis of mitochondrial diseases from the classical “function first” to the NGS-based “genetics first” diagnostic era. *Journal of Mother and Child*.
- Stewart, J. D., Schoeler, S., Sitarz, K. S., Horvath, R., Hallmann, K., Pyle, A., Yu-Wai-Man, P., Taylor, R. W., Samuels, D. C., Kunz, W. S., & Chinnery, P. F. (2011). POLG mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(3), 321–325. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2010.11.012>
- Stock, D., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (1999). Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, 286(5445), 1700 LP – 1705. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1700>
- Stumpf, J. D., Saneto, R. P., & Copeland, W. C. (2013). Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a011395–a011395. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011395>
- Sugiura, A., McLelland, G.-L., Fon, E. A., & McBride, H. M. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO Journal*, 33(19), 2142–2156. <https://doi.org/10.15252/emj.201488104>

- Sutovsky, P., Neuber, E., & Schatten, G. (2002). Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 406–413. <https://doi.org/10.1002/mrd.10101>
- Tang, S., Wang, J., Lee, N.-C., Milone, M., Halberg, M. C., Schmitt, E. S., Craigen, W. J., Zhang, W., & Wong, L.-J. C. (2011). Mitochondrial DNA polymerase γ mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *Journal of Medical Genetics*, 48(10), 669 LP – 681. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100222>
- Thompson, K., Collier, J. J., Glasgow, R. I. C., Robertson, F. M., Pyle, A., Blakely, E. L., Alston, C. L., Oláhová, M., McFarland, R., & Taylor, R. W. (2020). Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. In *Journal of Inherited Metabolic Disease*. <https://doi.org/10.1002/jimd.12104>
- Thul, P. J., Akesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L. M., Bäckström, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., ... Lundberg, E. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science*, 356(6340). <https://doi.org/10.1126/science.aal3321>
- Triplett, J. D., Lawn, N. D., Chan, J., & Dunne, J. W. (2019). Cephalosporin-related neurotoxicity: Metabolic encephalopathy or non-convulsive status epilepticus? *Journal of Clinical Neuroscience*, 67, 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.05.035>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J.-J., & Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*, 28(3), 211–212. <https://doi.org/10.1038/90034>
- Van Goethem, G., Schwartz, M., Löfgren, A., Dermaut, B., Van Broeckhoven, C., & Vissing, J. (2003). Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 11(7), 547–549. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201002>
- Vinothkumar, K. R., Zhu, J., & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), 80–84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>

- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x>
- Wallace, D. (2005). Mitochondria and Cancer: Warburg Addressed. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70, 363–374. <https://doi.org/10.1101/sqb.2005.70.035>
- Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 297–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314>
- Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallström, B., Hopf, T., Zolg, D. P., Zecha, J., Asplund, A., Li, L.-H., Meng, C., Frejno, M., Schmidt, T., Schnatbaum, K., Wilhelm, M., Ponten, F., Uhlen, M., Gagneur, J., Hahne, H., & Kuster, B. (2019). A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular Systems Biology*, 15(2), e8503. <https://doi.org/10.15252/msb.20188503>
- Wang, H., Lemire, B. D., Cass, C. E., Weiner, J. H., Michalak, M., Penn, A. M. W., & Fliegel, L. (1996). Zidovudine and dideoxynucleosides deplete wild-type mitochondrial DNA levels and increase deleted mitochondrial DNA levels in cultured Kearns-Sayre syndrome fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1316(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(96\)00015-4](https://doi.org/10.1016/0925-4439(96)00015-4)
- Wang, Jian, & Shen, Y. (2014). When a “disease-causing mutation” is not a pathogenic variant. In *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.215947>
- Wang, Jun, Liu, H., Bertrand, R. E., Sarrion-Perdigones, A., Gonzalez, Y., Venken, K. J. T., & Chen, R. (2021). A novel statistical method for interpreting the pathogenicity of rare variants. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00948-3>
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., & Pfanner, N. (2004). The Protein Import Machinery of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14473–14476. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400003200>
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M., & Schägger, H. (2010). Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: Principles and practical hints. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(10), 2149–2161. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900526-MCP200>
- Wittig, I., Braun, H.-P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>

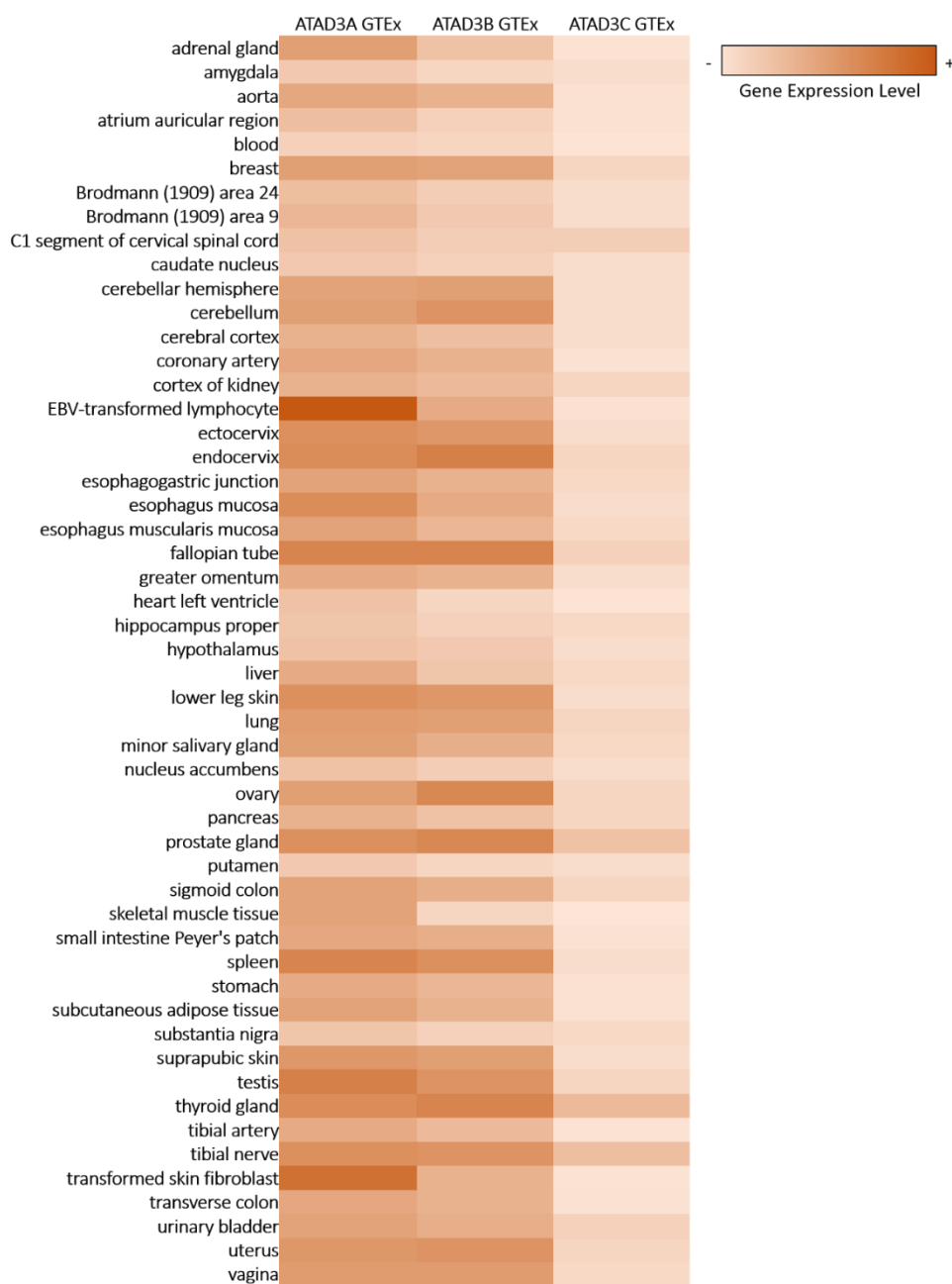
- Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., & Yates, J. R. (2003). A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nature Biotechnology*, 21(5), 532–538. <https://doi.org/10.1038/nbt819>
- Yamanaka, H., Gatanaga, H., Kosalaraksa, P., Matsuoka-Aizawa, S., Takahashi, T., Kimura, S., & Oka, S. (2007). Novel Mutation of Human DNA Polymerase γ Associated with Mitochondrial Toxicity Induced by Anti-HIV Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(10), 1419–1425. <https://doi.org/10.1086/513872>
- Yap, Z. Y., Park, Y. H., Wortmann, S. B., Gunning, A. C., Ezer, S., Lee, S., Duraine, L., Wilichowski, E., Wilson, K., Mayr, J. A., Wagner, M., Li, H., Kini, U., Black, E. D., Monaghan, K. G., Lupski, J. R., Ellard, S., Westphal, D. S., Harel, T., & Yoon, W. H. (2021). Functional interpretation of ATAD3A variants in neuro-mitochondrial phenotypes. *Genome Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00873-3>
- Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J. C., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., ... Flicek, P. (2020). Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D682–D688. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>
- Yueh-Luen Lee, A., Hsu, C.-H., & Wu, S.-H. (2004). *Functional Domains of Brevibacillus thermoruber Lon Protease for Oligomerization and DNA Binding ROLE OF N-TERMINAL AND SENSOR AND SUBSTRATE DISCRIMINATION DOMAINS**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403562200>
- Zhao, Y., Sun, X., Hu, D., Prosdocimo, D. A., Hoppel, C., Jain, M. K., Ramachandran, R., & Qi, X. (2019). ATAD3A oligomerization causes neurodegeneration by coupling mitochondrial fragmentation and bioenergetics defects. *Nature Communications*, 10(1), 1371. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09291-x>

ANEXOS

9. ANEXO I – EXTENSIÓN del estudio del gen *ATAD3C*

Tabla 9.1 Niveles de expresión de los genes *ATAD3A*, *ATAD3B* y *ATAD3C* en diferentes líneas celulares.

Los datos se obtuvieron de *Expression Atlas* (12 Abril 2021) (Papatheodorou et al., 2020).



ATAD3B-1	GTTTGCCAAGAACTCGCCCTGCACTCAGGCATGGACTACGCCATCATGACAGGCGGGGA	1139
ATAD3B-3	GTTTGCCAAGAACTCGCCCTGCACTCAGGCATGGACTACGCCATCATGACAGGCGGGGA *****	1001
ATAD3B-1	CGTGGCCCCCATGGGGCGGGAAGGCGTGACCGCCATGCACAAGCTCTTTGACTGGGCCAA	1199
ATAD3B-3	CGTGGCCCCCATGGGGCGGGAAGGCGTGACCGCCATGCACAAGCTCTTTGACTGGGCCAA *****	1061
ATAD3B-1	<u>TACCAGCCGGCGGGCCTCCTGCTCTTCATGGATGAAGCAGACGCCTTCCTTCGGAAGCG</u>	1259
ATAD3B-3	<u>TACCAGCCGGCGGGCCTCCTGCTCTTCATGGATGAAGCAGACGCCTTCCTTCGGAAGCG</u> *****	1121
ATAD3B-1	<u>AGCCACTGAGGAGATAAGCAAGGACCTCAGAGCCACACTGAACGCCTTCCTGTACCACAT</u>	1319
ATAD3B-3	<u>AGCCACTGAGGAGATAAGCAAGGACCTCAGAGCCACACTGAACGCCTTCCTGTACCACAT</u> *****	1181
ATAD3B-1	<u>GGGCCAACACAGCAACAAATTCATGCTGGTCCTGGCCAGCAATCTGCCTGAGCAGTTCGA</u>	1379
ATAD3B-3	<u>GGGCCAACACAGCAACAAATTCATGCTGGTCCTGGCCAGCAATCTGCCTGAGCAGTTCGA</u> *****	1241
ATAD3B-1	CTGTGCCATCAACAGCCGATTGACGTGATGGTCCACTTCGACCTGCCGCAGCAGGAGGA	1439
ATAD3B-3	CTGTGCCATCAACAGCCGATTGACGTGATGGTCCACTTCGACCTGCCGCAGCAGGAGGA *****	1301
ATAD3B-1	GCGGGAGCGCCTGGTGAGACTGCATTTTGACAAGTGTGTTCTTAAGCCGGCCACAGAAGG	1499
ATAD3B-3	GCGGGAGCGCCTGGTGAGACTGCATTTTGACAAGTGTGTTCTTAAGCCGGCCACAGAAGG *****	1361

Figura 9.1 Alineamiento de las isoformas 1 y 3 de ATAD3B. Se muestra una parte de la secuencia de cDNA alineada. La zona de unión de la sonda TaqMan (165 nt) se subraya en morado, común entre las dos isoformas. El *assay location* o punto medio de la secuencia donde se hibrida la sonda TaqMan de la isoforma 1 de ATAD3B, posición 1391 (incluyendo la zona 5'UTR, o 1275 de la secuencia codificante), que equivale a la posición 1137 de la isoforma 3 (de la secuencia codificante) se recuadra en gris.

ATAD3A:Q9NVI7-1	MSWLFGINKGPKGEGAGPPPLPPAQPGAEGGGDRGLGDRPAKDKWSNFDP TGL ERAAK	60
ATAD3A:Q9NVI7-2	MSWLFGINKGPKGEGAGPPPLPPAQPGAEGGGDRGLGDRPAKDKWSNFDP TGL ERAAK	60
ATAD3B:Q5T9A4-1	MSWLFGVNKGPKGEGAGPPPLPPAQPGAEGGGDRGLGDRPAKDKWSNFDP TGL ERAAK	60
ATAD3B:Q5T9A4-3	-----	0
ATAD3C:Q5T2N8	-----	0
ATAD3A:Q9NVI7-1	AARELEHSRYAKDALNLAQMQEQT L QLEQQSKLMRLEALSLLHTLVWAWSLCRAGAVQT	120
ATAD3A:Q9NVI7-2	AARELEHSRYAKDALNLAQMQEQT L QLEQQSKL -----	93
ATAD3B:Q5T9A4-1	AARELEHSRYAKEALNLAQMQEQT L QLEQQSKL -----	93
ATAD3B:Q5T9A4-3	-----MQLEALNLLHTLVWARSLCRAGAVQT	26
ATAD3C:Q5T2N8	-----	0
ATAD3A:Q9NVI7-1	QERLSGSASPEQVPAGECCALQEYEA AEVQLKSEQIRAQA EERRKT L SEETRQHQA RAYQ	180
ATAD3A:Q9NVI7-2	-----KEYEAAVEQLKSEQIRAQA EERRKT L SEETRQHQA RAYQ	132
ATAD3B:Q5T9A4-1	-----KEYEAAVEQLKSEQIRAQA EERRKT L SEETRQHQA RAYQ	132
ATAD3B:Q5T9A4-3	QERLSGSASPEQVPAGECCALQEYEA AEVQLKSEQIRAQA EERRKT L SEETRQHQA RAYQ	86
ATAD3C:Q5T2N8	-----	0
ATAD3A:Q9NVI7-1	QDKLARQR YEDQLKQQQL NNEENLRKQEE SVQKQEA MRRATVEREMELRHKNEMLRVEAE	240
ATAD3A:Q9NVI7-2	QDKLARQR YEDQLKQQQL NNEENLRKQEE SVQKQEA MRRATVEREMELRHKNEMLRVEAE	192
ATAD3B:Q5T9A4-1	QDKLARQR YEDQLKQQQL NNEENLRKQEE SVQKQEA MRRATVEREMELRHKNEMLRVETE	192
ATAD3B:Q5T9A4-3	QDKLARQR YEDQLKQQQL NNEENLRKQEE SVQKQEA MRRATVEREMELRHKNEMLRVETE	146
ATAD3C:Q5T2N8	-----MS-----KDALNLAQM-----QEQT L QLEQQ	21
	: . : : * :	
ATAD3A:Q9NVI7-1	ARARAKAERENADIIREQI ---RLKAAEHRTVLESIRTAGTLFGEGFRAFVT DWDKVTA	297
ATAD3A:Q9NVI7-2	ARARAKAERENADIIREQI ---RLKAAEHRTVLESIRTAGTLFGEGFRAFVT DWDKVTA	249
ATAD3B:Q5T9A4-1	ARARAKAERENADIIREQI ---RLKASEHRTVLESIRTAGTLFGEGFRAFVT DRD KVTA	249
ATAD3B:Q5T9A4-3	ARARAKAERENADIIREQI ---RLKASEHRTVLESIRTAGTLFGEGFRAFVT DRD KVTA	203
ATAD3C:Q5T2N8	S-----KLKQLVNEDLRKQEE SVQKHQTFLESIR AAGTLFGEGFRAFVT DRD KVTA	73
	: : : : * : . . : * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , *	
ATAD3A:Q9NVI7-1	TVAGLTLLAVGVYS AKNATLVAGR FIEARLGKPSLVRETSRITVLEALRHPIQ-VSRRL	356
ATAD3A:Q9NVI7-2	TVAGLTLLAVGVYS AKNATLVAGR FIEARLGKPSLVRETSRITVLEALRHPIQ-VSRRL	308
ATAD3B:Q5T9A4-1	TVAGLTLLAVGVYS AKNATAVTGR FIEARLGKPSLVRETSRITVLEALRHPIQ-VSRRL	308
ATAD3B:Q5T9A4-3	TVAGLTLLAVGVYS AKNATAVTGR FIEARLGKPSLVRETSRITVLEALRHPIQ-VSRRL	262
ATAD3C:Q5T2N8	TVAGLTLLAVGVYS AKNATAVTGR YIEARLGKPSLVRETSRITVLEALRHPIQ VSRRL	133
	***** * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , *	
ATAD3A:Q9NVI7-1	SRPQDALEGVVLSPSLEARVRDIATATRN TKKNRSLYRNILMYGPPGTGKT LFAKKLALH	416
ATAD3A:Q9NVI7-2	SRPQDALEGVVLSPSLEARVRDIATATRN TKKNRSLYRNILMYGPPGTGKT LFAKKLALH	368
ATAD3B:Q5T9A4-1	SRPQDVLEGVVLSPSLEARVRDIATATRN TKKNRG LYRHILLYGPPGTGKT LFAKKLALH	368
ATAD3B:Q5T9A4-3	SRPQDVLEGVVLSPSLEARVRDIATATRN TKKNRG LYRHILLYGPPGTGKT LFAKKLALH	322
ATAD3C:Q5T2N8	SRPQDVLEGVVLSPSLEARVRDIATMTRNI KKNRG LYRHILLYGPPGTGKT LFAKKLALH	193
	**** * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , *	
ATAD3A:Q9NVI7-1	SGMDYAIMTGDDVAPMGREGVTAMHKLF DWANTSRRGLL FVDEADAFLRK RATEKISED	476
ATAD3A:Q9NVI7-2	SGMDYAIMTGDDVAPMGREGVTAMHKLF DWANTSRRGLL FVDEADAFLRK RATEKISED	428
ATAD3B:Q5T9A4-1	SGMDYAIMTGDDVAPMGREGVTAMHKLF DWANTSRRGLL FMDEADAFLRK RATEEISKD	428
ATAD3B:Q5T9A4-3	SGMDYAIMTGDDVAPMGREGVTAMHKLF DWANTSRRGLL FMDEADAFLRK RATEEISKD	382
ATAD3C:Q5T2N8	SGMDYAIMTGDDVAPMGREGVTAMHKLF DWANTSRRGLL FVDEADAFLRK RATEKISED	253
	***** * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , * , *	

```

ATAD3A:Q9NVI7-1  LRATLNAFLYRTGQHSNKFMLVLASNOPEOFDWAINDRINEMVHFDLPQOEERERLVRMY  536
ATAD3A:Q9NVI7-2  LRATLNAFLYRTGQHSNKFMLVLASNQPEQFDWAINDRINEMVHFDLPQOEERERLVRMY  488
ATAD3B:Q5T9A4-1  LRATLNAFLYHMGQHSNKFMLVLASNLPQEQFDCAINSRIDVMVHFDLPQOEERERLVRMH  488
ATAD3B:Q5T9A4-3  LRATLNAFLYHMGQHSNKFMLVLASNLPQEQFDCAINSRIDVMVHFDLPQOEERERLVRMH  442
ATAD3C:Q5T2N8    LRATLNAFLYRTGQHSNKFMLVLASCHPEQFDWAINACIDVMVHFDLPQOEERARLVRMY  313
*****:*****:*** ***** ** *:***** ***** ***:

ATAD3A:Q9NVI7-1  FDKYVLKPATEGKQRLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASEDGV  596
ATAD3A:Q9NVI7-2  FDKYVLKPATEGKQRLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASEDGV  548
ATAD3B:Q5T9A4-1  FDNCVLKPATEGKRRLLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASKDGV  548
ATAD3B:Q5T9A4-3  FDNCVLKPATEGKRRLLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASKDGV  502
ATAD3C:Q5T2N8    LNEYVLKPATEGKRRLLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASKDGV  373
::: *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

ATAD3A:Q9NVI7-1  LTEAMMDTRVQDAVQQHQKMCWLKAEGPGRGDESPS-----  634
ATAD3A:Q9NVI7-2  LTEAMMDTRVQDAVQQHQKMCWLKAEGPGRGDESPS-----  586
ATAD3B:Q5T9A4-1  LTEAMMDACVQDAVQQYRQKMRWLKAEGPGRGVEHPLSGVQGETLTWSLATDPSYPCLA  608
ATAD3B:Q5T9A4-3  LTEAMMDACVQDAVQQYRQKMRWLKAEGPGRGVEHPLSGVQGETLTWSLATDPSYPCLA  562
ATAD3C:Q5T2N8    LTEAMMDACVQDFVQQHQMMRWLKERPGPEDEQPSS-----  411
*****:*** ***:*** ***:*** ***:*** ***:

ATAD3A:Q9NVI7-1  -----  634
ATAD3A:Q9NVI7-2  -----  586
ATAD3B:Q5T9A4-1  GPCTFRICSWMGTLCPGPLSPRMSCGGGRPF CPPGHPLL  648
ATAD3B:Q5T9A4-3  GPCTFRICSWMGTLCPGPLSPRMSCGGGRPF CPPGHPLL  602
ATAD3C:Q5T2N8    -----  411

```

Figura 9.2 Alineamiento de las secuencias de las proteínas ATAD3A (isoforma 1 y 2), ATAD3B (isoforma 1 y 3) y ATAD3C.

Tabla 9.2. Se recoge la leyenda correspondiente al alineamiento de las secuencias de las proteínas ATAD3.

	Secuencia	Isoforma	Posición (aa)
Dominio rico en prolinas	PPPLPPAQP	ATAD3A-1, ATAD3A-2 y ATAD3B-1	18-28
CC1 (NPS@, Network Protein Sequence Analysis)	LQLEQQSKLKEYEAAVEQLKSEQIRAQAEERRKLTSEETRQHQAQ	ATAD3A-2	86-131
	LQLEQQSKLKEYEAAVEQLKSEQIRAQAEERRKLTSEETRQHQAQ	ATAD3B-1	86-131
	NLAQMQEQLTQLEQQ SKLKQLVNEDLRKQEEVSQ	ATAD3C	7-40
CC2 (NPS)	EENLRKQEEVSQKQEAAMRRATVEREMELRHKNEMLRVEAEARARA KAERENADIIREQIRLKAAE	ATAD3A-2	153-217
	EENLRKQEEVSQKQEAAMRRATVEREMELRHKNEMLRVETEARARA KAERENADIIREQIRLK	ATAD3B-1	153-214
TM dominio transmembrana	VTATVAGLTLAVGVYSA	ATAD3A-2	247-264
	VTATVAGLTLAVGVYSA	ATAD3B-1	247-264

(TMpred y PRED-TMR)	CLAGPCTFRICSWMGTLCPGPLSP	ATAD3B-1	606-630
	VTATVAGLTLAVGVYSA	ATAD3C	71-88
<u>Dominio AAA+</u> <u>ATPasa</u>	ATAD3A-2		320-518
	ATAD3B-1		320-518
	ATAD3C		145-343
Walker A	GPPGTGKT	ATAD3A-2	352-360
		ATAD3B-1	352-360
		ATAD3C	178-185
Walker B	FVDEAD	ATAD3A-2	407-412
	FMDEAD	ATAD3B-1	407-412
	FVDEAD	ATAD3C	232-407
Arginina (posición 4)	R	ATAD3A-2 y ATAD3B-1	420
		ATAD3C	245
Segunda región de homología (SHR)	LASNQPEQFDWAINDR	ATAD3A-2	451-466
	LASNLPEQFDCAINSR	ATAD3B-1	451-466
	LASCHPEQFDWAINAC	ATAD3C	276-291
Dedo de arginina (R)	R	ATAD3A-2 y ATAD3B-1	466
Sensor 2	R	ATAD3A-2 y ATAD3B-1	528
		ATAD3C	353
Anticuerpo Anti-ATAD3B (Sigma)	KAERENADIIREQIRLKASEHRQTYLESIRTA	ATAD3B-1	198-229

HPA058968			
Mutaciones en ATAD3C en el paciente	<p>L: c.692T>C (p.Leu231Pro) EXÓN 8</p> <p>R: c.152+1 G>A (secuencia donante de splicing); DNA EXONintron: CCATCAGg>a; Entre exón 2 y exón 3</p>		

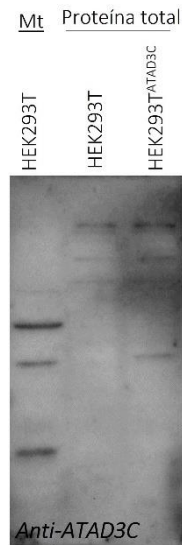


Figura 9.4 Imagen de la inmunodetección de la proteína ATAD3C en un enriquecido mitocondrial (mt) y en extracto de proteínas totales de las líneas HEK293T y HEK293T^{ATAD3C}. Las muestras se analizaron en geles SDS-PAGE, y se inmunodetectó con el anticuerpo anti-ATAD3C de Origene.

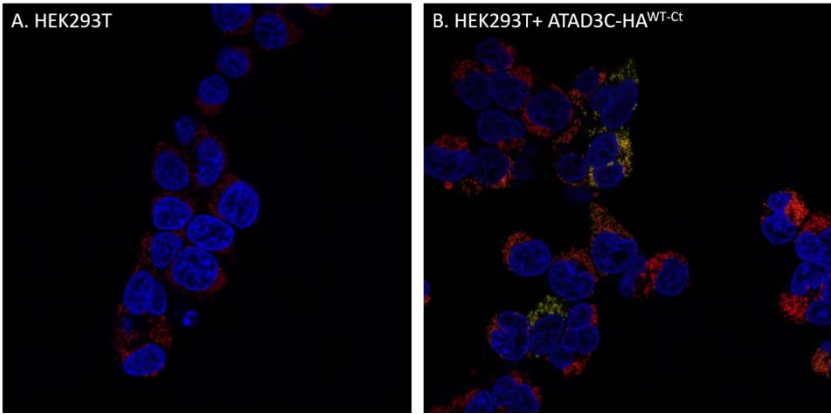


Figura 9.3 Imagen de inmunofluorescencia de las líneas celulares HEK293T (A.) y HEK293T^{ATAD3C-HA} (Ct) (B). La red mitocondrial se visualizó en rojo (anticuerpo anti-SDHA), los núcleos en azul (DAPI) y la proteína ATAD3C-HA en verde (anticuerpo anti-HA).

Isoforma 2 de ATAD3A:

[illegible]

Isoforma 1 de ATAD3B:

SPSLEARVRDIAIATRNTTKNRGLYRHILLY**GPPGTGKTL**
 -**HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH**---EEEEEEEE-----**HHH**
 α0 β1 α1
FAKKLALHSGMDYAIMTGGDVAPMGREGVTAMHKLFDWANTSRRGLLLFMDEAD**AFLRK**
HHHHHHHH---EEEEEE-----**HHHHHHHHHHHHHHHHHH**-----EEEEEE-----
 β2 α2 β3
ATEEISKDLRATLNAFLYHMGQHSNKFMLVLASNLP EQFDCAINS**R**IDVMVHFDLPQQEE
 -----**HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH**-----EEEEEEEE--**HHHHHHHHHH**---EEEE-**HHHHHHHH**
 α3 β4 α4 β5 α5
RERLVRLHFDNCVLPKATEGKRRLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSG**R**EIAQLAVSWQAT
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----**HHHHHHHHHHHH**-----**HHHHHHHHHHHHHHHHHH**
 α6 α7
AYASKDGVLTEAMMDACVQDAVQQYRQKMRWLKAEGPGRGVEHPLSGVQGETLTWSLAT
HHH-----**HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH**-----EEEEEE-----**HHHHHHHH**---
 α8
DPSYPCLAGPCTFRICSWMGTGLCPGPLSPRMSCGGGRPFPCPPGHPLL
 ----EEEE-----EEE-----EEEEEE-----EE-----

[illegible]

MSKDALNLAQ	MQEQTQLQLEQ	QSKLKQLVNE	DLRKQEESVQ	KHHQTFLESI	50
RAAGTLFGEG	FRAFVTD	<u>RDK</u>	<u>VTATVAGLTL</u>	LAVGVYSAKN	10
ARLGKPSLVR	ETSRITVLEA	LRHPIQQVSR	RLLSRPQDVL	EGVVLSPSLE	150
ARVRDIAIMT	RNIKKNRGLY	RHILLY	GPPG	TGKTLFAKKL	200
MTGGDVAPMG	REGVTAMHKL	FDWANTSRRG	LLL	FVDEADA	250
SEDLRATLNA	FLYRTGQHSN	KFMLILASCH	PEQFDWAINA	CIDVMVHFDL	300
PGQEERARLV	RMYLNEYVLK	PATEGKRRRLK	LAQFDYGRKC	LEIARLTEGM	350
SCRKIAQLAV	SWQATAYASK	DGVLTEAMMD	ACVQDFVQQH	QQMMRWLKGE	400
RPGPEDEQPS	S	411			

Tabla 9.3. Datos de la migración de las bandas detectadas en el gel SDS-PAGE revelado con el anticuerpo anti-HA en la Figura 5.16. Se representan los mm de la migración de cada banda y el logaritmo del peso molecular conocido para cada complejo. La recta obtenida se utilizó para calcular el peso molecular de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-HA. El marcador de pesos moleculares utilizado es *Precision Plus Protein™ Standards*.

Mr (Da)	Migración (mm)	logMr
250000	11	5,39794001
150000	19,5	5,17609126
100000	30	5
75000	38	4,87506126
50000	58	4,69897
37000	75,5	4,56820172

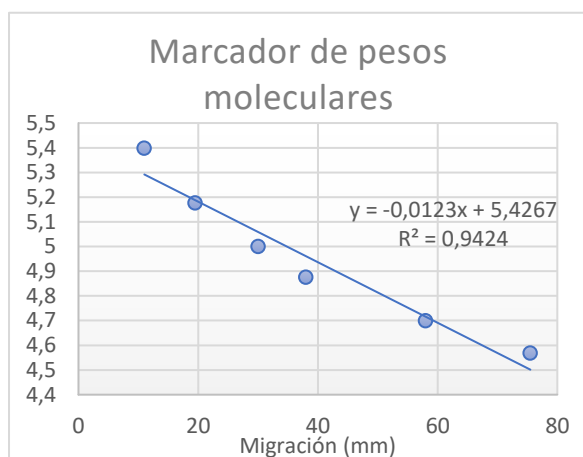


Tabla 9.4 . Péptidos comunes de las proteínas ATAD3C, ATAD3A y ATA3B analizados por LC-MS/MS. Se utilizó un método combinado de shotgun y proteómica dirigida y se identificaron péptidos comunes de las proteínas mediante las herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline* en las mitocondrias aisladas a partir de fibroblastos derivados del control de 3 años (C3), de la línea HEK293T y de HEK293T+ATAD3C-HA^{WT-Ct}. En verde se indican las isoformas a las que pertenecen los péptidos analizados. En granate se indican las muestras en las que se han detectado los péptidos.

	Secuencia del péptido	Isoforma de la proteína					Líneas celulares			
		ATAD3A-1	ATAD3A-2	ATAD3B-1	ATAD3B-3	ATAD3C	Fibroblastos C3	HEK293T (SDS-PAGE)	HEK293T (BN-PAGE)	HEK293T+ATAD3C-HA
ATAD3A y ATAD3C	YVLKPATEGK									
	DALNLAQMQEQLQLEQQSK									
	GLLLFVDEADAFLR									
	YVLKPATEGK									
	ATLNAFLYR									
	ISEDLR									
ATAD3B y ATAD3C	HILLYGPPGTGK									
	LLSRPQDVLEGVVLSPSLEAR									
	AFVTDRDK									
ATAD3B y ATAD3A	LKEYEAAVEQLK									
	LKEYEAAVEQLKSEQIR									
	DKWSNFDPTGLER									
	WSNFDPTGLER									
	GEGAGPPPPLPPAQPAGGEGGDR									
	GLGDRPAPK									
	KTLSEETR									
	TLSEETR									
	EYEAAVEQLK									
	HKNEMLR									
	QRYEDQLK									
	HPIQVSR									
	TAGTLFGEGFR									
	QQQLLNEENLR									
	ENADIIR									
	LTEGMSGR									
	QTVLESIR									
	DIAIATR									
	AQYQDKLAR									
	ATVEREMELR									
	KQEEVQKQEAMR									
	ITVLEALRHPIQVSR									
	YEDQLKQQQLNEENLR									
	AERENADIIR									
	QRYEDQLKQQQLNEENLR									
	WLKAEGPGR									
	AKAERENADIIR									
	ENADIIREQIR									
ATAD3C, ATAD3B y ATAD3A	NATAVTGR									
	LGKPSLVR									
	ITVLEALR									
	LAQFDYGR									
	LFDWANTSR									
	EGVTAMHK									
	LALHSGMDYAIMTGGDVAPMGR									
	VTATVAGLTLAVGVYSK									

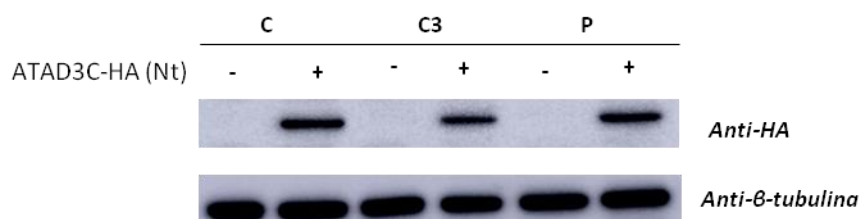
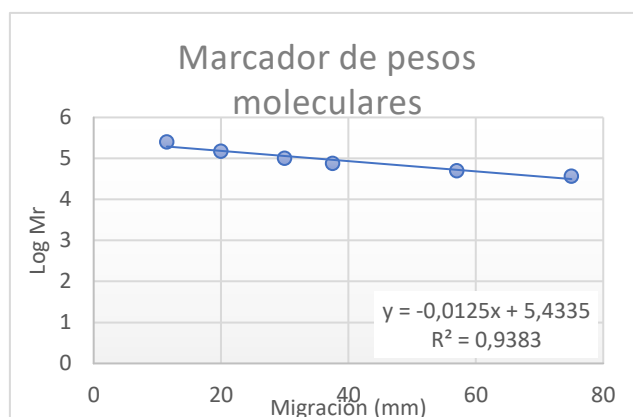


Figura 9.7 Imagen de la inmunodetección de -HA en los fibroblastos C, C3 y P sobreexpresando ATAD3C-HA (Nt). Se analizaron 30 µg de proteínas totales. La β-tubulina se utilizó como control de carga.

Tabla 9.5. Datos de la migración de las bandas detectadas en el gel SDS-PAGE revelado con el anticuerpo anti-HA y anti-ATAD3A (Abnova) en la Figura 5.23. Se representan los mm de la migración de cada banda y el logaritmo del peso molecular conocido para cada proteína del marcador. La recta obtenida se utilizó para calcular el peso molecular de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-HA (Figura 5.25) y anti-ATAD3A. El marcador de pesos moleculares utilizado es Precision Plus Protein™ Standards.

Tamaño Da	mm	logMr
250000	11,5	5,39794001
150000	20	5,17609126
100000	30	5
75000	37,5	4,87506126
50000	57	4,69897
37000	75	4,56820172



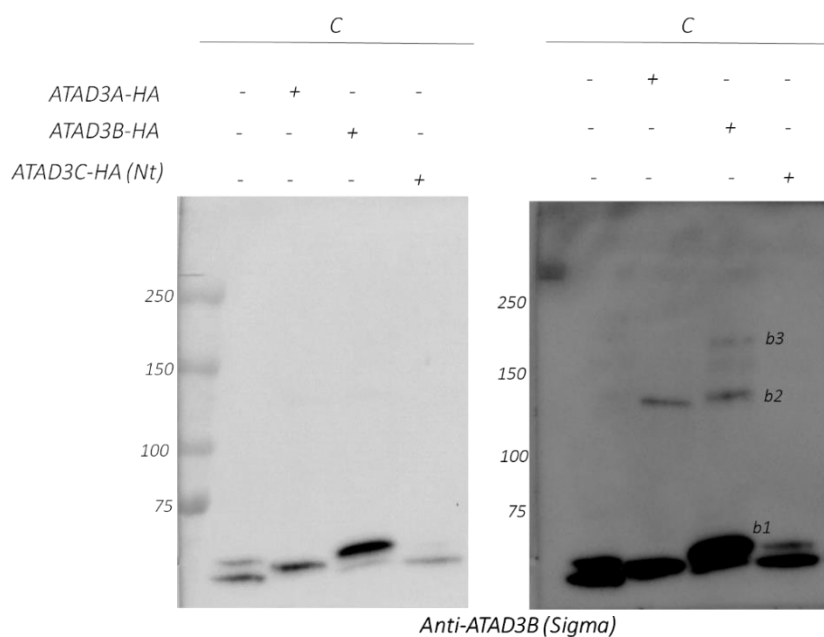


Figura 9.8 Imagen de la inmunodetección de los oligómeros de las proteínas ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C en extractos celulares de C, C^{ATAD3A-HA}, C^{ATAD3B-HA} y C^{ATAD3C-HA} mediante Western Blot. Se señalan las bandas b1, b2 y b3.

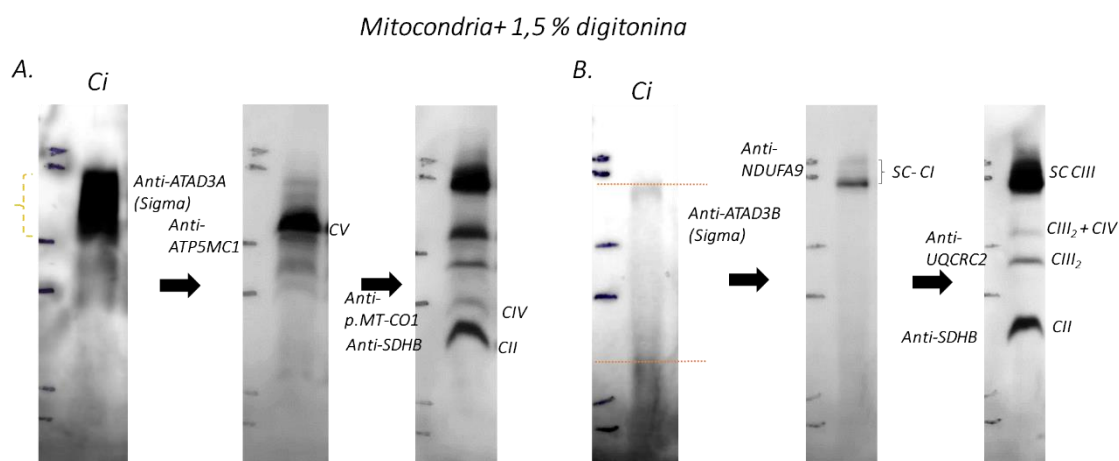
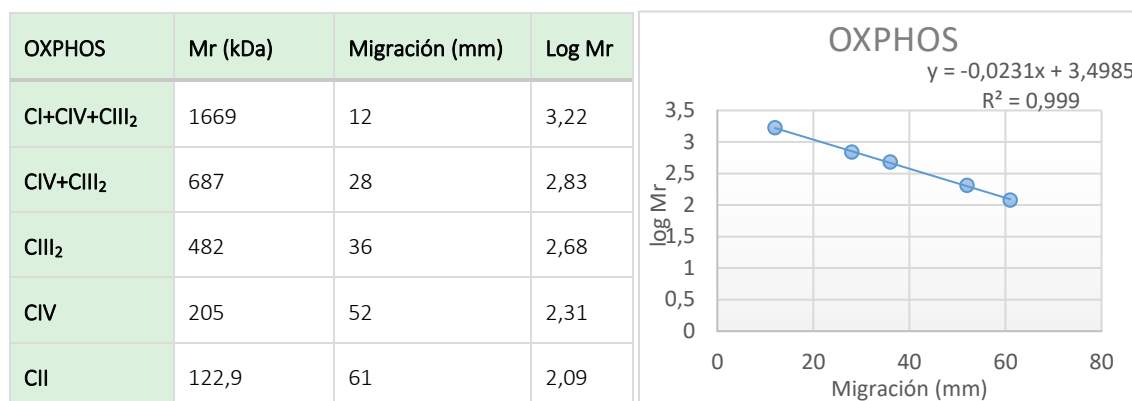


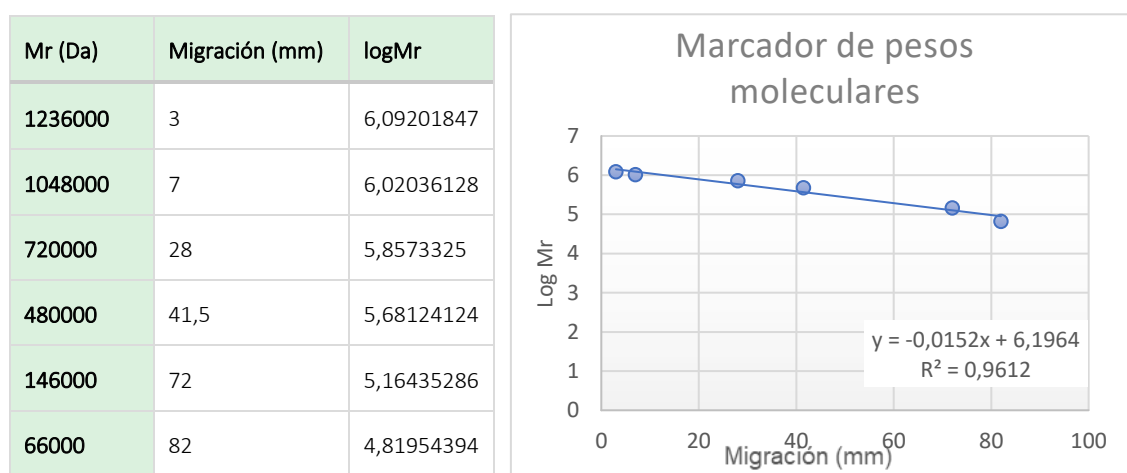
Figura 9.9 Imagen de las inmunodetecciones de ATAD3A (A.) y ATAD3B (B.) en mitocondrias de fibroblastos *Ci* mediante Blue Native-PAGE. Los anticuerpos se hibridaron secuencialmente. La llave dibujada en el gel indica la banda detectada para ATAD3A. Las líneas naranjas indican la zona central de las dos bandas detectadas para ATAD3B. Se cargaron 42,6 μ g de la fracción mitocondrial solubilizada por calle.

Tabla 9.6. Datos de la migración de las bandas detectadas en el gel Blue Native-PAGE revelado con los anticuerpos frente los complejos de la cadena respiratoria (A) o frente al marcador de pesos moleculares (B). Se representan los mm de la migración de cada banda y el logaritmo del peso molecular conocido para cada complejo. La recta obtenida se utilizó para calcular el peso molecular de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-HA (Figura 5.25). Se incluyeron los complejos SC (CIII₂+CIV+CI), CIII₂+CIV, CIII₂, CIV (no se muestra en la membrana) y CII. El marcador de pesos moleculares utilizado es NativeMark™ Unstained Protein Standard de Life Technologies. Los anticuerpos utilizados se recogen en Anexo II, Tabla 10.1.

A.



B.



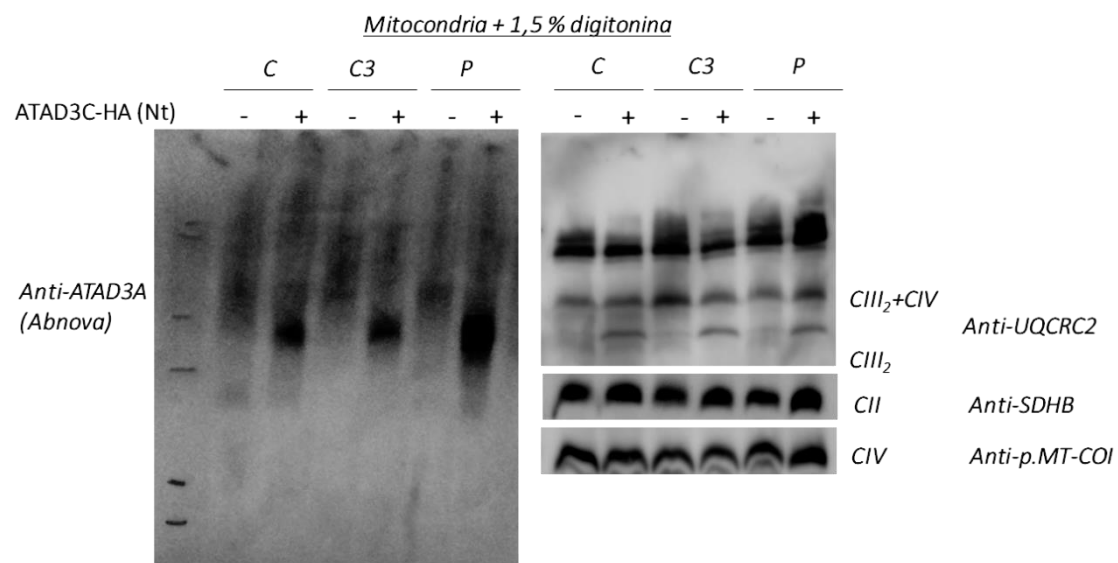


Figura 9.10 Imagen de la inmunodetección de oligómeros de las proteínas ATAD3A y ATAD3C en la membrana mitocondrial interna. Se separaron los complejos nativos, solubilizados a partir de mitocondrias aisladas de fibroblastos *C*, *C^{ATAD3C-HA}*, *C3*, *C3^{ATAD3C-HA}*, *P* y *P^{ATAD3C-HA}*, mediante Blue Native-PAGE. Se cargaron 21 µg de mitocondrias por calle.

Tabla 9.7 Péptidos comunes de las proteínas ATAD3C, ATAD3A y ATAD3B analizados por LC-MS/MS. Se utilizó un método combinado de shotgun y proteómica dirigida y se identificaron péptidos únicos de las proteínas mediante los herramientas informáticas *Proteome Discoverer* y *Skyline* en los inmunoprecipitados de las diferentes líneas celulares. En verde se indican las isoformas a las que pertenecen los péptidos analizados. En rojo se indican las muestras de inmunoprecipitación en las que se han detectado los péptidos únicos.

		Isoformas					Inmunoprecipitación-HA Líneas celulares					
	Péptido	ATAD3A-1	ATAD3A-2	ATAD3B-1	ATAD3B-3	ATAD3C	HEK293T	HEK293T ^{ATAD3C-HA}	HEK293T ^{ATAD3C-L321P-HA}	HEK293T	HEK293T ^{ATAD3A-HA}	HEK293T ^{ATAD3B-HA}
ATAD3A y ATAD3C	YVLKPATEGK											
	DALNLAQMQEQLTLQLEQQSK											
	GLLLFVDEADAFLR											
	YVLKPATEGK											
	ATLNAFLYR											
	ISEDLR											
ATAD3B y ATAD3C	HILLYGPPGTGK											
ATAD3A y ATAD3B	LKEYEAAVEQLK											
	DKWSNFDPTGLER											
	WSNFDPTGLER											
	GEGAGPPPPPLPPAQPGEAGGGDR											
	GLGDRPAPK											
	KTLSEETR											
	TLSEETR											
	EYEAAVEQLK											
	HKNEMLR											
	QRYEDQLK											
	HPIQVSR											
	TAGTLFGEGFR											
	QQQLLNEENLR											
	ENADIIR											
	LTEGMSGR											
	QTVLESIR											
DIAIATR												
ATAD3A, ATAD3B y ATAD3C	NATAVTGR											
	LGKPSLVR											
	ITVLEALR											
	LAQFDYGR											
	LFDWANTSR											
	EGVTAMHK											
	LALHSGMDYAIMTGGDVAPMGR											

10. ANEXO II – EXTENSIÓN de materiales y métodos

Tabla 10.1. Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Peso Molecular proteína	Dilución de trabajo	Tipo, especie	Casa comercial, código
Anti- α -Actina	42 KDa	1:5000	Policlonal, conejo	Sigma, A2066
Anti-Lámina- β 1	68 KDa	1:10000	Policlonal, conejo	Abcam, ab16048
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	ATPasa 54 KDa (CV- ATP synthase subunit alpha - ab14748)	1:1000	Monoclonal, ratón	Abcam, ab110411
	Core2 48 KDa (CIII-complex III subunit Core2 - ab14745)			
	SDHB 29 KDa (CII- ab14714)			
	COXII 22 KDa (CIV-complex CIV subunit II- ab110258)			
	Subunidad NDUFB8 18 KDa (CI- Complex I subunit NDUFB8-ab110242)			
Anti-Tubulina	Aprox. 50 kDa	1:3000	Monoclonal, ratón	Sigma, T6074
Anti-SDHA (Complex II subunit 70 KDa)	70 KDa	1:3000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459200
Anti-SDHB (Complex II subunit 30KDa)	29 KDa	1:3000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459230
Anti-RIESKE UQCRC2	29 KDa	1:1000	Policlonal, conejo	Invitrogen, PA521420
Anti-UQCRC2 (Core2 CIII)	48,4 KDa	1:2000	Monoclonal, raton	Abcam, ab14745
Anti-ATP synthase subunit C	8 kDa	1:1000	Monoclonal, conejo	Abcam, ab181243
Anti-ATP synthase alpha (ATP5A1)	54 kDa	1:2000	Monoclonal, ratón	Invitrogen, 459240

Anticuerpo	Peso Molecular proteína	Dilución de trabajo	Tipo, especie	Casa comercial, código
Anti-Complex IV Subunit I, COXI-Col, p.MT-CO1	40 KDa	1:2000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459600
Anti-POLG	139,562 kDa	1:1000	Policlonal, conejo	ThermoFisher Scientific, PA5-29676
Anti-NDUFS3 (Complejo I)	30 KDa	1:2000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459130
Anti-NDUFA9	36 kDa	1:1000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459100
Anti-NDUFB8 (Complejo I)	18 KDa	1:1000	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific, 459210
Anti-NDUFAF6	38,18 kDa	1:1000	Policlonal, conejo	Sigma, PA050545
Anti-TOM20	20 KDa	1:20000	Monoclonal, conejo	SantaCruz biotechnology, Inc., Sc11415
Anti-VDAC1 Porina	39 KDa	1:3000	Monoclonal, ratón	Abcam, 14734
Anti- Hsp60	60 KDa	1:2000	Monoclonal, ratón	Sigma, H4149
Anti-ATAD3B Sigma	72,5 kDa	1:1000	Policlonal, conejo	Sigma, HPA058968
Anti-ATAD3A Abnova	66,21 kDa	1:1000	Policlonal, conejo	Abnova, H00055210-D01
Anti-ATAD3A Sigma	66,21 kDa	1:1000	Policlonal, ratón	Sigma, SAB1400606-50UG
Anti-ATAD3C	46 kDa	1:500	Policlonal, conejo	Origene, TA332239
Anti-HA High Affinity		1:2000	Monoclonal, rata	Roche, 11867423001
Anti-HA-Peroxidase, High Affinity		1:3000	Monoclonal	Roche, 12013819001

Tabla 10.2 Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpos secundarios	
<i>Amersham™ ECL™ Anti-rat IgG, Horseradish PeroxidaseLinked Species-Specific Whole Antibody (from goat)</i>	NA935 GE Healthcare
<i>Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP</i>	31430 Thermo Fisher
<i>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP</i>	31460 Thermo Fisher

Tabla 10.3 Oligonucleótidos utilizados

Primer	Secuencia	Tm °C	% GC	
POLG R	GGATCCCTATGGTCCAGGCTGG	61,4	63,6	Confirmación de mutaciones en <i>POLG</i> y clonación <i>POLG</i>
POLG 2 int F	AGTGGGCCCCGTGCTCTGG	65,4	73,7	Confirmación mutación p.Asn864Ser en <i>POLG</i>
POLG 2 int2 F	AGTGGACAGGACTGAGGGTG	58,6	60	Confirmación mutación p.Ala1217Pro en <i>POLG</i>
POLG F	GTTTAAACGCCACCATGAGCCGCCTGCTC T	67,1	56,7	Clonación cDNA <i>POLG</i>
qPOLG total F	ACGCCCATAAACGTATCAGC	59	50	qPCR
qPOLG total R	CATAGTCGGGGTGCCTGA	60	61	
NDUFAF6 F	GTTTAAACGCCACCATGGCGGCCTCCGC GCA	71,7	64,5	Clonación cDNA <i>NDUFAF6</i>
NDUFAF6 R	GGATCCTTAATATGTTTTCTCCATGAC	65,4	34,7	
NDUFAF6 R4	GGGAAGGAACACCTTCTTCTGCTCCC	62,7	55,6	Confirmación mutaciones en <i>NDUFAF6</i>
NDUFAF6 F4	TGACCACTACTGCCTGGAGC	59,2	60	
qNDUFAF6#32 F	CTTGCTTGAGAGCAACACCA	60	50	qPCR
qNDUFAF6#32 R	CCTCTGTGAAACACCATGC	59	50	
β-actina F	CCAACCGCGAGAAGATGA	55	55	

β-actina R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	57	60	
ATAD3C Ex8F	GAGTCTGCTCTGTCGGTG	55,4	57,9	Confirmación mutaciones en <i>ATAD3C</i>
ATAD3C-In8 R	CACTCACAGTGGCTCGCTT GC	57,8	57,9	
ATAD3C Int2-3F	CAACTTGTCATGAGGATTTACG	52,1	39,1	
Primer ATAD3C Ex3 R	ACAAAGGCACGGAATCCTTC	55,5	50	
ATAD3A F (2)	GTTTAAACATGTCGTGGCTCTTCGGCATT AAC	61,2	43,8	Clonación cDNA <i>ATAD3A</i>
ATAD3A R	GGATCCTCAGGATGGGGAGGGCTCG	63,2	66,7	
ATAD3A-HA R				Clonación epítipo -HA en <i>ATAD3A</i>
ATAD3B R	GGATCCCTACAACAGGGGGTGCCT	66,2	64	Clonación cDNA <i>ATAD3B</i>
ATAD3B-HA R				Clonación epítipo -HA en <i>ATAD3B</i>
ATAD3B small F	GTTTAAACGCCACCATGCAGCTGGAAGC CCTGAAC	67,6	54,3	Clonación cDNA de la isoforma 3 de <i>ATAD3B</i>
ATAD3C F	GTTTAAACGCCACCATGTCAAAGGACGCC CTGA	66,1	51,5	Clonación cDNA <i>ATAD3C</i>
ATAD3C R	GGATCCTCAGGATGAGGGTTGCTCG	62,6	60	
ATAD3C-HA R	GGATCCTTATCAGGCGTAATCTGGCACAT CATAGGGGTAGGATGAGGGTTGC	69,3	51,9	Clonación epítipo -HA en <i>ATAD3C</i> (C-terminal)
ATAD3C-HA Nterminal R	GTTTAAACGCCACCATGTACCCCTATGAT GTGCCAGATTACGCCATGTCAAAGGACG CCCTGA	71,5	50,8	Clonación epítipo -HA en <i>ATAD3C</i> (N-terminal)
Primer F ATAD3C mutagénesis	CCAGCCGGCGCGGCCCTGCTCTTTGTG G	87,14	76,7	Mutagénesis <i>ATAD3C</i>
Primer R ATAD3C mutagénesis	CCACAAAGAGCAGGGGGCCGCGCCGGCT GG	87,14	76,7	
pWPI-R Fw	GGGTACAGTGCAGGGGAAAG	65,6	60	Primer en pWPXLd IRES Neo y Puro

TaqMan ATAD3C 540 F	GTTTAAACTGTCCTGGCAGGCCACGGCG T	67,5	58,6	Clonación 3' UTR de ATAD3C
Sonda ATAD3C R	GGATCCTTTCGCGTGCACCTCCCTCCA	65,9	59,3	

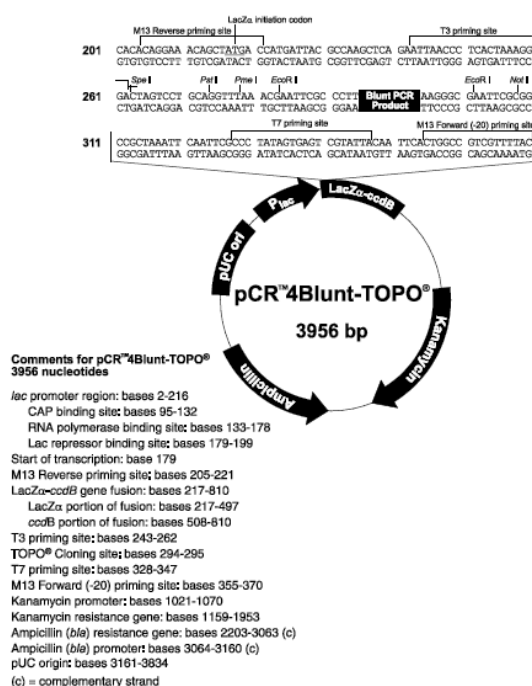
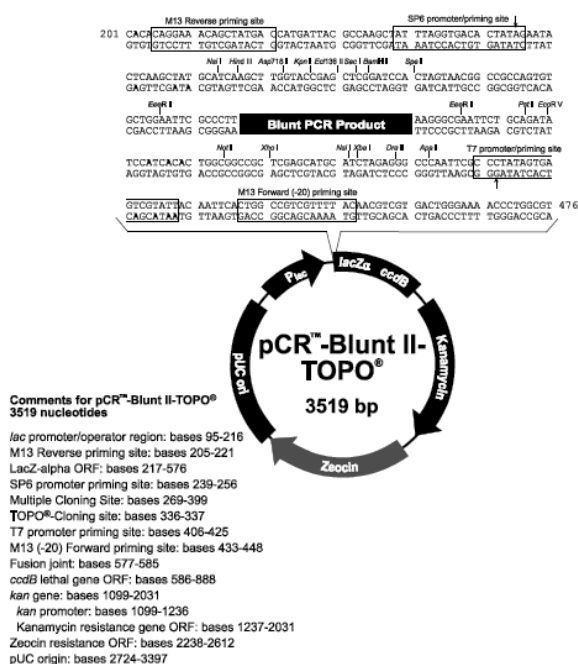


Figura 10.1. Mapa de los vectores de expresión pCR™-Blunt II-TOPO® y pCR™-4Blunt-TOPO®, de Invitrogen.

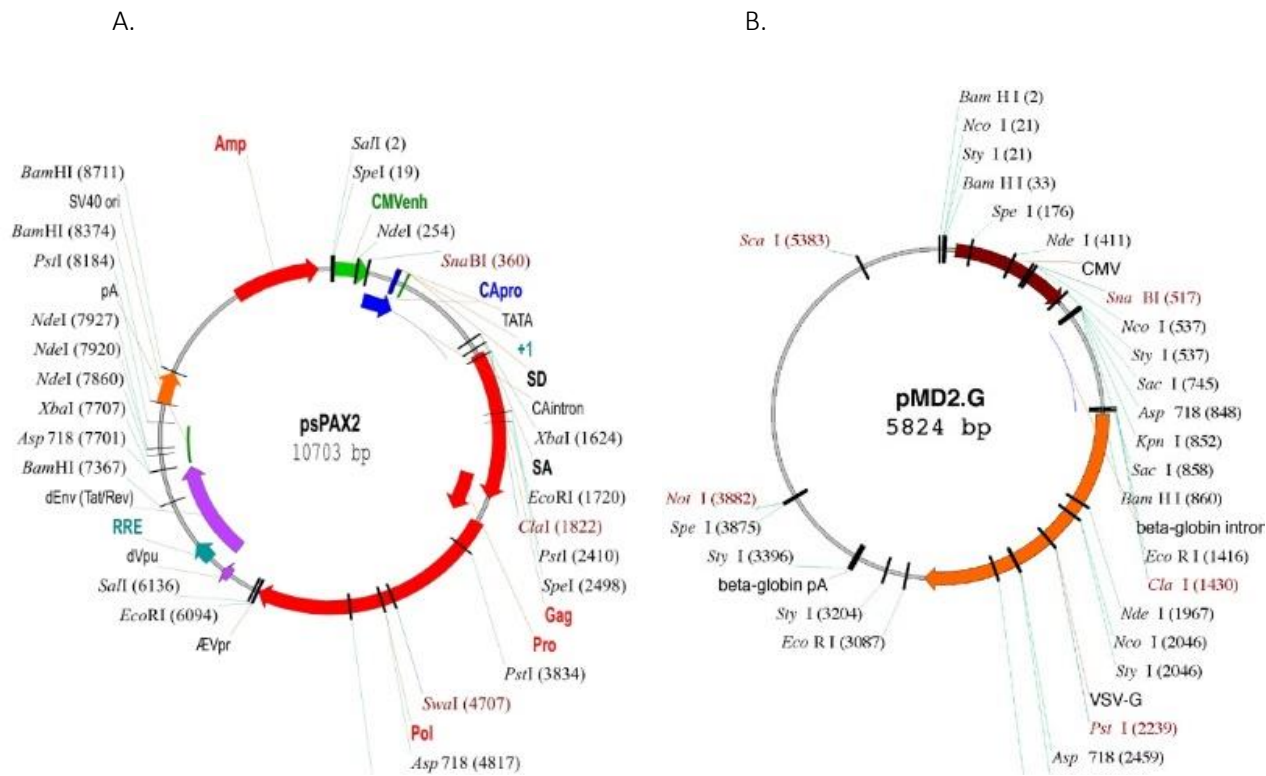


Figura 10.2 A. Mapa del vector empaquetador con la polimerasa, pxPAX2. B. Mapa del vector de la envuelta, pMD2.G. Ambos de Addgene.

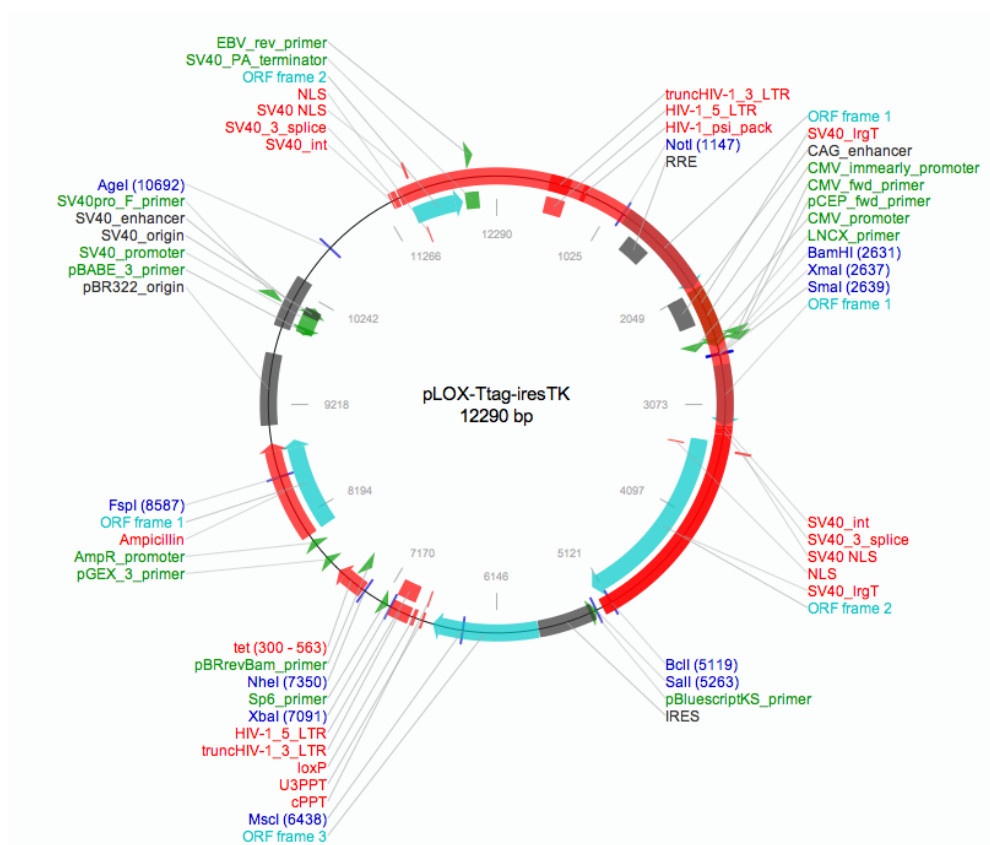


Figura 10.3 Mapa del vector lentiviral para inmortalizar las células pLOX-Ttag-iresTK.

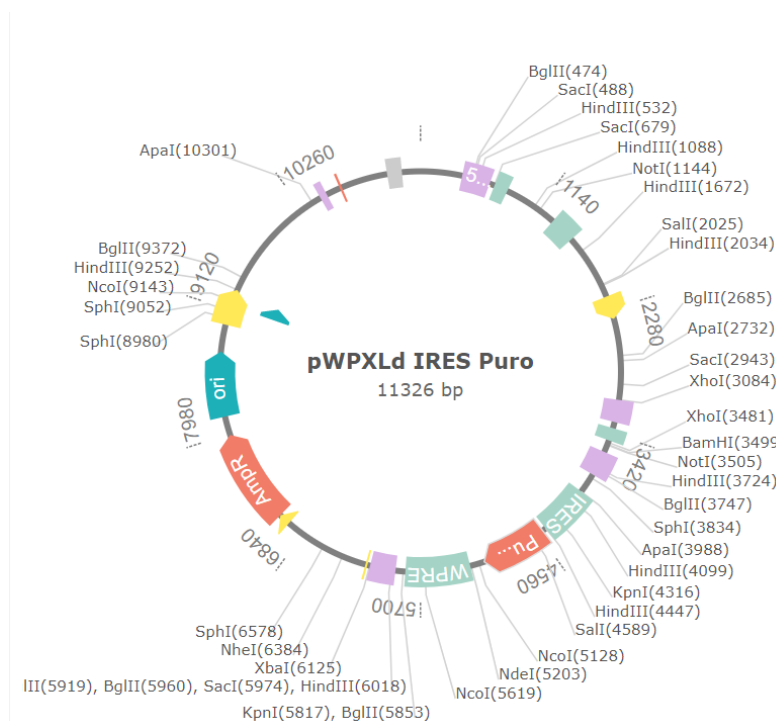


Figura 10.4 Mapa del vector lentiviral de expresión en eucariotas con resistencia a puromicina, pWPXLd IRES Puro. También se utilizó el vector lentiviral pWPXLd IRES Neo, plásmido idéntico al representado, reemplazando la resistencia a ampicilina por la de neomicina.