



Caracterización funcional de GTPBP3: una proteína G modificadora de tRNAs mitocondriales

TESIS DOCTORAL
Ana Martínez Zamora
Valencia, 2015

Universitat de València

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Caracterización funcional de GTPBP3:
una proteína G modificadora de
tRNAs mitocondriales.**

Programa de doctorado:

Bioquímica Clínico-Médica e Inmunología

Memoria presentada por Ana Martínez Zamora, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universitat de València

Valencia, 2015



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

La Dra. María Eugenia Armengod González, Doctora en Ciencias Biológicas e investigadora principal del laboratorio de Modificación del RNA y Enfermedades Mitocondriales del Centro de Investigación Príncipe Felipe, el Dr. Erwin Knecht Roberto, Doctor en Ciencias Biológicas e investigador principal del laboratorio de Degradación Intracelular de Proteínas y Enfermedades Raras del Centro de Investigación Príncipe Felipe y el Dr. Juan Miguel Esteve Esteve, Doctor en Ciencias Biológicas y profesor del Departamento de Medicina y Cirugía de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

CERTIFICAN:

Que Dña. Ana Martínez Zamora, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo titulado: **“Caracterización funcional de GTPBP3: una proteína G modificadora de tRNAs mitocondriales”**, y consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, 29 de Junio de 2015

Fdo. Directora
M^a Eugenia Armengod

Fdo. Co-director
Erwin Knecht

Fdo. Co-director
Juan M. Esteve

Doctorando
Ana Martínez Zamora

La autora ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación en Investigación en Salud (FI07/00246) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las ayudas a los proyectos "Caracterización de la ruta de modificación controlada por las proteínas de las familias MnmE y GidA" (Ref.: BFU2007-66509) y "Rutas de modificación de tRNAs que descodifican codones de cajas mixtas terminados en purinas" (Ref.:BFU2010-19737) del Ministerio de Educación y Ciencia y por la ayuda complementaria (ACOMP/2012/065), de la Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido fruto de mucho esfuerzo de esta autora, pero no podría haber llegado hasta este punto sin la ayuda de mucha gente. Así pues, como soy un poco sensiblon, paso a relatar brevemente mi percepción de todos estos años.

Gracias a mi directora, María Eugénia, por haberme permitido formar parte de este proyecto. A mis codirectores, Erwin y Juan, por discutir cada resultado y por todo el tiempo invertido.

He de reconocer que tuve suerte al realizar las prácticas de la carrera en el I-08, porque desde que empecé todos mis compañeros me han ayudado siempre. Mac, me enseñaste a moverme por el labo y en el mundo procariota, escuchabas mis ideas locas y siempre me diste sabios consejos. Salva, no hubiese llegado hasta aquí sin todo tu esfuerzo y empeño, gracias por ser tan cabezota y buen amigo. Fons, gracias por haber discutido conmigo muchos de los resultados y por haberme ayudado tanto durante estos años, ya sabes, family. Silvia, esa buena onda, no sabes cuantos días me has alegrado y gracias dobles por diseñadora. Ismi, no podría dejar de recordar las charlas algo filosóficas contigo y los domingos de *plorera* cuando mis bacterias no eran del color que tocaba. Elvira, mi compañera de cuartito, gracias por ese optimismo que siempre intentas transmitir. Carmen N., cuantas charlas a la hora de comer y en el *scanner*, aún sigo asombrándome con tu tenacidad con los *northerns* en gusano. Verdejo, que carácter y que buena a la vez, se te echa de menos. Rodrigo, buen amigo y apoyo, cuantas llamadas un poco desesperadas desde el sótano cuando no conseguía ver las actividades. Rafa, siempre transmitiendo esa pasión que te mueve en la ciencia. Majo y Natalia, compis por excelencia, cuantas buenas horas juntas en el labo. Olga y Rachiid, un poco de aire fresco que siempre viene bien.

También he de agradecer a nuestros vecinos, I-11, todas esas horas compartidas en cultivos: Jose, Inma, Rita, Félix, Rajjaa, Marcos, Asun, Nuria, Mari Paz y Mara. A Eva, que siempre ha escuchado mis problemas celulares y me ha ayudado. A Carmen A., apoyo y conocimiento para cualquier cosa que se pueda hacer en cultivos, con mucho genio, pero una buenaza.

A los compañeros de los servicios del CIPF por toda la ayuda técnica y la amabilidad, Jorge, Alicia y Mario. A Pilar, porque siempre tiene una sonrisa y así da gusto pedir la tarjeta de invitado para entrar en el CIPF.

A los compis del grupo GenOXPHOS de Madrid, Patricio, Ester, Ana, Carmen C., Ricardo, Rebeca, Edu, Sara, Conchi, Marta y M. Olivares, que me ayudaron y apoyaron durante mi estancia. En especial a Adela que desde el principio me ayudó a encontrar todos los reactivos desperdigados por el laboratorio común y con la que pasé tan buenos momentos. A Toño, por permitirme aprender muchas técnicas mitocondriales y discutir los resultados desde un punto de vista optimista y creativo.

A mis amig@s, Ana, Marta, Lorena, Geles, Inés, Andy, Silvia y Alejandro, por aguantar muchos días sin preguntarme nada de la tesis y por ser un apoyo constante. Durbi, menos mal que teníamos esas tardes de cervecitas y despeje mental. Como me he reído contigo, necesito ese sentido del humor tan tuyo en mi vida.

A Nico, por devolverme la ilusión, ayudarme a fijar metas, ser fuente de inspiración y aguantarme los agobios. Espero que el camino que recorramos juntos sea muy largo.

A la familia, por estar ahí y ayudarme siempre. A mis padres, Papá gracias por quedarte con cada noticia biológica que salía en la radio (seguimos sin saber si se subía la bacteria en la hormiga o en la brizna de hierba), por escucharme y apoyarme. Mamá, sin ti si que esto no hubiese sido posible, casi has contribuido más que el ministerio. Gracias por el apoyo emocional y económico, por escuchar muchas de las presentaciones que tenía que hacer y por los *tuppers* con comida.

Dedicado a mi madre

Índices

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	XI
Índice de tablas	XIV
Abreviaturas	XV
Introducción	1
1. La mitocondria.....	4
1.1. Estructura y función mitocondrial.....	4
1.2. Genoma mitocondrial	7
1.3. Biogénesis mitocondrial	8
1.3.1. Transcripción mitocondrial	10
1.3.2. Traducción mitocondrial	12
1.3.3. Replicación mitocondrial.....	13
1.4. Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS).....	14
1.5. Arquitectura supramolecular del sistema OXPHOS	20
1.6. Señalización retrógrada.....	20
2. RNAs mitocondriales de transferencia humanos (tRNAs)	24
2.1. Modificaciones post-transcripcionales	25
3. Enfermedades mitocondriales	28
3.1. Características generales	28
3.2. Síndromes MELAS y MERRF	28
3.3. Fallo hepático infantil agudo dependiente de TRMU.....	30
3.4. Cardiomiopatía hipertrófica infantil dependiente de MTO1	30
3.5. Cardiomiopatía hipertrófica, acidosis láctica y encefalopatía dependiente de GTPBP3	31
Objetivos	33
Metodología	37
A. MATERIALES	39
1. Material biológico y medios de cultivo	39
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	39
1.2. Líneas celulares humanas	40

2. Material químico y bioquímico	41
2.1. Reactivos.....	41
2.2. Material para electroforesis de RNA y proteínas.....	41
2.3. Extracción y purificación de DNA y RNA	41
2.4. Material para las reacciones de PCR y oligonucleótidos.....	42
2.5. Material para transfección y selección de células humanas	44
2.6. Material para <i>Western blot</i>	44
2.7. Material para <i>Northern Blot</i>	45
2.8. Material para citometría de flujo.....	46
2.9. Material para la medida de ATP intracelular	46
2.10. Radioisótopos	46
3. Instrumentación científica	46
4. Programas informáticos	47
B. MÉTODOS	48
1. Técnicas microbiológicas	48
1.1 Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas.....	48
1.2. Preparación de células competentes	48
1.3. Transformación de las cepas bacterianas	48
2. Cultivo de células humanas	49
2.1. Cultivo de las líneas celulares.....	49
2.2. Transfección de plásmidos	49
2.3. Curvas de crecimiento	50
2.4. Cálculo de la dosis letal 50.....	50
2.5. Diálisis del Suero Fetal Bovino (FBS)	51
3. Procedimientos	51
3.1. Aislamiento de DNA y RNA	51
3.1.1. Aislamiento de DNA	51
3.1.2. Aislamiento de RNA total	51
3.1.3. Aislamiento de RNA pequeño total.....	52
3.1.4. Purificación de tRNA específico	52
3.2. Análisis mediante <i>APM-Northern Blot</i>	53

3.3. Digestión in vitro de los RNAs pequeños humanos y el tRNA ^{Lys} nativo de <i>E. coli</i>	53
3.4. Medida del estado de modificación de la U34 mediante HPLC.....	54
3.5. Cuantificación de los niveles de mRNAs mediante qRT-PCRs	54
3.6. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante qRT-PCRs.....	55
3.7. Obtención y preparación de extractos celulares	56
3.8. Purificación de mitoplastos y mitocondrias.....	56
3.8.1. Obtención de mitoplastos	56
3.8.2. Obtención de mitocondrias.....	57
3.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunodetección	58
3.10. Inmunopurificación de anticuerpos.....	58
3.11. Síntesis <i>in vivo</i> de proteínas mitocondriales	59
3.12. Electroforesis de proteínas en gradiente exponencial de SDS-PAGE	60
3.13. Electroforesis de proteínas en geles Blue Native	62
3.14. Estudio de la autofagia.....	62
3.15. Medida del ATP intracelular	63
3.16. Consumo de oxígeno	63
3.17. Estudios de citometría de flujo.....	63
3.18. Análisis de la actividad de la catalasa, SOD y GPx.	64
3.19. Análisis de la actividad de los complejos OXPHOS.....	64
4. Análisis estadístico.....	66
Resultados.....	67
1. Obtención de células humanas silenciadas establemente para el gen <i>GTPBP3</i> (células shGTPBP3).....	69
1.1. Análisis del nivel de la proteína GTPBP3 en las células shGTPBP3	70
2. Estudio del estado de modificación de los tRNAs substrato de GTPBP3 y MTO1 en las células shGTPBP3	73
2.1 Digestión de los mt-tRNAs con angiogenina en las células shGTPBP3.	73
2.2. Validación del ensayo de angiogenina mediante el uso de tRNA ^{Lys} de <i>E. coli</i>	75
3. Evaluación de la función mitocondrial en las células shGTPBP3.....	77

3.1 Determinación del potencial de membrana mitocondrial en las células shGTPBP3	77
3.2. Control de la respiración celular en las células shGTPBP3.....	78
3.3. Estudio de los niveles de especies reactivas del oxígeno en las células shGTPBP3	79
3.4. Sistemas antioxidantes enzimáticos en las células shGTPBP3	80
3.5. Estudio de los niveles de ATP intracelular.....	83
3.6. Estudio de la actividad de enzimas OXPHOS	84
3.7. Análisis del sensor energético celular AMPK (proteína quinasa estimulada por AMP)	85
3.8. Afectación de procesos celulares: crecimiento celular y autofagia	87
3.9. Estudio de la morfología mitocondrial y del número de copias de DNA mitocondrial en las células shGTPBP3.....	88
4. Mecanismo patogénico en las células shGTPBP3	90
4.1. Traducción mitocondrial en las células shGTPBP3	91
4.2. Niveles de subunidades OXPHOS en las células shGTPBP3.....	93
4.3. Ensamblaje de los complejos mitocondriales en las células shGTPBP3	95
4.4. Señalización retrógrada en las células shGTPBP3.....	97
4.5. Expresión de genes implicados en glucólisis, oxidación de ácidos grasos y catabolismo de la glutamina	102
Discusión	105
Conclusiones generales.....	117
Bibliografía.....	121

Índice de figuras

Figura 1. Ultraestructura y morfología mitocondrial	5
Figura 2. Metabolismo energético en una célula típica de mamífero	6
Figura 3. Genoma mitocondrial humano	8
Figura 4. Regulación de la biogénesis mitocondrial por PGC-1α	9
Figura 5. Maduración post-transcripcional de los RNAs codificados por el mtDNA	11
Figura 6. Ciclo de traducción de proteínas en la mitocondria	12
Figura 7. Interacción de los activadores traduccionales con diversos componentes.....	12
Figura 8. Empaquetamiento del mtDNA en nucleoides	13
Figura 9. Modelos de replicación del mtDNA en mamíferos..	14
Figura 10. Origen genético e interacción funcional de los complejos OXPHOS	15
Figura 11. NADH: ubiquinone oxidorreductasa	16
Figura 12. Succinato: ubiquinona oxidorreductasa	17
Figura 13. Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa	18
Figura 14. Citocromo c oxidasa	18
Figura 15. ATP sintasa	19
Figura 16. Esquema actual del sistema mitocondrial de la fosforilación oxidativa.....	20
Figura 17. Rutas de señalización mitocondrial.....	21
Figura 18. Producción de ROS por la cadena de transporte electrónico	22
Figura 19. Factores implicados en la señalización retrógrada UPR^{mt} en <i>C. elegans</i>	23
Figura 20. Ruta autofágica.....	24

Figura 21. Modificaciones post-transcripcionales en mt-tRNAs bovinos	25
Figura 22. Estructura química de la modificación τm^5 en la uridina de tambaleo de algunos mt-tRNAs	27
Figura 23. Doble control genético y múltiples manifestaciones en órganos de las enfermedades mitocondriales	28
Figura 24. Estructura en forma de hoja de trébol de los tRNAs mitocondriales Leu^(UUR) y Lys	29
Figura 25. Esquema del plásmido shRNA utilizado para el silenciamiento estable de <i>GTPBP3</i>	40
Figura 26. Esquema de montaje para crear el gel desnaturizante en gradiente	61
Figura 27. Análisis del silenciamiento estable de <i>GTPBP3</i> en células HEK-293	69
Figura 28. Eficiencia del silenciamiento de <i>GTPBP3</i> en las células sh<i>GTPBP3</i>	70
Figura 29. Expresión de <i>GTPBP3</i> en células HEK-293	71
Figura 30. Determinación del silenciamiento de <i>GTPBP3</i> en las células sh<i>GTPBP3</i> mediante inmunodetección de la proteína <i>GTPBP3</i>	72
Figura 31. Alteración del patrón de digestión con angiogenina de los mt-tRNAs sustrato de <i>GTPBP3</i> en las células sh<i>GTPBP3</i>	74
Figura 32. Nivel de tiolación en mt-tRNA^{Lys} en las células sh<i>GTPBP3</i>	75
Figura 33. Validación del ensayo de angiogenina con tRNAs de <i>E. coli</i>	76
Figura 34. Esquema del circuito de protones a través de la membrana mitocondrial interna	77
Figura 35. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	78
Figura 36. Medida del consumo de oxígeno en las células sh<i>GTPBP3</i>	79
Figura 37. Niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células sh<i>GTPBP3</i> y control negativo	80
Figura 38. Sistema de detoxificación de ROS	80

Figura 39. Actividad enzimas antioxidantes	81
Figura 40. Niveles de expresión de más enzimas antioxidantes	82
Figura 41. Inmunodetección de UCP2	83
Figura 42. Medida del ATP intracelular en las células shGTPBP3	84
Figura 43. Actividad complejos OXPHOS.....	84
Figura 44. Inmunodetección de los niveles de AMPKα fosforilada y AMPKα en las células shGTPBP3	85
Figura 45. AMPK es un regulador principal del metabolismo	86
Figura 46. Proliferación celular en las células shGTPBP3	87
Figura 47. Detección de los niveles de autofagia.....	88
Figura 48. Microfotografía electrónica representativa de las células shGTPBP3	89
Figura 49. Análisis morfométrico de las mitocondrias en las células shGTPBP3 y del número de copias de mtDNA	90
Figura 50. La traducción mitocondrial está levemente afectada en las células shGTPBP3	92
Figura 51. Efecto diferencial del cloranfenicol y la cicloheximida en las células shGTPBP3 <i>versus</i> control negativo	93
Figura 52. Disminución del nivel de las subunidades del Complejo I en las células shGTPBP3	94
Figura 53. Los transcritos de las subunidades del Complejo I se mantienen inalterados en las células shGTPBP3	95
Figura 54. Disminución del nivel de Complejo I en las células shGTPBP3	96
Figura 55. La expresión de los genes codificadores de los factores de ensamblaje NDUFAF3 y NDUFAF4 está disminuida en las células shGTPBP3	97

Figura 56. La señalización mediada por AMPK disminuye de los niveles de mRNA de los factores de ensamblaje del Complejo I, NDUFAF3 y NDUFAF4	98
Figura 57. Niveles del Complejo I tras el tratamiento con AICAR y con el compuesto C.....	99
Figura 58. Niveles del mRNA de <i>UCP2</i> tras el tratamiento con AICAR y el compuesto C.....	100
Figura 59. Expresión de genes implicados en glucólisis, oxidación de ácidos grasos y catabolismo de glutamina en las células shGTPBP3.....	103
Figura 60. Rutas metabólicas de la glucosa y ácidos grasos en las células shGTPBP3	115

Índice de tablas

Tabla 1: Plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de <i>GTPBP3</i>	39
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	42
Tabla 3: Anticuerpos primarios usados en este trabajo.....	44
Tabla 4: Programa RT-PCR empleado para el análisis de los niveles de mRNA	55
Tabla 5: Programa RT-PCR empleado para el análisis de mt-DNA	55

Abreviaturas

Acetil CoA	Acetil Coenzima A
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1-β-D-ribofuranósido
ATP	Adenosin trifosfato
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
APM	Cloruro [(N-acriloil amino) fenil] mercúrico
BN-PAGE	Gel nativo de poliacrilamida en gradiente (<i>Blue native polyacrylamide gel</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
cmnm	Grupo carboximetilaminometil
cmnm⁵s²U	5-carboximetilaminometil-2-tiouridina
DHR-123	Dihidrorrodamina-123
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETF-QO	Flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa transferente de electrones
FAD	Flavín adenín dinucleótido, forma oxidada
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido, forma reducida
FBS	Suero fetal bovino
GLUT	Transportador de glucosa
HE	Dihidroetidio
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IMS	Espacio intermembranoso
kDa	KiloDalton
LAT	<i>Luria-Bertani agar thymine medium</i>

LBT	<i>Luria-Bertani thymine medium</i>
MELAS	<i>Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes</i>
MEM	Medio esencial mínimo
MERRF	<i>Myoclonic epilepsy with ragged red fibers</i>
MIM	Membrana mitocondrial interna
mnm⁵s²U	5-metilaminometil-2-tiouridina
MOM	Membrana mitocondrial externa
MPC	Transportador mitocondrial de piruvato
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
OAA	Oxalacetato
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGC-1α	Coactivador PPAR 1α
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PPARs	Receptores nucleares activadores del proliferador de peroxisomas
PBS	Tampón fosfato
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media

s²U	2-tiouridina
s⁴U	4-tiouridina
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOD	Superóxido dismutasa
TCAC	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TFAM	Factor A de transcripción mitocondrial
TFB	Factor B de transcripción mitocondrial
τm⁵s²U	5-taurinometil-2-tiouridina
Tris	Tris-hidrometil-aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UCP2	Proteína desacoplante 2
xm5U	Modificaciones que incluyen metilaminometiluridina, aminometiluridina, carboximetilaminometiluridina y taurinometiluridina.

Introducción

Las mitocondrias son orgánulos celulares esenciales que están presentes en la mayoría de las células eucariotas, exceptuando eritrocitos y algunos protozoos parásitos (como *Giardia lamblia*, *Encephalitozoon hellem*, *Trichomonas vaginalis* o *Entamoeba histolytica*) (Katiyar *et al.*, 1995). Se originaron a partir de una α -proteobacteria endosimbionte ancestral (Emelyanov, 2001). Su función primaria es la producción de ATP a través de la ruta de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) pero, además, desempeñan funciones celulares cruciales en importantes procesos metabólicos, reguladores y del desarrollo (Smits *et al.*, 2010). En los últimos años se han acumulado datos demostrando que las mitocondrias participan activamente en la señalización celular, actuando como iniciadoras y transductoras de señales. Así, por una parte sirven como plataformas físicas sobre las que ocurren las interacciones señalizadoras proteína-proteína y por otra regulan los niveles de señales intracelulares, incluyendo Ca^{+2} y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Tait & Green, 2012). Por todo ello, la disfunción mitocondrial puede dar lugar a una gran variedad de enfermedades, incluyendo desórdenes multifactoriales comunes como diabetes y enfermedad de Parkinson. Sin embargo, por tradición, se suele asignar el término enfermedad mitocondrial a enfermedades causadas por el sistema OXPHOS, aunque es más propio designar a estas con el término de enfermedades OXPHOS (DiMauro *et al.*, 2013). Estas enfermedades, por su baja prevalencia, se incluyen dentro de las llamadas enfermedades raras y se presentan frecuentemente como desórdenes multisistémicos, progresivos y precozmente fatales (Boczonadi & Horvath, 2014; Smits *et al.*, 2010).

El sistema OXPHOS requiere la acción orquestada de una serie de complejos enzimáticos multiheteroméricos localizados en la membrana interna mitocondrial (Smeitink *et al.*, 2006). Estos comprenden los complejos de la cadena respiratoria traslocadores de protones I, III y IV, la ATP-sintasa o Complejo V, más un juego de complejos accesorios que proporcionan electrones al coenzima Q (ubiquinona), incluyendo el Complejo II (succinato-ubiquinona oxidorreductasa), la flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa transferente de electrones (ETF-QO), la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la dihidroorotato deshidrogenasa. La principal función del sistema OXPHOS es el transporte coordinado de electrones y protones, dando lugar a la producción de ATP. La gran complejidad de este sistema, que comprende alrededor de 90 proteínas codificadas tanto por el genoma mitocondrial como nuclear, explica la heterogeneidad de fenotipos clínicos asociados con los defectos genéticos de la fosforilación oxidativa. Debido precisamente a ese control genético dual, el defecto originario puede estar localizado en el genoma mitocondrial o en el nuclear. Las

mutaciones en el genoma mitocondrial causan desórdenes heredados por vía materna o desórdenes esporádicos, mientras que los desórdenes debidos a mutaciones nucleares tienen un patrón de herencia mendeliano (DiMauro *et al.*, 2013).

El genoma mitocondrial comprende 37 genes, incluyendo los que codifican 13 proteínas del sistema OXPHOS (7 del Complejo I, una del Complejo III, 3 del Complejo IV, y 2 del Complejo V) y todos los RNAs no codificantes necesarios para la síntesis de estas proteínas: 22 tRNAs y los 2 rRNAs que formarán parte de los mitorribosomas. La mayoría de las proteínas mitocondriales (que se cifran en torno a las 1500) están codificadas por el núcleo, incluyendo, entre otras varias proteínas del sistema OXPHOS, proteínas necesarias para el ensamblaje de los complejos OXPHOS y proteínas requeridas para el mantenimiento, transcripción y traducción del genoma mitocondrial. Dentro de este último grupo se encuentran las proteínas de los mitorribosomas, los factores de transcripción y traducción, las aminoacil sintetetasas y las proteínas modificadoras de los rRNAs y tRNAs mitocondriales. En esta Tesis vamos a estudiar las bases moleculares de ciertas enfermedades relacionadas con la modificación de los tRNAs mitocondriales y en la Introducción voy a referirme de manera especial al sistema OXPHOS, a la traducción de proteínas codificadas por el ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) y a la comunicación mitocondria-núcleo, por su relación con los objetivos de la Tesis y los resultados conseguidos.

1. La mitocondria

1.1. Estructura y función mitocondrial

Las mitocondrias se empezaron a describir a finales de 1800 por varios investigadores simultáneamente (Kolliker, Flemming, Altmann), pero no fue hasta 1897 cuando Carl Benda las denominó con ese término (mito = hilo, chondrios = gránulo)(Lane, 2005). Su tamaño, número y forma son variables y en células de tejidos con grandes necesidades energéticas (corazón o túbulos distales del riñón) son muy abundantes (Suzuki *et al.*, 2011).

En su ultraestructura podemos distinguir dos membranas (Figura 1C) que determinan dos compartimentos. La membrana mitocondrial interna (MIM) rodea el compartimento de la matriz mitocondrial. A su vez, la MIM está rodeada por la membrana mitocondrial externa (MOM) y el espacio que existe entre ambas se conoce

como espacio intermembranoso (IMS) (Figura 1D). La matriz mitocondrial contiene las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la β -oxidación de los ácidos grasos, así como el genoma mitocondrial. La MIM tiene numerosos pliegues, las crestas mitocondriales, que aumentan de manera considerable su superficie (Figura 1B y D). Además, posee una proporción importante de cardiolípidos (15%) (Schenkel & Bakovic, 2014), que le confieren una elevada impermeabilidad, incluso frente a los protones, de manera que todos los intercambios de metabolitos se realizan mediante transportadores específicos. En esta membrana (MIM) se localizan los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico y la ATP sintasa, siendo el lugar donde sucede la OXPHOS. Al contrario que la MIM, la MOM no presenta repliegues y contiene en gran abundancia una proteína conocida como porina. Las porinas forman grandes canales que permiten el paso de las moléculas con una masa molecular inferior a 5 kDa.

El tamaño, forma, motilidad y posición mitocondrial dentro de la célula refleja el estado metabólico de la misma, pero también depende del tipo celular, la fase del ciclo celular, el estado de diferenciación y su contenido en mtDNA. La apariencia mitocondrial puede variar de puntuada a filiforme y, en algunos tipos celulares, las mitocondrias pueden formar una red compleja que se alinea con los microtúbulos en el citoplasma (Figura 1A). Notablemente, la masa, función y morfología mitocondrial se encuentran reguladas dinámicamente en respuesta a un amplio rango de cambios fisiológicos (actividad física, disponibilidad de nutrientes, temperatura, ritmos circadianos o exposición a agentes infecciosos).

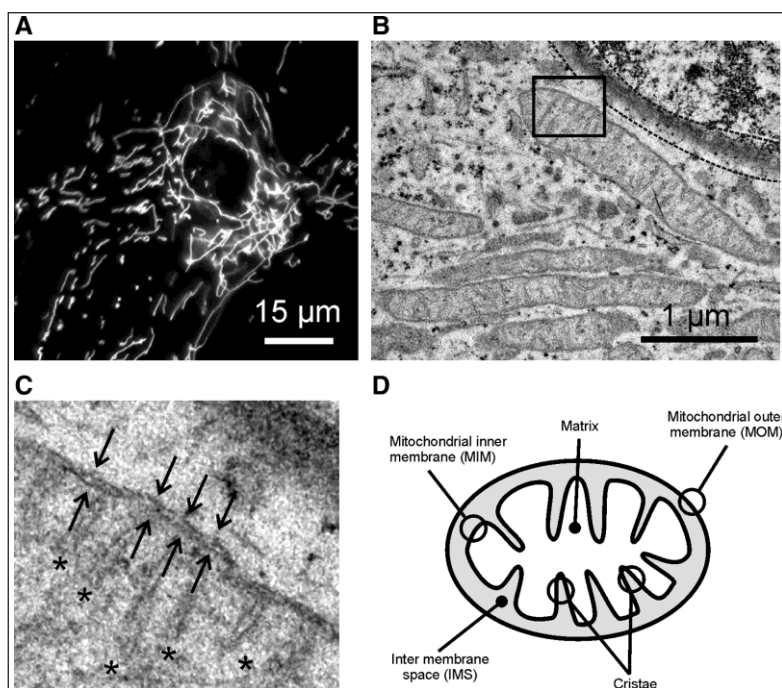


Figura 1. Ultraestructura y morfología mitocondrial. **A)** Microscopía confocal de mitocondrias de fibroblastos humanos teñidas *in vivo* con rodamina 123. **B)** Microscopía electrónica de mitocondrias perinucleares en fibroblastos humanos. El cuadrado indica el área que aparece aumentada en C. **C)** Las flechas muestran la membrana mitocondrial interna (abajo) y la membrana mitocondrial externa (arriba). Los asteriscos indican las crestas. **D)** Esquema de la mitocondria. Tomada de (Koopman *et al.*, 2010).

La mitocondria procesa los productos generados en la glucólisis y lipólisis para generar, a través del sistema OXPHOS, el transportador de energía celular ATP (Figura 2). Además, la mitocondria contiene enzimas críticos para múltiples procesos biosintéticos (tales como la síntesis de lípidos, colesterol, nucleótidos, grupos hemo, agrupamientos hierro-azufre y esteroides) y juega un papel muy importante en el metabolismo de los aminoácidos y en la homeostasis iónica. Al mismo tiempo, las mitocondrias también tienen un papel fundamental en la señalización celular mediante los ROS, el Ca^{+2} y las relaciones ATP/AMP y $\text{NAD}^{+}/\text{NADH}$, y son unos reguladores críticos de la muerte celular por apoptosis (Barbour & Turner, 2014). Dado su papel central bioenergético, metabólico y señalizador, la regulación de la masa mitocondrial y su función es vital (Benard *et al.*, 2007; Hock & Kralli, 2009).

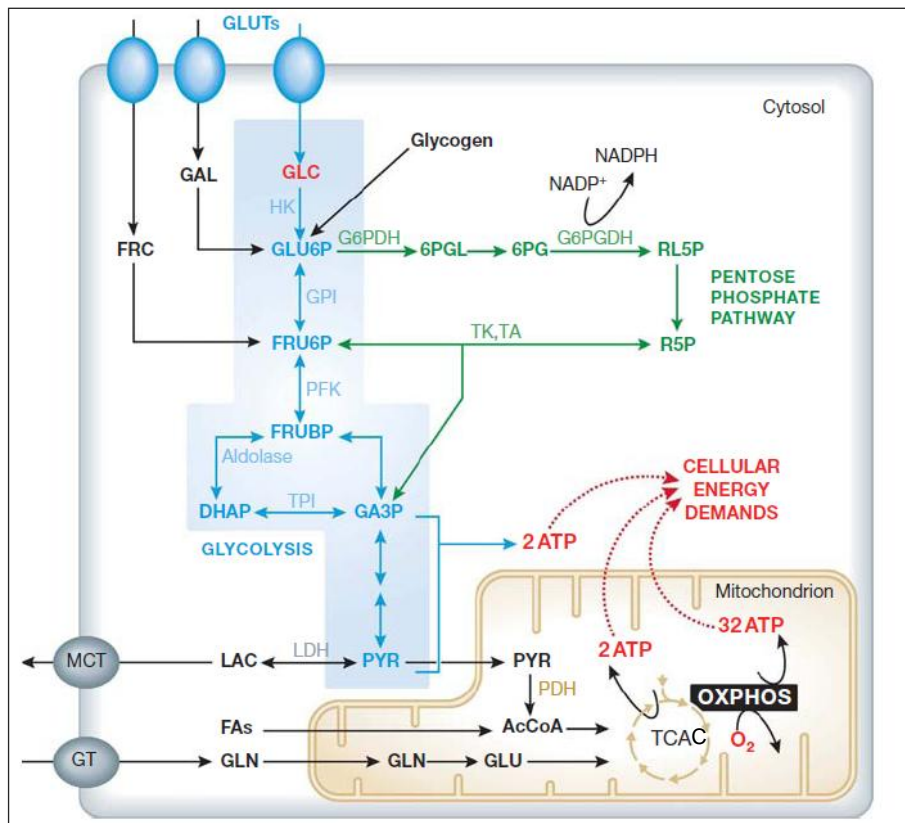


Figura 2. Metabolismo energético en una célula típica de mamífero. Se genera ATP (rojo) mediante la glucólisis (azul), el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCAC) y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). La glucosa (GLC) entra en la célula mediante los transportadores de glucosa (GLUTs) y es convertida en piruvato (PYR). El PYR puede ser convertido en lactato (LAC) que abandona la célula o bien entrar en la mitocondria (marrón). Posteriormente, es procesado en el TCAC para dar NADH y FADH_2 , que son sustrato del sistema OXPHOS. Además de la GLC, la fructosa (FRC), la galactosa (GAL), los ácidos grasos (FAs) y la glutamina (GLN) pueden entrar en el sistema de producción de ATP. 6PG, 6-fosfogluconato; 6PGL, 6-fosfogluconolactona; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; FRU6P, fructosa 6-fosfato; FRUBP, fructosa 1,6-bisfosfato; GA3P, gliceraldehído 3-fosfato; GLU, glutamato; G6PDH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; G6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; GT, transportador de

glutamina; GPI, fosfoglucoisomerasa; HK, hexoquinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MCT, transportador de monocarboxilato; PDH, piruvato deshidrogenasa; PFK, fosfofructoquinasa; RL5P, ribulosa 5-fosfato; R5P, ribosa 5-fosfato; TA, transaldolasa; TK, transcetolasa; TPI, triosafosfato isomerasa. Tomada de (Koopman *et al.*, 2013).

1.2. Genoma mitocondrial

Cada célula contiene de cientos a miles de copias del genoma mitocondrial. El mtDNA humano es una molécula de doble cadena circular cerrada de aproximadamente 5 μm con 16569 pares de bases (Figura 3) y es poliploide (Miller *et al.*, 2003): cada mitocondria puede contener un número variable de copias de mtDNA que oscila entre 2 y 10. Las dos cadenas del mtDNA poseen diferentes densidades según su composición en C+G, dando lugar a la definición de una cadena pesada (H) y otra ligera (L) (rica y pobre en guanina, respectivamente).

En circunstancias normales, todas las copias del mtDNA poseen la misma secuencia (homoplasmia), pero algunos individuos pueden tener dos o más genotipos mitocondriales (heteroplasmia). Como existen muchas copias de mtDNA en una célula, una variante con una secuencia deletérea puede ser tolerada, a menos que la abundancia del mtDNA defectivo exceda un umbral en el que la disfunción mitocondrial y celular se manifiesten. Las mitocondrias no se reparten equitativamente entre las células hijas durante la división celular, por lo que la proporción de mtDNA mutado puede variar en las células hijas, afectando a su fenotipo si, como he dicho, el número de moléculas mutadas supera un determinado umbral. De cualquier forma, existen muchas incógnitas en relación a la patogénesis de enfermedades debidas a mutaciones en el mtDNA y diversos factores como el haplotipo del mtDNA, el fondo genético nuclear y su epigenética, así como factores ambientales, parecen influir en el fenotipo (Chinnery *et al.*, 2012; DiMauro *et al.*, 2013).

Como ya he dicho, el genoma mitocondrial codifica 37 genes: 13 subunidades esenciales de los complejos respiratorios I, III, IV y V; 22 tRNAs (mt tRNAs) y 2 rRNAs (mt rRNAs). Para traducir las 13 proteínas codificadas por el mtDNA, las mitocondrias tienen su propia maquinaria. Todos los RNAs necesarios para la traducción mitocondrial (rRNAs y tRNAs, además de los 13 mRNAs que son traducidos) son suministrados por la mitocondria, mientras que los componentes proteicos, que incluyen proteínas ribosomales, factores traduccionales, aminoacil-tRNA-sintetasas y algunos factores más requeridos para la biogénesis de los tRNAs y rRNAs, tales como nucleasas y enzimas

modificadoras de RNAs, son codificados por el genoma nuclear y transportados a la mitocondria tras su síntesis en el citoplasma de la célula.

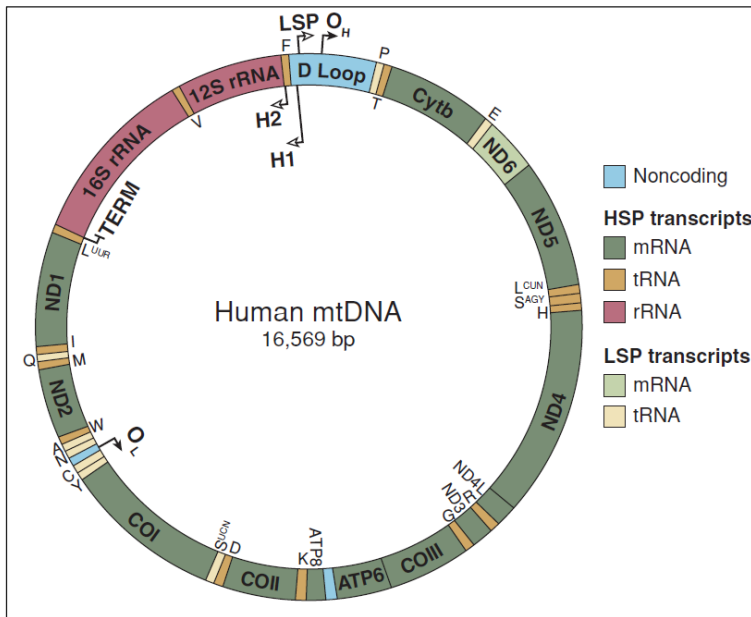


Figura 3. Genoma mitocondrial humano.

Representación esquemática del mtDNA humano. Los genes que codifican proteínas (verde oscuro) y los que codifican rRNAs (rojo) están intercalados con los 22 genes de los tRNAs (amarillo). La región reguladora del loop-D contiene los promotores de las cadenas ligera y pesada (LSP, H1 y H2). Las flechas indican la dirección de transcripción. O_H y O_L indican los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Term es el terminador para el transcrito H1. Tomada de (Falkenberg *et al.*, 2007)

1.3. Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que requiere la síntesis, el importe y la incorporación de proteínas y lípidos a la red mitocondrial existente. El proteoma mitocondrial comprende unas 1500 proteínas distintas (Calvo & Mootha, 2010). Por consiguiente, la biogénesis mitocondrial requiere de la transcripción coordinada de un gran número de genes en el núcleo, así como de los pocos pero esenciales codificados en el mtDNA. Esto se consigue mediante una serie de factores nucleares, organizados jerárquicamente (Figura 4) (Wenz, 2013), entre los que destacan NRF1 y NRF2. El primero de ellos controla la expresión de un número significativo de proteínas OXPHOS, así como la de proteínas integrales de membrana necesarias para la importación de proteínas a la mitocondria y la de proteínas necesarias para la biosíntesis de grupos hemo (Dominy & Puigserver, 2013). Ambos son capaces de integrar el control nuclear de la transcripción y la replicación del genoma mitocondrial a través de la modulación directa de los factores transcripcionales mitocondriales A (TFAM) y B (TFBs). La regulación diferencial de NRF1 y NRF2 no se conoce en todos sus detalles, pero sí se sabe que su fosforilación puede alterar sus actividades transcripcionales. Además, existen coactivadores de la familia PGC-1 que modulan el control dependiente de los factores NRF en respuesta a diferentes rutas de señalización.

Se han descrito más factores implicados en la regulación de los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales. Entre ellos se encuentran los receptores nucleares α relacionados con estrógenos ($ERR\alpha$), la proteína CREB de unión al elemento de respuesta a cAMP y el factor transcripcional ying yang 1 (Dominy & Puigserver, 2013; Scarpulla, 2011).

Se consigue un nivel superior de regulación mediante los receptores nucleares activadores del proliferador de peroxisomas (PPARs). El miembro más estudiado de esta familia es el coactivador PPAR 1α (PGC- 1α). Se hipotetiza que las rutas que regulan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales convergen en PGC- 1α , por lo que se le considera el regulador clave de la biogénesis mitocondrial (Wenz, 2013): además de coactivar PPAR γ , PGC- 1α es un coregulador de NRFs y $ERR\alpha$ en la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2012; Wenz, 2011).

La biogénesis mitocondrial es una respuesta adaptativa a largo plazo y no siempre se requiere para hacer frente a necesidades transitorias de una mayor energía. De hecho, se puede hacer frente a cambios transitorios en la demanda energética aumentando la expresión de un conjunto de genes nucleares o de reguladores críticos que incrementan la función mitocondrial (Hock & Kralli, 2009). Además, la expresión de ciertos genes nucleares es importante para funciones mitocondriales especializadas en diferentes tejidos y diferentes estados fisiológicos. De hecho, el 50% de los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales se expresan de una manera dependiente de tejido, sugiriendo que una gran parte del proteoma mitocondrial está dedicado a funciones especializadas (Calvo & Mootha, 2010).

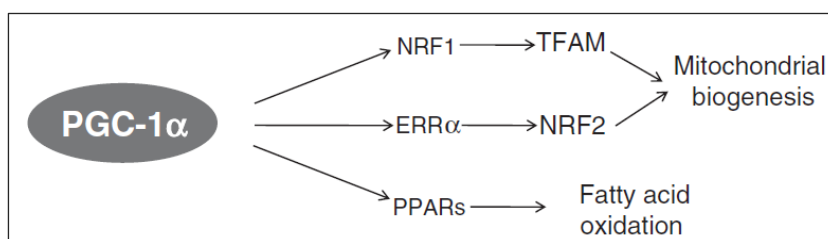


Figura 4. Regulación de la biogénesis mitocondrial por PGC- 1α . La biogénesis mitocondrial está regulada por los factores transcripcionales nucleares NRF1, NRF2 y $ERR\alpha$. El regulador cotranscripcional PGC- 1α interacciona con ellos, actuando como un regulador clave en la biogénesis mitocondrial. Tomada de (Wenz, 2013).

1.3.1. Transcripción mitocondrial

El genoma mitocondrial humano carece de intrones y la única región larga no codificante contiene los elementos de control para la transcripción y replicación del mtDNA. La transcripción a partir de los promotores produce RNAs precursores policistrónicos. En la cadena pesada hay dos sitios para el inicio de la transcripción (H1 y H2). A partir del sitio H1 (16 pb aguas arriba del gen tRNA^{Phe}) se produce un transcrito que termina en el extremo 3' del gen 16S rRNA (ver Figura 3). El sitio H2 se encuentra cerca del extremo 5' del gen 12S rRNA y produce una molécula policistrónica que casi corresponde a la totalidad de la cadena H. En la cadena ligera sólo hay un sitio para el inicio de la transcripción (LSP), a partir del que se producirá un único transcrito que corresponde a la totalidad de la cadena L.

En contra de lo esperado dado el origen evolutivo de las mitocondrias, algunos de los componentes claves en la transcripción y en la replicación del mtDNA no están relacionados con los bacterianos. La RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), la subunidad catalítica de la DNA polimerasa mitocondrial (POL γ A) y la helicasa mitocondrial replicativa (TWINKLE) son similares a proteínas codificadas por un linaje raro de bacteriófagos T (grupo *T-odd*), ancestro de los bacteriófagos T7 y T3 (Shutt & Gray, 2006). Sin embargo, a diferencia de la RNA polimerasa del fago T7, la POLRMT no puede interactuar con el promotor e iniciar la transcripción por sí misma, sino que requiere la ayuda del factor TFAM y de uno de los factores de transcripción mitocondrial B (TFB2M). Por lo tanto, la maquinaria base necesaria para iniciar la transcripción del mtDNA consiste en tres proteínas: POLRMT, TFAM y TFB2M.

Los transcritos producidos por POLRMT son procesados a continuación con el fin de liberar tRNAs, rRNAs y mRNAs (Figura 5). El procesamiento se inicia en la secuencia de los tRNAs para la liberación, de acuerdo con el modelo de puntuación del tRNA (Ojala *et al.*, 1981), de los mRNAs y rRNAs intercalados. Se requiere la excisión de los tRNAs para producir mRNAs y rRNAs maduros. La estructura secundaria del tRNA actúa como sustrato para la RNasa P mitocondrial y para otras RNAsas (Figura 5). No todos los genes del mtDNA están flanqueados por tRNAs. Una de las excepciones la constituyen las regiones codificantes de las proteínas ATP6-COXIII y ND5-Cyt b. La proteína con repeticiones de pentatricopéptido (PTCD2) parece ser responsable del procesamiento de la región ND5-Cyt B y la generación de los mRNAs maduros correspondientes (Xu *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce cómo se lleva a cabo el procesamiento de otros genes no flanqueados por tRNAs (Xu *et al.*, 2008).

El procesamiento del transcrito mitocondrial ocurre cotranscripcionalmente en pequeños puntos llamados gránulos de RNA. La maquinaria mitocondrial que procesa el extremo 5' es la enzima multiproteica RNasa P, que en el caso de las mitocondrias humanas carece de RNA catalítico. Esta enzima consta de 3 subunidades (MRPP1-MRPP3) que, independientemente, parecen estar implicadas también en otras funciones. Por ejemplo, MRPP1 y MRPP2 introducen un grupo metilo en la posición 9 de los mt-tRNAs, una modificación que parece ser crucial para que los mt-tRNAs puedan adoptar la conformación en forma de trébol. Por otra parte, la RNasa Z, que en mamíferos parece consistir en dos subunidades (ELAC2 y PTCD1), se encarga del procesamiento del extremo 3' de los tRNAs. La secuencia CCA en el tallo anticodón no está codificada por el mtDNA y una enzima específica (TRNT1) la añade (Nagaike *et al.*, 2001). Una vez esto ocurre, el tRNA deja de ser sustrato para la RNasa Z.

Los mRNAs liberados por el procesamiento no tienen región no traducida (UTR) en el extremo 5' o la tienen muy corta y a menudo carecen de UTR en la región 3'. También carecen de modificación 7-metilguanosina en el extremo 5', aunque todos, a excepción del correspondiente a ND6, contienen una pequeña cola de 45-50 nucleótidos de adeninas que son añadidas por una enzima específica. Una poliadenilación reducida y otros sucesos que afectan a la estabilidad de los mRNAs, y, por tanto, a la eficacia de la traducción mitocondrial, están relacionados con diversas enfermedades (Hallberg & Larsson, 2014).

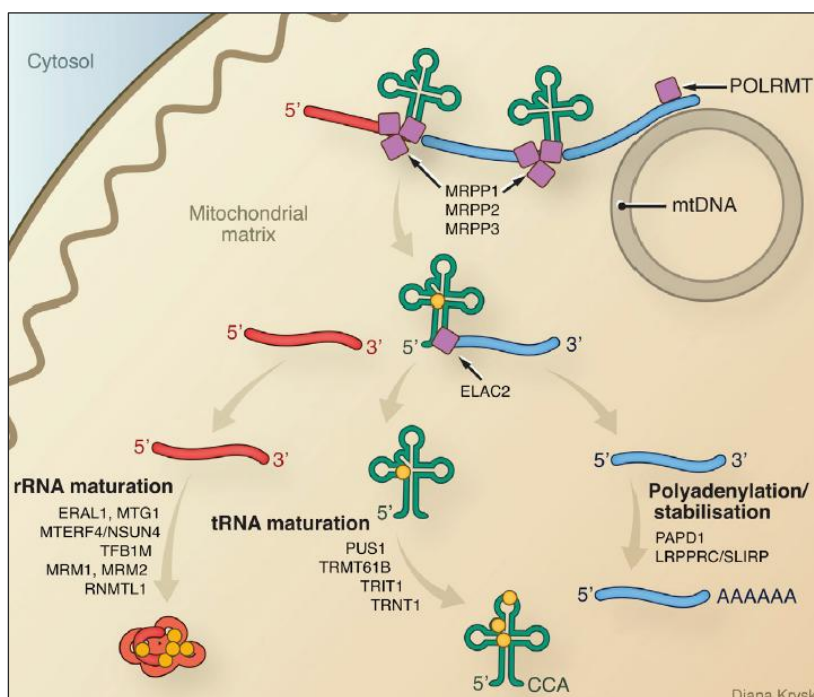


Figura 5. Maduración post-transcripcional de los RNAs codificados por el mtDNA.

Los transcritos policistrónicos se procesan para liberar mRNAs, rRNAs y tRNAs individuales. La RNasa P (MRPP1, MRPP2 y MRPP3) se encarga de la rotura del transcrito primario en el extremo 5' de los tRNAs. Los tRNAs son liberados por la rotura en el extremo 3' reducida por la RNasa Z (ELAC2). Los puntos amarillos indican modificaciones en el RNA. Tomada de (Hallberg & Larsson, 2014).

1.3.2. Traducción mitocondrial

La traducción mitocondrial es un proceso de múltiples pasos que requiere diferentes factores de iniciación, elongación, terminación y reciclaje, como ocurre en los ribosomas bacterianos y citosólicos (Figura 6).

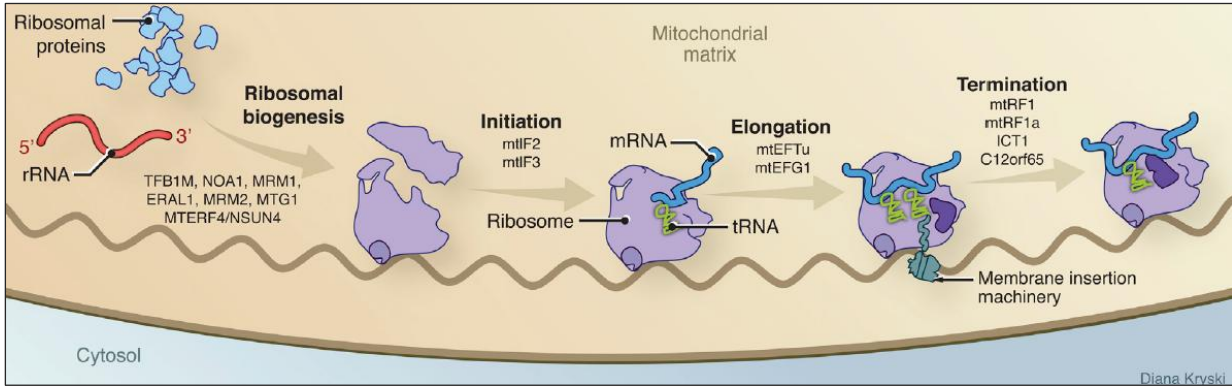


Figura 6. Ciclo de traducción de proteínas en la mitocondria. La traducción mitocondrial requiere varios factores para la iniciación, elongación y terminación. El anclaje a la membrana del mitorribosoma facilitaría la inserción en la MIM de las proteínas recién sintetizadas. Tomada de (Hallberg & Larsson, 2014).

En las mitocondrias de levadura, la traducción está activada por factores codificados por el nDNA (Herrmann *et al.*, 2013) (Figura 7). Estos activadores se unen a la región no traducida 5' (5'-UTR) del mRNA, posiblemente para asegurar el posicionamiento en los mitorribosomas en el codón de iniciación. Todas las proteínas activadoras conocidas hasta el momento son proteínas integrales de membrana o se unen a la membrana interna mitocondrial, sugiriendo que pueden estar participando en la asociación de la traducción mitocondrial con la membrana interna. De esta manera pueden promover la cotraducción e inserción de la nueva proteína sintetizada y el ensamblaje en los complejos OXPHOS. Así, estos activadores pueden regular no sólo los niveles de las proteínas sintetizadas en la mitocondria sino también la localización de la traducción mitocondrial.

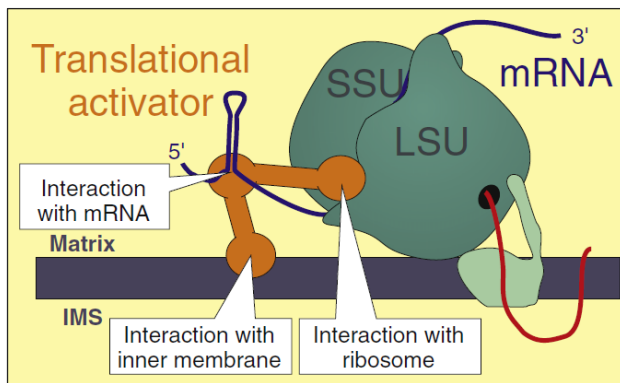


Figura 7. Interacción de los activadores traduccionales con diversos componentes. Los activadores traduccionales suelen interactuar con el ribosoma, con el mRNA, con la membrana interna e incluso con el péptido nascente. Tomada de (Herrmann *et al.*, 2013).

Como hemos mencionado anteriormente, los mRNAs mitocondriales humanos carecen de regiones 5'UTR lo que sugiere que la modulación de la traducción mitocondrial en humanos implica estrategias distintas a las de la levadura (Koc & Spremulli, 2003). En este sentido, se han descrito algunos activadores de la traducción mitocondrial que no guardan homología con los de la levadura (Ruzzenente *et al.*, 2012) (Weraarpachai *et al.*, 2009). Cuando aparecen mutaciones en los genes de estos activadores se producen desórdenes con deficiencias en el sistema OXPHOS, apreciándose también que los niveles de mensajeros de los genes COX son más bajos.

1.3.3. Replicación mitocondrial

El número de copias de mtDNA varía en varios órdenes de magnitud entre tejidos, siendo de aproximadamente 10^5 en oocitos humanos y de 10^3 en fibroblastos humanos. El mtDNA en mamíferos se encuentra muy empaquetado y organizado en unas estructuras llamadas nucleoides. Estas estructuras tienen un tamaño medio de ~100 nm y se distribuyen uniformemente a través de la red mitocondrial, pudiendo estar asociados con la membrana mitocondrial interna (Figura 8) (Kukat & Larsson, 2013). La mayoría de los nucleoides en mamíferos parece contener una sola copia de mtDNA (Kukat & Larsson, 2013). El factor de empaquetamiento de los nucleoides es el factor transcripcional TFAM, que se une al mtDNA cooperativamente y puede aumentar la flexibilidad de éste y doblarlo para facilitar la compactación (Ngo *et al.*, 2014). Aunque TFAM es el mayor factor de compactación del mtDNA, es posible que otras proteínas contribuyan a la estructura de los nucleoides.

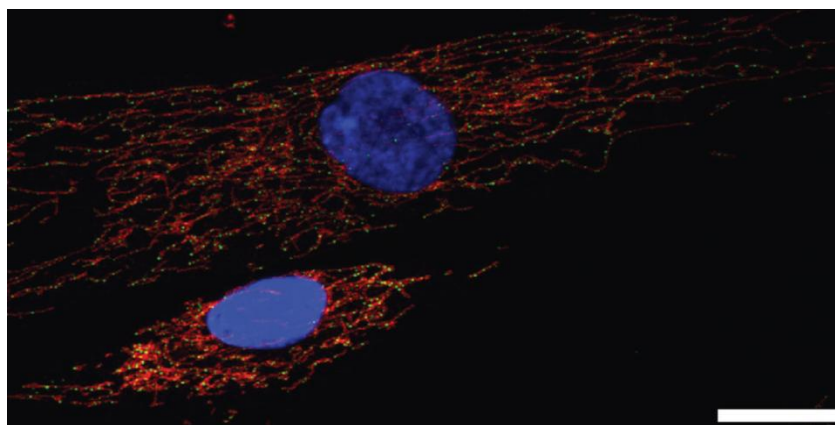


Figura 8. Empaquetamiento del mtDNA en nucleoides. Fibroblastos humanos teñidos con anticuerpos anti-mtDNA (verde) y anti-translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM20) (rojo) y con DAPI (azul). Barra: 25µm. Tomada de (Kukat & Larsson, 2013).

La replicación del mtDNA se lleva a cabo durante todo el ciclo celular y puede ocurrir de manera independiente de la replicación del DNA nuclear. Existen varios modelos sobre la replicación del mtDNA (Figura 9) y, actualmente, no existe un consenso sobre el mecanismo exacto utilizado para la replicación del mtDNA en mamíferos (Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2012).

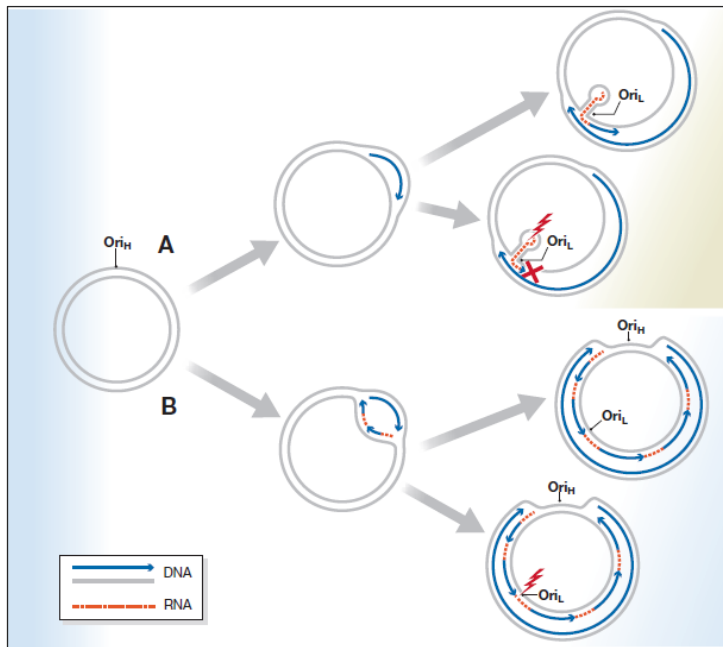


Figura 9. Modelos de replicación del mtDNA en mamíferos.

A) Mecanismo de replicación asincrónico. La síntesis del DNA empieza en Ori_H. La síntesis de la cadena L ocurre después de que la dos tercios de la cadena naciente H hayan sido sintetizados. Se forma el bucle Ori_L y la RNAPol sintetiza los cebadores. B) Mecanismo unidireccional de las dos cadenas. La síntesis empieza unidireccionalmente para las dos hebras en la región no codificante. La síntesis de la cadena retrasada es discontinua. Tomada de (Lightowlers & Chrzanowska-Lightowlers, 2012).

1.4. Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS)

El sistema OXPHOS (Figura 10) está formado por 5 complejos multienzimáticos embebidos en la MIM: Complejo I (CI o NADH: ubiquinona oxidorreductasa), Complejo II (CII o succinato: ubiquinona oxidorreductasa), Complejo III (CIII o ubiquinol: citocromo-c oxidorreductasa), Complejo IV (CIV o citocromo c oxidasa) y Complejo V (CV o F₀F₁-ATP sintasa). Se pueden dividir funcionalmente en dos grupos: el constituido por los complejos CI, CII, CIII y CIV, encargado del transporte de electrones, y el CV, que genera el ATP. Además, los complejos enzimáticos están conectados por dos moléculas: una quinona lipofílica embebida en la bicapa lipídica designada como ubiquinona o CoQ₁₀ y una proteína hemo hidrofílica (citocromo c) de baja masa molecular localizada en la cara externa de la MIM.

La MIM contiene en pequeñas cantidades otras proteínas con capacidad para transferir electrones, entre ellas se encuentran flavoproteínas transferentes de electrones (ETF), capaces de alimentar la cadena de transporte de electrones mediante rutas que no implican al Complejo I o al NAD⁺: 1) la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 2) la oxidorreductasa ubiquinona-EFT; 3) la dihidroorotato deshidrogenasa; 4) la colina

deshidrogenasa; 5) la sulfito CoQ reductasa y 6) la prolina deshidrogenasa (Enriquez & Lenaz, 2014).

En humanos, los complejos OXPHOS están constituidos por alrededor de 90 proteínas codificadas por el nDNA y por el genoma mitocondrial (mtDNA) (Figura 10) (Koopman *et al.*, 2013). Además, la biogénesis de un sistema OXPHOS funcional requiere factores de ensamblaje codificados por el genoma nuclear, de los que 35 han sido identificados ya (Koopman *et al.*, 2013). El CII está exclusivamente codificado por el genoma nuclear, mientras que el resto de complejos contienen subunidades que están codificadas tanto en el genoma nuclear como en el genoma mitocondrial.

El Complejo I oxida el NADH a NAD^+ y dona los electrones liberados al transportador de electrones coenzima Q_{10} . Es el complejo más grande, con una masa molecular total estimada en 1 MDa (Carroll *et al.*, 2006) y consta de 45 subunidades diferentes (Ghezzi & Zeviani, 2012).

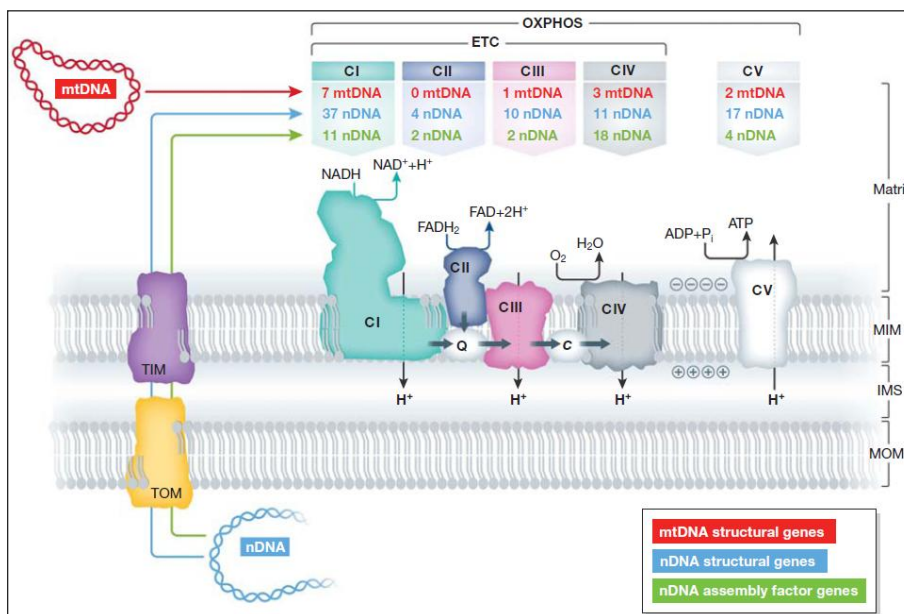


Figura 10. Origen genético e interacción funcional de los complejos OXPHOS. Las subunidades de CI, CIII, CIV y CV están codificadas por el mtDNA y el nDNA, mientras que las de CII están exclusivamente codificadas por el nDNA. Tomada de (Koopman *et al.*, 2013).

Para llevar a cabo las reacciones enzimáticas, el CI sólo requiere un núcleo de 14 proteínas conservadas evolutivamente. Siete subunidades están codificadas por el genoma mitocondrial (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 Y ND6) y las siete restantes (NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8) por el nuclear (Koopman *et al.*, 2010). Las subunidades adicionales del CI son accesorias o supernumerarias y se encuentran codificadas por el genoma nuclear. Aunque el papel de las subunidades accesorias en la biogénesis del CI, estabilidad y función no se conoce completamente, hay evidencias de su importancia para la estabilidad de este (Angerer *et al.*, 2011). Se conocen once factores de ensamblaje del CI (NDUFAF1,

NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, C8orf38, C20orf7, ACAD9, FOXRED1, ECSIT, NUBPL y OXA1L) (Nouws *et al.*, 2012).

Aunque todavía no se ha obtenido la estructura cristalina del CI de mamíferos, recientemente se ha obtenido la estructura cristalina del complejo bacteriano entero (Sazanov, 2015) y la de la mitocondria de la levadura *Yarrowia lipolytica* (Figura 11) (Zickermann *et al.*, 2015). Además, se ha visto por microscopía electrónica que tiene forma de L (Sazanov *et al.*, 2000), con dos brazos perpendiculares entre sí: el brazo hidrofóbico, que está embebido en la MIM y que consta de 7 subunidades codificadas por el genoma mitocondrial y el brazo periférico hidrofílico orientado hacia la matriz, y que contiene el sitio de unión del NADH y los centros redox. Los dos brazos albergan 3 módulos funcionales diferentes: 1) el módulo N (en el brazo periférico), que contiene el sitio deshidrogenasa y que está formado por una fracción flavin mononucleótido (FMN) responsable de la oxidación del NADH a NAD⁺; 2) el módulo Q (en la zona bisagra entre ambos brazos), que contiene el sitio de reducción de CoQ₁₀; y 3) el módulo P (o módulo de translocación de protones) que constituye el brazo embebido en la MIM. Existen ocho agrupamientos de hierro-azufre distribuidos entre el módulo N (5) y el módulo Q (3), siete de ellos forman una cadena redox en la que fluyen los electrones del FMN al CoQ₁₀, mientras que el papel del octavo agrupamiento, que se encuentra en el módulo N, no está claro. Este transporte está ligado a la translocación de H⁺ debida a cambios conformacionales en el complejo.

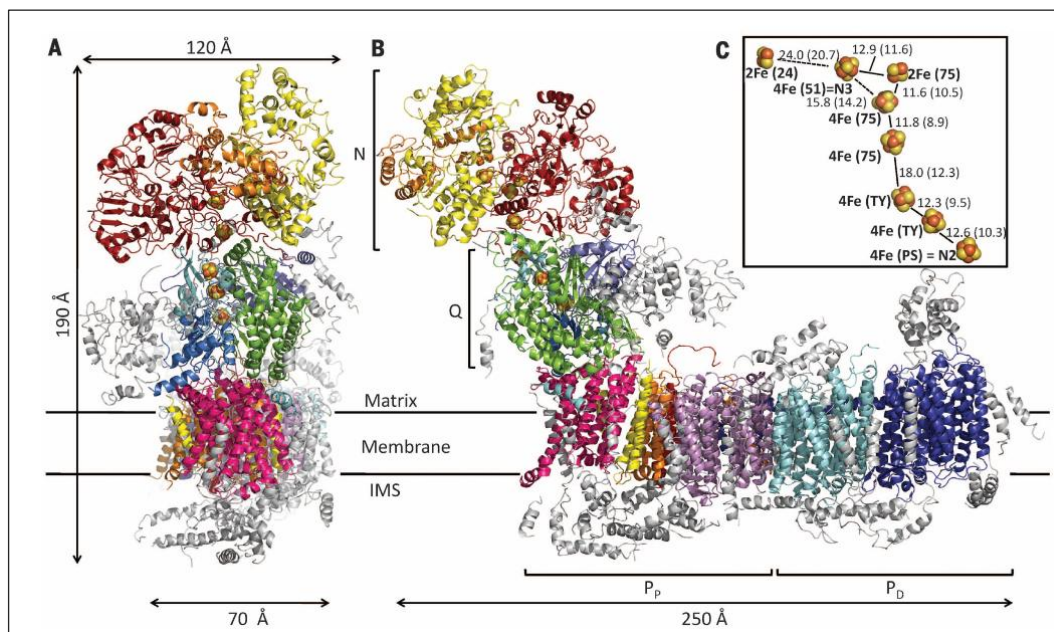


Figura 11. NADH: ubiquinona oxidorreductasa. Modelo de la estructura del Complejo I mitocondrial de *Yarrowia lipolytica*. **A)** Vista del brazo periférico. **B)** Vista del brazo hidrofóbico y en ángulo de 90° del brazo periférico. Módulo N: rojo, 75 kDa; amarillo, 51 kDa; naranja, 24 kDa.

Módulo Q: verde, 49 kDa; violeta, 30 kDa; azul, PSST; cian, TYKY. Módulo P_D: azul oscuro, ND5; cian, ND4. Módulo P_P: lila, ND2; rojo, ND4L; naranja, ND6; amarillo, ND3; rosa, ND1. **C**) Agrupamientos hierro-azufre en el brazo periférico. Tomada de (Zickermann *et al.*, 2015).

El Complejo II (Figura 12) forma parte tanto del sistema OXPHOS como del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCAC), transformando el succinato a fumarato, y además oxida el FADH₂ a FAD transfiriendo los electrones liberados al CoQ₁₀. Se trata de un complejo heterotetramérico constituido por 4 subunidades codificadas por el genoma nuclear (SDHA, SDHB, SDHC Y SDHD) y su ensamblaje es asistido por dos factores de ensamblaje (SDHAF1 y SDHAF2). Las subunidades SDHC y SDHD están embebidas en la membrana mitocondrial interna, mientras que SDHA y SDHB sobresalen hacia la matriz mitocondrial (Koopman *et al.*, 2013).

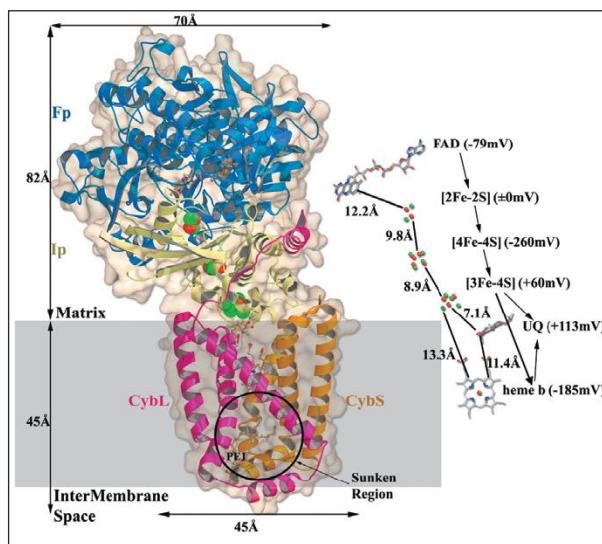


Figura 12. Succinato: ubiquinona oxidorreductasa. Modelo de la estructura del Complejo II mitocondrial. La proteína de unión a FAD (SDHA) se representa en azul. La proteína con los agrupamientos hierro-azufre (SDHB) se muestra en color crema. Las proteínas transmembrana SDHC y SDHD se ven en rosa y naranja, respectivamente. A la derecha se ven los grupos prostéticos que constituyen la ruta de transferencia de electrones (FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-3S]). Las flechas indican el flujo de transferencia de electrones a la CoQ₁₀. Tomada de (Sun *et al.*, 2005).

El CI y CII pueden donar electrones al CoQ₁₀, pero como se ha comentado previamente existen otras enzimas que pueden donar electrones al CoQ₁₀. Estas incluyen las ETF ubiquinona oxidorreductasa, la glicerofosfato deshidrogenasa y la dihidroorotato deshidrogenasa. Los electrones de la CoQ₁₀ son aceptados por el Complejo III y transportados hasta el Complejo IV por el transportador electrónico citocromo (cyt) c. Como en el caso del CoQ₁₀, el cyt c puede recibir electrones de fuentes alternativas durante la oxidación de aminoácidos que contienen sulfuro, como la sulfito oxidasa (especialmente en el hígado), aunque está reacción normalmente ocurre con una tasa muy baja comparada con otras entradas en la cadena de transporte electrónico.

El Complejo III (Figura 13) es un complejo dimérico y cada monómero contiene 11 subunidades, una de ellas está codificada por el genoma mitocondrial (cyt b). Se encarga de catalizar el paso de los electrones desde el CoQ₁₀ hasta el cyt c. Las subunidades CYTB, CYC1 y RISP se consideran el núcleo catalítico del complejo, responsable de la transferencia de electrones alrededor del que se ensamblan el resto de proteínas (Kim *et al.*, 2012). Su ensamblaje requiere la acción de dos factores de ensamblaje, BCS1L y UQCC.

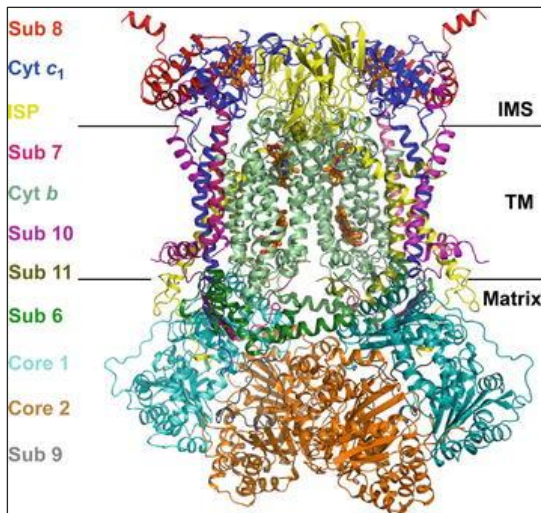


Figura 13. Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa. Modelo de la estructura dimérica del Complejo III de corazón bovino. A la izquierda se encuentran las 11 proteínas que forman cada dímero con el código de color correspondiente al color de la subunidad en la estructura. Tomada de (Chang-An Yu, 2013).

El Complejo IV dona los electrones al O₂ para formar agua. Cerca del 95% del oxígeno tomado en la respiración es consumido por el Complejo IV. El Complejo IV contiene 14 subunidades (Figura 14), tres de ellas codificadas por el genoma mitocondrial (COX I, COX II y COX III) y su biogénesis está asistida por al menos 18 factores de ensamblaje (Mick *et al.*, 2011).

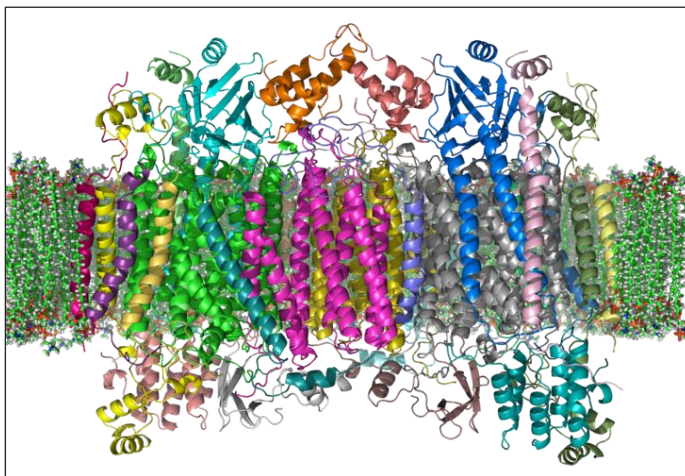


Figura 14. Citocromo c oxidasa. Modelo de la estructura del Complejo IV de corazón bovino. El espacio intermembrana queda en la parte de arriba de la imagen. Tomada de https://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_oxidase

Existen 3 sitios en la cadena de transporte electrónico (CI, CIII y CIV) en los que la energía liberada por ese transporte se usa para dirigir el flujo de H^+ a través de la MIM hacia el espacio intermembrana. Como consecuencia, se genera una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna, que consiste en una diferencia de carga eléctrica o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y una diferencia de pH (ΔpH).

El Complejo V formará ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico gracias a la energía liberada por el flujo controlado de los protones en su entrada a la matriz mitocondrial a través del complejo. Cada molécula de ATP producida requiere la entrada mediada por el Complejo V de 2.7 protones. El Complejo V está formado por 19 subunidades (Figura 15), dos de ellas codificadas por el genoma mitocondrial (ATP 6 y ATP8), y su ensamblaje requiere 4 proteínas codificadas por el genoma nuclear. El Complejo V es una máquina molecular compuesta de dos motores rotatorios (F_0 y F_1), que interconvierten la energía química de la hidrólisis del ATP y el potencial electroquímico de los H^+ mediante un mecanismo rotatorio. Esto significa que el Complejo V puede tanto disipar el potencial de membrana para generar ATP como hidrolizar el ATP para transportar H^+ al espacio intermembrana a través de la MIM. Además de para generar ATP, el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y el gradiente de pH (ΔpH) se necesitan para la fusión de mitocondrias, el importe de preproteínas mitocondriales y el intercambio de metabolitos e iones con el citosol.

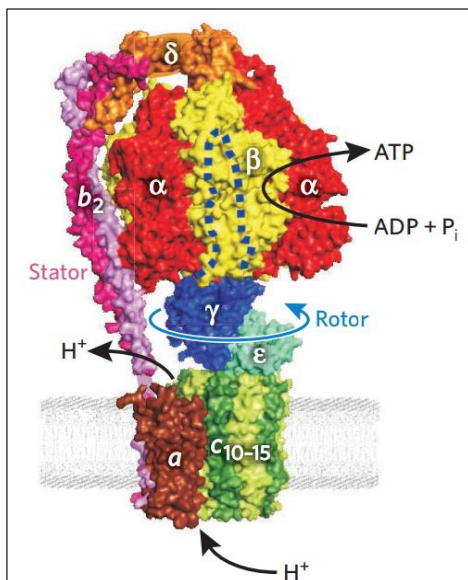


Figura 15. ATP sintasa. Modelo de la estructura de la ATP sintasa de *E. coli*. Las subunidades del rotor están en color azul y verde, las subunidades del tallo (*stator*) en amarillo y rojo. Tomada de (Weber, 2010).

1.5. Arquitectura supramolecular del sistema OXPHOS

En las mitocondrias de corazón bovino, la estequiometría de las unidades del sistema OXPHOS es de 1/1.3/3/6.7/0.5 para los Complejos I/II/III/IV/V y de 2-5 unidades de la translocasa de adenina (ANT), una proteína que media el intercambio a través de la MIM entre ADP y ATP (Lenaz & Genova, 2007). Existen evidencias experimentales que sugieren que la estabilidad y ensamblaje del Complejo I depende de la interacción con otros complejos OXPHOS (Schagger *et al.*, 2004). Además, se requiere el Complejo III para mantener el Complejo I (Acin-Perez *et al.*, 2004) y deficiencias en el Complejo IV reducen la función del Complejo I (Suthammarak *et al.*, 2009). En células de pacientes humanos, la presencia de una subunidad truncada en el Complejo IV desestabiliza no sólo el Complejo IV sino también otros complejos (Hornig-Do *et al.*, 2012). Por lo tanto, actualmente se trabaja con un modelo en el que los complejos OXPHOS no se distribuyen aleatoriamente por la membrana sino que se organizan en supercomplejos (respirasoma) (Acin-Perez & Enriquez, 2014; Genova & Lenaz, 2014). En esta nueva visión, el respirasoma estaría formado por los Complejos I, III y IV (Figura 16) (Chaban *et al.*, 2014). Además, el Complejo V forma oligómeros a partir de bloques diméricos que parecen estar implicados en el mantenimiento de la estructura de las crestas mitocondriales.

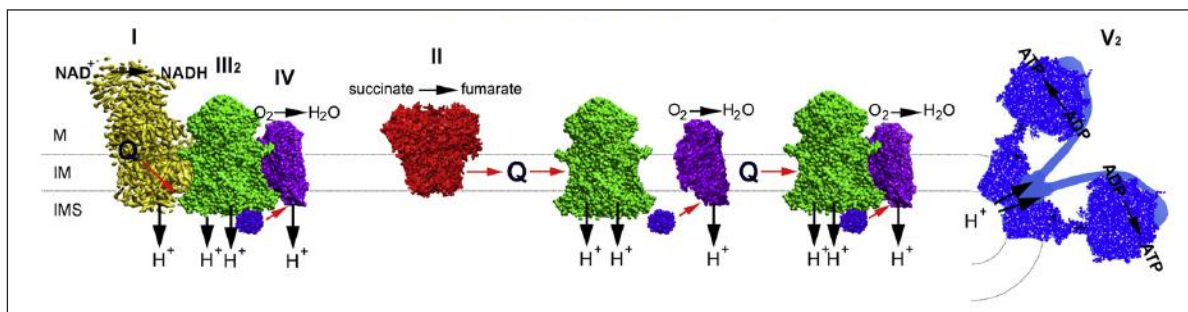


Figura 16. Esquema actual del sistema mitocondrial de la fosforilación oxidativa. Los Complejos I-III-IV están parcialmente organizados en supercomplejos o respirasomas y el Complejo V forma estructuras diméricas. Las flechas rojas indican la ruta que siguen los electrones. Tomada de (Chaban *et al.*, 2014).

1.6. Señalización retrógrada

La integración de la función mitocondrial en la célula depende de rutas de señalización anterógradas y retrógradas (Figura 17). La primera, como hemos visto en el apartado de biogénesis mitocondrial, comprende señales externas e internas que llevan estímulos al núcleo para activar programas genéticos que ajusten la función mitocondrial a las necesidades celulares. La señalización retrógrada incluye diversas

rutas de comunicación desde la mitocondria al núcleo, que pueden influir en actividades celulares en respuesta a cambios del estado funcional de la mitocondria.

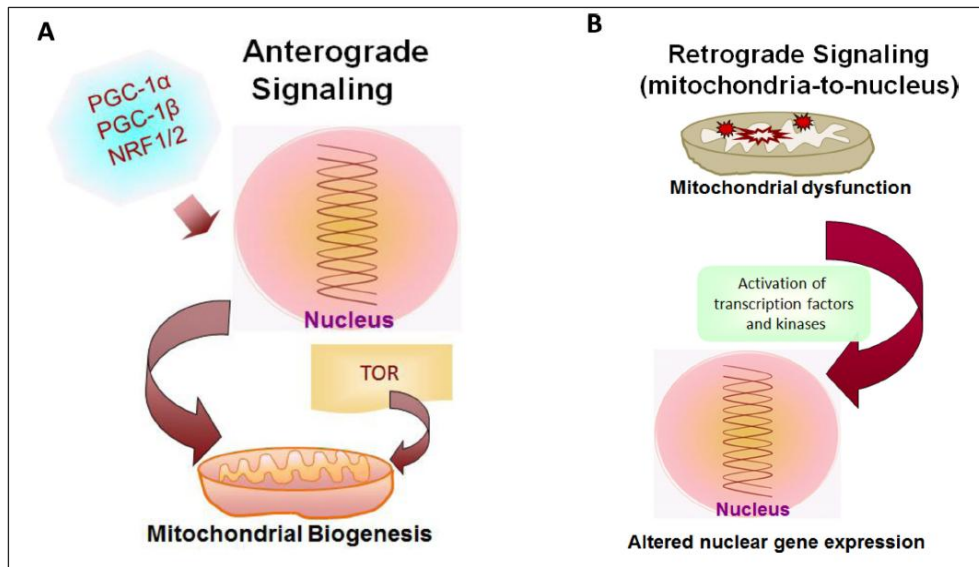


Figura 17. Rutas de señalización mitocondrial. **A)** La señalización anterógrada se transmite mediante la activación de factores transcripcionales nucleares y proteínas citoplásmicas esenciales para la biogénesis mitocondrial. **B)** La señalización retrógrada se origina a partir de una alteración en el estado funcional de las mitocondrias y se comunica al núcleo, cambiando el patrón de expresión de algunos genes nucleares. Tomada de (Guha & Avadhani, 2013).

Las rutas de señalización retrógrada que mejor se conocen son aquellas activadas por un aumento del calcio citosólico o por un aumento de ROS (Whelan & Zuckerbraun, 2013). La señalización mediada por calcio puede implicar una o varias rutas, incluyendo la activación de la calcineurina (fosfatasa responsable de la activación de NFκB y NFAT), rutas dependientes de Ca^{+2} (JNK, PKC y MAPK) y CaMK IV (proteína quinasa tipo IV dependiente de calcio/calmodulina) (Guha & Avadhani, 2013; Reinecke *et al.*, 2009; Szabadkai & Duchon, 2008).

Las ROS se producen cuando la pérdida de un electron de la cadena de transporte electrónico reduce el oxígeno molecular (O_2) dando lugar al radical superóxido (O_2^-). El superóxido tiene una vida media muy corta y es altamente reactivo, causando daño a componentes mitocondriales vitales como el mtDNA, membranas lipídicas y complejos respiratorios. El superóxido puede ser transformado en otras especies de radicales libres mediante la catálisis enzimática por superóxido dismutasas que generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este, a su vez, puede reaccionar con el hierro, dando lugar al radical hidroxilo (OH^-) (especie muy reactiva y con una vida media muy corta) o con el óxido nítrico (NO) para formar el anión peroxinitrito (especie muy reactiva y dañina).

Cuando ROS sobrepasa la capacidad antioxidante celular (dependiente de superóxido dismutasas, catalasas, glutatión peroxidasas, entre otras enzimas y también de sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos como el tripéptido glutatión (GSH)) puede resultar en peroxidación lipídica, activación del poro de permeabilidad transitorio y apoptosis. Sin embargo, bajos niveles de ROS también tienen un papel importante como mensajeros secundarios en condiciones fisiológicas (Figura 18) (Baughman & Mootha, 2006; Sena & Chandel, 2012).

Un gran número de enzimas y proteínas que están implicados en señalización son dianas de ROS o son sensibles a cambios en el estado redox. Entre ellas se incluyen: fosfolipasas A2, C y D; fosfatasa de tirosina, factores transcripcionales como NFκB y AP-1; HIF-1α; JNK, que inhibe a RXRα (Chae *et al.*, 2013); PGC-1α; y factores nucleares que modulan la expresión de genes de defensa antioxidante y del metabolismo de xenobióticos (Reinecke *et al.*, 2009). Recientemente, también se ha encontrado un aumento de microRNAs (como mir9/9*) a través de NFκB como consecuencia de ROS (Meseguer *et al.*, 2014).

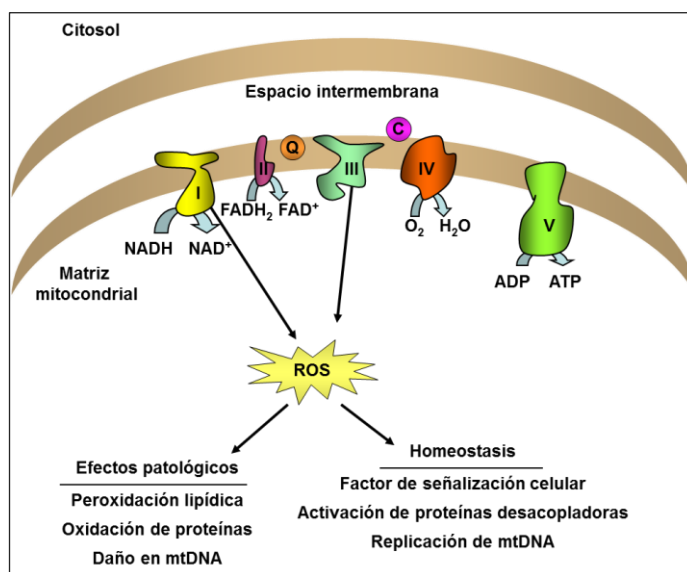


Figura 18. Producción de ROS por la cadena de transporte electrónico. Esta figura muestra un esquema de las vías mayoritarias de la producción de ROS en las mitocondrias. Los Complejos I y III exhiben propiedades termodinámicas que los hacen buenos candidatos para la reducción del O₂ a O₂⁻. Tras su producción, los ROS pueden tener efectos patológicos u homeostáticos. Modificada de (Baughman & Mootha, 2006).

Pese a que las chaperonas y proteasas mitocondriales pueden manejar normalmente el volumen existente de proteínas para importarlas, plegarlas y degradarlas, ciertas situaciones pueden sobrepasar este sistema. El aumento de proteínas mal plegadas y complejos no ensamblados puede producirse por mutaciones genéticas que alteren la secuencia de proteínas, por alteraciones en la traducción de las proteínas codificadas por el mtDNA o por condiciones del ambiente que alteren la estructura de la proteína. Como respuesta a este suceso, la maquinaria de homeostasis de proteínas mitocondriales parece inducir una señal al núcleo que aumenta su

capacidad para responder a las proteínas mitocondriales mal plegadas (UPR^{mt}) (Figura 19). El mecanismo UPR^{mt} se ha caracterizado con más detalles en *C. elegans*. En este gusano se ha estudiado como la interrupción de la traducción mitocondrial de proteínas produce un aumento específico de chaperonas y de proteasas mitocondriales, como Hsp60 y ClpP, respectivamente. Las proteínas mal plegadas en la mitocondria serían degradadas a pequeños péptidos por proteasas ClpP. Los péptidos generados inducen la expresión de genes nucleares de respuesta al estrés como los que codifican chaperonas y proteasas (incluyendo proteasas ClpP) que forman parte del mecanismo UPR^{mt} (Haynes *et al*, 2013; Jazwinski, 2013).

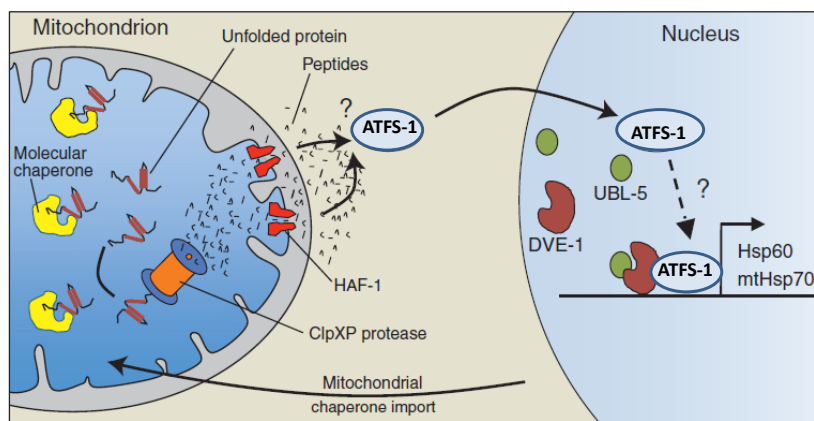
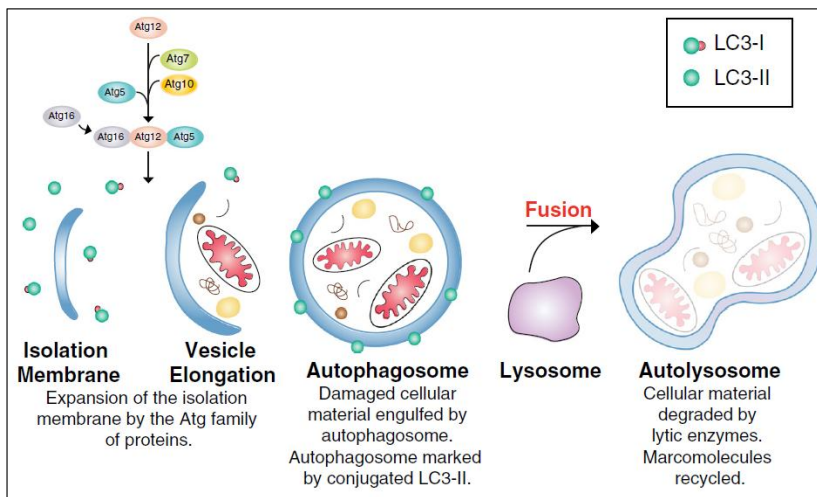


Figura 19. Factores implicados en la señalización retrógrada UPR^{mt} en *C. elegans*. La proteasa ClpXP degrada las proteínas malplegadas en pequeños péptidos que serán transportados hasta el citosol. Allí activarán el factor transcripcional ATFS-1, que con DVE-1 y UBL-5 aumentará la transcripción de las chaperonas Hsp60 y Hsp70. Tomada de (Haynes & Ron, 2010).

La autofagia es una forma de control de calidad de los componentes celulares a través de diferentes vías de señalización (Whelan & Zuckerbraun, 2013). La autofagia es un mecanismo conservado evolutivamente y, que entre otras funciones, permite eliminar o reciclar orgánulos lesionados, envolviéndolos en un autofagosoma que será conducido al lisosoma para su degradación (Figura 20). Las células pueden mantener un control de calidad de la función de los orgánulos mediante una actividad autofágica basal. Sin embargo, en situaciones de estrés, la maquinaria autofágica puede sobreexpresarse para mantener la función celular, previniendo por ejemplo la acumulación de orgánulos no funcionales y potencialmente tóxicos. La mitofagia, o autofagia específica de mitocondrias, es un proceso importante de la autofagia ya que las mitocondrias no funcionales pueden ser especialmente tóxicas a través de la generación de ROS y especies reactivas de nitrógeno y un estrés oxidativo no mitigado puede llevar a la muerte celular por necrosis o apoptosis.

**Figura 20. Ruta autofágica.**

La membrana aislante inicial se expande mediante proteínas de la familia Atg. Los orgánulos dañados quedan finalmente dentro de un autofagosoma, que se identifica por la presencia de la proteína LC3-II. Tras su fusión con un lisosoma se forma un autolisosoma, donde el material encerrado será degradado por hidrolasas. Tomada de (Kotiadis *et al.*, 2014).

La eliminación de los orgánulos dañados requiere la generación de nuevas mitocondrias. La biogénesis mitocondrial puede iniciarse al mismo tiempo que la autofagia o posteriormente. Un cierto número de señales retrógradas (ROS, Ca^{+2} , estado energético, etc.) pueden activar factores como PGC-1 α y los factores respiratorios para restablecer la homeostasis mitocondrial, evitando así el fallo bioenergético y la muerte celular.

La mitocondria también provee a la célula de metabolitos clave, como NAD^+ , ATP, SAM, α -cetoglutarato y acetil coenzima A (acetil CoA), que son cosubstratos requeridos para numerosos procesos epigenéticos (Shaughnessy *et al.*, 2014). Estos procesos epigenéticos comprenden la remodelación de la cromatina, la metilación del DNA, la modificación de histonas, el posicionamiento del nucleosoma y la expresión de RNAs no codificantes.

2. RNAs mitocondriales de transferencia humanos (tRNAs)

Como se ha comentado al principio de esta Introducción, hay una serie de enfermedades relacionadas con defectos en la modificación de los mt-tRNAs, bien por mutaciones en el genoma mitocondrial que afectan a los mt-RNAs e impiden su reconocimiento por las enzimas modificadoras (casos de los síndromes MELAS y MERRF), bien por mutaciones en el genoma nuclear que afectan directamente a las enzimas modificadoras de mt-tRNAs.

2.1. Modificaciones post-transcripcionales

Todos los tRNAs están modificados post-transcripcionalmente, lo que apoya la importancia que las modificaciones tienen para la función de los tRNAs. Comparados con los tRNAs citoplásmicos, los mt-tRNAs contienen un número menor de nucleósidos modificados (Figura 21), aunque la permanencia de estos sugiere un papel crucial de esas modificaciones. La identificación de los nucleósidos de un tRNA es laboriosa y técnicamente difícil, ya que requiere aislar cada mt-tRNA y analizarlo mediante espectrometría de masas u otro método bioquímico para determinar la especie y la posición del nucleósido modificado, lo que resulta especialmente complicado cuando el material disponible es limitado (Sissler *et al.*, 2008).

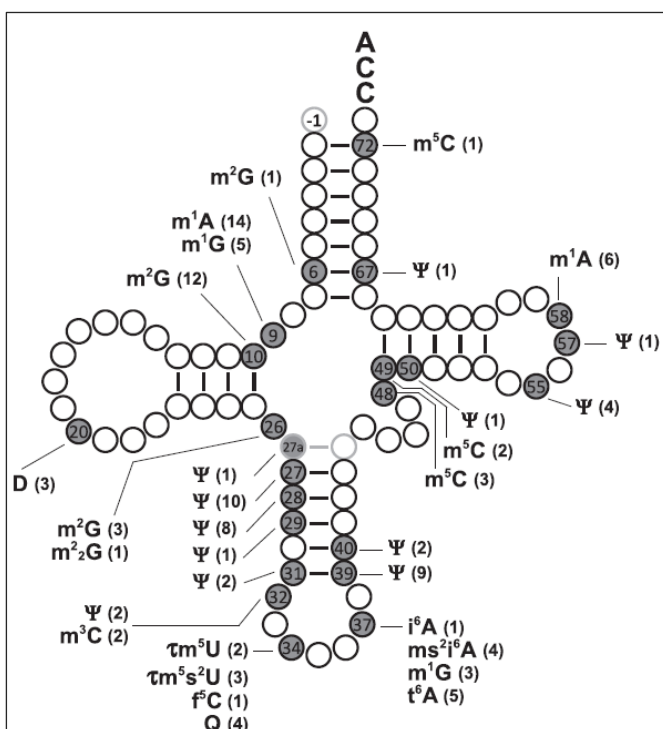


Figura 21. Modificaciones post-transcripcionales en mt-tRNAs bovinos. Especies y número de las modificaciones identificadas en 22 mt-tRNAs bovinos. Tomada de (Suzuki & Suzuki, 2014).

Las modificaciones en los tRNAs se suelen clasificar en dos subgrupos: aquellas que son importantes para la estructura general del tRNA y aquellas que son importantes para la decodificación del mRNA, porque, entre otros aspectos, estabilizan el apareamiento codón-anticodón, dan forma al lazo anticodón para facilitar su interacción con los sitios activos del ribosoma, facilitan la traslocación del tRNA desde el sitio A al sitio P del ribosoma, colaboran al mantenimiento de la pauta de lectura durante la traducción, y facilitan el reconocimiento de los tRNAs por las correspondientes aminoacil tRNA sintetasas (Armengod *et al.*, 2012). En los mt-tRNAs de mamíferos, una de las modificaciones más importantes para conseguir la estructura general de los tRNAs es la metilación que afecta a la adenina o guanina situadas en la posición 9

(m¹A9 o m¹G9) (Gao *et al.*, 2014). Esta modificación es introducida por proteínas que forman parte de la RNasaP, probablemente durante el procesamiento 5' de los tRNAs (Lee & Wei, 2005). Como ejemplo de modificaciones que afectan a la función traduccional de los tRNAs se pueden citar las que afectan a la posición 34 (primera base del lazo anticodon que apareará con la tercera base del codón, es decir, la correspondiente a la posición de tambaleo) y cuyo defecto se ha relacionado con enfermedades humanas: a) la tiolación introducida por la proteína TRMU en la posición 2 de la uridina situada en la posición 34 de los tRNAs que descodifican Lys, Glu y Gln, y b) el grupo taurinometil (τ m5) introducido presuntamente por las enzimas GTPBP3 y MTO1 en los tRNAs que descodifican Lys, Glu, Gln, Leu, y Trp.

Las modificaciones post-transcripcionales en el primer nucleótido del anticodon del tRNA juegan un papel crítico en el establecimiento del sistema de descodificación mínimo que encontramos en la mitocondria de mamíferos, puesto que los 60 tripletes que codifican aminoácidos están descodificados por 22 tRNAs. Para reducir el número de especies de tRNAs, cada una de las ocho cajas familiares es descodificada en la mitocondria por un solo mt-tRNA. Los mt-tRNAs responsables de la descodificación de codones NNA/NNG de las cajas mixtas tienen una uridina modificada en la posición de tambaleo. Algunos autores defienden que la modificación tipo xm5s2U restringe la flexibilidad conformacional de la base de tambaleo, así el reconocimiento de los codones NNR se fortalece y se previene el reconocimiento erróneo de los codones acabados en pirimidinas (NNY, Y= U y C) pertenecientes a la misma caja mixta (Suzuki & Suzuki, 2014). Sin embargo, datos estructurales y experimentos *in vivo* no apoyan esta idea y mas bien sugieren que la modificación no es importante para restringir la flexibilidad conformacional sino para modular la velocidad de lectura de los codones, de tal forma que se equipare la velocidad con que se leen los codones NNA (muy rápida si no hay modificación) con la que se leen los codones NNG (muy lenta si no hay modificación) (Kruger *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2004; Temperley *et al.*, 2010; Westhof *et al.*, 2014). Un enlentecimiento en la lectura de codones NNG podría facilitar, en determinados contextos, el cambio de pauta de lectura. De hecho, la ausencia de modificaciones s2 y xm5 en la U34 se ha demostrado que promueve el cambio en la pauta de lectura y provoca la interrupción en la síntesis de proteínas al surgir rápidamente algún codón de parada en la nueva pauta de lectura (Bregeon *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2001).

La modificación τ m5U (Figura 22) presente en los mt-tRNAs humanos (tRNA^{Leu}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu} y tRNA^{Gln}) es necesaria para el correcto apareamiento codón-

anticodon de varios tRNAs. La taurina es la parte principal de esta modificación, conectándose al uracilo en la posición 5 a través del metileno. La taurina es obtenida a través de los alimentos, mientras que la fuente de carbono del metileno es un derivado del tetrahidrofolato, probablemente el metilentetrahidrofolato (Armengod *et al.*, 2014). Esta modificación sólo ocurre en la mitocondria animal, aunque se han encontrado nucleósidos similares del tipo xm5(s2)U en bacteria y en mitocondria de levadura. En bacterias se sabe que mutaciones en los genes *mnmE* y *mnmG* impiden la formación de xm5 y se ha demostrado que las proteínas MnmE y MnmG son responsables *in vitro* de la síntesis de la modificación (Moukadiri *et al.*, 2009). En levaduras se ha demostrado que mutaciones en los genes homólogos de *mnmE* y *mnmG* impiden la formación de la modificación (Umeda *et al.*, 2005). En humanos, se sospecha que las proteínas homólogas de MnmE y MnmG (GTPBP3 y MTO1, respectivamente) son también responsables de la modificación, pero no existe hasta el momento una evidencia bioquímica que apoye esta idea (Armengod *et al.*, 2014; Suzuki & Suzuki, 2014).

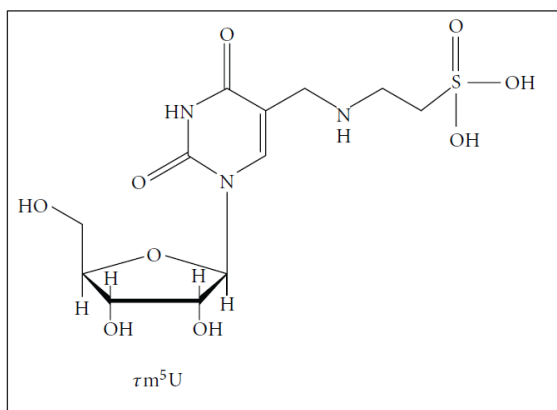


Figura 22. Estructura química de la modificación τm^5 en la uridina de tambaleo de algunos mt-tRNAs. Tomada de (Watanabe & Yokobori, 2011).

En el caso bacteriano, un complejo formado por dos proteínas (MnmE y MnmG) es suficiente y necesario para, utilizando glicina y un derivado del tetrahidrofolato, formar cmnm⁵. Los genes homólogos humanos, GTPBP3 y MTO1 respectivamente, se han propuesto para realizar la modificación τm^5 , pero todavía no se ha podido demostrar su implicación directa y el mecanismo por el que sucede la modificación no se conoce.

3. Enfermedades mitocondriales

3.1. Características generales

Los desórdenes mitocondriales son un grupo de síndromes caracterizados por alteraciones en el funcionamiento de la mitocondria. Debido al papel central que tiene la mitocondria en la fisiología celular, la patología mitocondrial puede afectar a diferentes tejidos (Figura 23). Entre las enfermedades mitocondriales se incluyen las asociadas con una disfunción de la fosforilación oxidativa (enfermedades OXPHOS) (Boczonadi & Horvath, 2014). Un subgrupo de enfermedades OXPHOS, que incluye MELAS (miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y episodios semejantes a apoplejías), MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas), fallo hepático infantil agudo dependiente de TRMU y cardiomiopatía hipertónica infantil dependiente de MTO1 y GTPBP3, se han asociado con defectos en la modificación post-transcripcional de la uridina localizada en la posición de tambaleo de ciertos tRNAs.

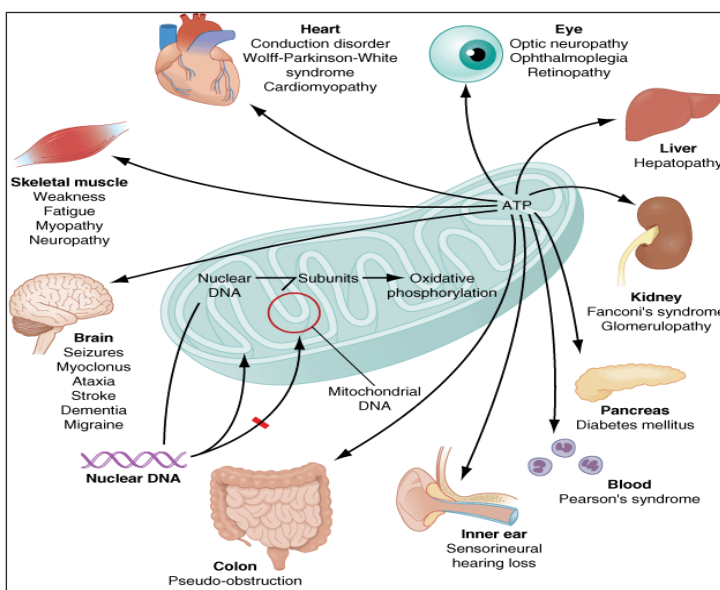


Figura 23. Doble control genético de las enfermedades mitocondriales y manifestaciones múltiples en diversos órganos. (Johns, 1995)

3.2. Síndromes MELAS y MERRF

El síndrome MELAS (miopatía, encefalopatía, acidosis láctica y episodios semejantes a apoplejías; OMIM#540000) es un trastorno neurodegenerativo raro, causado por mutaciones en el mtDNA. En el 80% de los casos se deben a la mutación A3243G y en otro 10% a la mutación T3271C. Ambas mutaciones afectan al tRNA^{Leu} (UUR) (Figura 24).

El síndrome MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas; OMIM#54500) es una encefalomiopatía mitocondrial rara caracterizada por crisis

mioclónicas. En el 80% de los casos se deben a la mutación A8343G en el mtDNA que afecta al mt-tRNA^{Lys} (Figura 24).

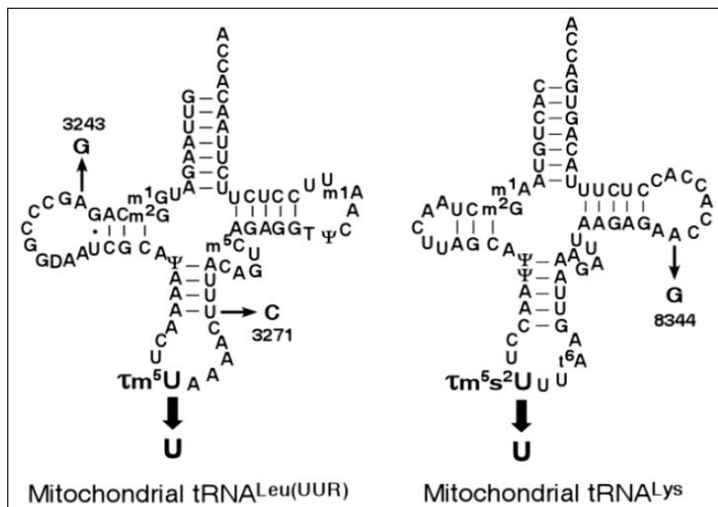


Figura 24. Estructura en forma de hoja de trébol de los tRNAs mitocondriales Leu (UUR) y Lys. Se indica la posición de mutaciones que causan MERRF (A8344G en tRNA Lys) y MELAS (A3242G y U3271C en tRNA Leu (UUR)). Tomada de (Kirino & Suzuki, 2005).

En ambos síndromes, las mutaciones en los tRNAs actúan aparentemente como determinantes negativos en el reconocimiento por parte de las enzimas (codificadas por el núcleo) implicadas en la modificación de la uridina de tambaleo (U34), puesto que las modificaciones presentes normalmente en los mt-tRNAs silvestres (controles) no se encuentran en las moléculas mutantes de tRNAs (Kirino *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2011).

Considerando que las modificaciones en la U34 optimizan la función de los mt-tRNAs en la traducción mitocondrial, se ha propuesto que la falta de modificación de los mt-tRNAs mutados en las células MELAS y MERRF produce un desorden en la descodificación responsable del inicio de la enfermedad (Suzuki *et al.*, 2011). No obstante, rutas de señalización retrógrada desde la mitocondria al núcleo (Whelan & Zuckerbraun, 2013) pueden contribuir a agravar el fenotipo. Así, en células MELAS, una ruta de señalización que implica a ROS, a RXR α (receptor retinoico X, α), JNK (quinasa terminal-N c-JUN) y al coactivador transcripcional PGC-1 α disminuye la transcripción de proteínas OXPHOS codificadas por el genoma nuclear (Chae *et al.*, 2013), mientras que una ruta dependiente de ROS y de NF κ B promueve la inducción del microRNA 9/9*, que actúa como regulador negativo post-transcripcional de las enzimas modificadoras de tRNA TRMU, MTO1 y GTPBP3, disminuyendo su expresión (Meseguer *et al.*, 2014). La inhibición de cada una de estas rutas revierte parcialmente el fenotipo MELAS (Chae *et al.*, 2013) (Meseguer *et al.*, 2014).

3.3. Fallo hepático infantil agudo dependiente de TRMU

Se han asociado mutaciones en *TRMU* (OMIM#610230) con hepatopatía infantil reversible (Boczonadi *et al.*, 2013). Este síndrome suele presentar fallo hepático agudo y, en algunos casos, miopatía y síntomas neurológicos (Gaignard *et al.*, 2013; Kemp *et al.*, 2011; Schara *et al.*, 2011; Uusimaa *et al.*, 2011; Zeharia *et al.*, 2009). También se han encontrado ocasionalmente presentaciones atípicas con daño en corazón, sistema nervioso central y músculo, pero sin que se afecte aparentemente la función normal del hígado (Taylor *et al.*, 2014). Estos fenotipos se han adscrito a defectos en la traducción mitocondrial que pueden ser compensados durante los primeros meses de vida con suplementos alimenticios (Boczonadi *et al.*, 2013; Gaignard *et al.*, 2013; Zeharia *et al.*, 2009). Curiosamente, se trata de una enfermedad mitocondrial que puede revertir en algunos casos o ser letal en otros. El nivel global de traducción mitocondrial está reducido en los fibroblastos de algunos pacientes *TRMU* en los que, paralelamente, se ha observado un defecto en la tiolación de la U34 (en posición 2) de los mt-tRNAs sustrato de *TRMU* (Zeharia *et al.*, 2009), lo que apoya la idea de que la hipomodificación de los mt-tRNAs causa un defecto en la traducción mitocondrial. Sorprendentemente, la traducción mitocondrial en fibroblastos inmortalizados de algunos pacientes *TRMU* parece ser normal, a pesar de la ausencia completa de proteína *TRMU* inmunodetectable (Sasarman *et al.*, 2011). Además, el silenciamiento de *TRMU* en células HEK-293 y mioblastos con siRNAs no afectó a la traducción mitocondrial a pesar de la disminución de la tiolación en la posición 2 de los mt-tRNAs. En cambio, sí produjo disminución en los niveles de los complejos OXPHOS I y IV en mioblastos y reducción de los niveles de ATP en células 143B (Boczonadi *et al.*, 2013; Meseguer *et al.*, 2014; Sasarman *et al.*, 2011). Podrían estar implicados mecanismos compensatorios en la mejoría de la traducción mitocondrial de las células silenciadas para *TRMU*. Sin embargo, si la traducción mitocondrial no está afectada no está claro por qué entonces se encuentran disminuidos los niveles de los complejos OXPHOS I y IV.

3.4. Cardiomiopatía hipertrófica infantil dependiente de MTO1

Mutaciones en *MTO1* (OMIM#614667) causan cardiomiopatía hipertrófica infantil y acidosis láctica, que suelen ir acompañadas por síntomas neurológicos en algunos pacientes (Baruffini *et al.*, 2013; Ghezzi *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2014). En un paciente se diagnosticó la enfermedad mitocondrial mediante análisis histoquímico y bioquímico, pese a que aparentemente no se encontraron alteraciones en corazón (Taylor *et al.*,

2014). Las mutaciones en *MTO1* están asociadas mayoritariamente con una disminución en las actividades de los complejos OXPHOS I y IV, lo que, teniendo en cuenta la función modificadora de tRNAs que tienen los homólogos de *MTO1* en bacterias y levaduras (Shi *et al.*, 2009; Umeda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Yim *et al.*, 2006), podría adscribirse a un fallo en la traducción mitocondrial. Sin embargo, la traducción mitocondrial fue normal en fibroblastos de dos hermanos afectados, a pesar de existir una reducción cercana al 50% en las actividades de los complejos OXPHOS I o IV (Ghezzi *et al.*, 2012). Ambos pacientes murieron tempranamente por una bradicardia repentina. En el caso de algunos pacientes *MTO1*, las presentaciones clínicas dependían aparentemente de la mutación, asociándose los fenotipos más severos con mutaciones que posiblemente eran más deletéreas (Baruffini *et al.*, 2013). Sin embargo, el curso de la enfermedad fue muy diferente para los pacientes de dos familias portadoras de la misma mutación, sugiriendo que diversos factores genéticos de protección/riesgo y variaciones ambientales (incluyendo la intervención farmacológica) pueden modular el fenotipo (Baruffini *et al.*, 2013). Recientemente se ha encontrado que las células de un nuevo paciente portador de una mutación *MTO1* (en homocigosis) diferente a las previas, sí presentan una traducción mitocondrial alterada (Tischner *et al.*, 2015). Por lo tanto, en células *MTO1*, al igual que en células *TRMU*, no está clara la contribución de la síntesis mitocondrial de proteínas al mecanismo de la enfermedad.

3.5. Cardiomiopatía hipertrófica, acidosis láctica y encefalopatía dependiente de GTPBP3

Un estudio internacional ha descrito recientemente el primer grupo de pacientes con un desorden mitocondrial debido a un defecto en *GTPBP3* (Kopajtich *et al.*, 2014). Al igual que lo observado con mutaciones *MTO1*, las mutaciones en *GTPBP3* están mayoritariamente asociadas con cardiomiopatía hipertrófica, acidosis láctica y deficiencia OXPHOS combinada. Un 50% de los portadores exhibieron síntomas neurológicos. También se encontraron presentaciones atípicas con afectación única del Complejo I o actividad OXPHOS normal.

El análisis de la traducción mitocondrial en fibroblastos de cuatro pacientes *GTPBP3* reveló una disminución uniforme del 20-30% respecto a los controles en tres de los casos, mientras que no reveló alteraciones en el cuarto paciente que, sin embargo, murió a los 7 meses de edad por fallo cardíaco. El mismo análisis realizado en células en las que la expresión de *GTPBP3* fue silenciada transitoriamente mediante siRNAs dio

resultados dispares. Desafortunadamente, el análisis de la modificación τm^5 de la U34 es un tarea muy complicada (Kirino *et al.*, 2004; Suzuki & Suzuki, 2007) y no ha sido llevada a cabo en la mayoría de pacientes con mutaciones *GTPBP3* y *MTO1*. Por lo tanto, la correlación de estas mutaciones con el estado de modificación de los mt-tRNAs, la síntesis mitocondrial de proteínas y otros aspectos fenotípicos y clínicos requiere estudios más exhaustivos que permitan su clarificación.

En un trabajo previo (Villarroya *et al.*, 2008), se demostró que el silenciamiento del gen *GTPBP3* en células HEK-293 mediante transfección transitoria con siRNAs reducía la tasa de consumo de oxígeno ($\approx 30\%$), el contenido de ATP intracelular ($\approx 40\%$) y la síntesis mitocondrial de proteínas ($\approx 20\%$, analizada mediante un pulso con leucina- ^3H y contaje de centelleo de la radioactividad asociada a la proteína), mientras que la degradación se incrementaba levemente. Además, el silenciamiento producía disminución del potencial de membrana y aumento en los niveles de ROS.

En esta tesis doctoral, hemos construido un modelo celular donde *GTPBP3* está silenciado de forma estable para poder así caracterizar mejor el fenotipo asociado con el defecto en *GTPBP3* y dilucidar parte de los mecanismos adaptativos y mal-adaptativos que se relacionan con la patogénesis de la enfermedad.

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis es dilucidar las repercusiones de la inactivación de GTPBP3, una proteína implicada en la modificación de los mt-tRNAs, en la función mitocondrial. El logro de este objetivo nos permitirá avanzar en el conocimiento de las rutas de señalización retrógrada mitocondria-núcleo y en los mecanismos que subyacen en enfermedades asociadas con defectos en la modificación de los mt-tRNAs.

Los objetivos concretos fueron:

- a) Construir un modelo celular deficiente en *GTPBP3* en las células HEK-293 donde el silenciamiento estable de *GTPBP3* se consigue mediante shRNAs.
- b) Analizar el estado de modificación de los tRNAs sustrato de GTPBP3 y MTO1 en las líneas celulares silenciadas para *GTPBP3*.
- c) Caracterizar el fenotipo de los modelos celulares construidos en cuanto a la función mitocondrial. Específicamente, estudiar la actividad de complejos OXPHOS, síntesis de ATP, potencial de membrana, respiración, producción de ROS, morfología y volumen mitocondrial, número de copias del DNA mitocondrial, crecimiento celular y actividad autofágica.
- d) Estudiar la repercusión que la inactivación de GTPBP3 tiene en la traducción mitocondrial y biogénesis/estabilidad de los complejos OXPHOS.
- e) Analizar los cambios en el patrón de expresión de genes nucleares relacionados con el fenotipo encontrado y las rutas de señalización retrógrada que puedan explicarlos.

Metodología

A. MATERIALES

1. Material biológico y medios de cultivo

1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Para el silenciamiento estable de *GTPBP3* se utilizaron cuatro plásmidos que contenían una secuencia shRNA prediseñada específica contra el gen *GTPBP3* humano (SABioscience SureSilencing shRNA catálogo ID #KH17194H) junto con un control negativo que contenía un shRNA con una secuencia artificial sin diana en el genoma humano (Tabla 1).

Plásmido	Descripción
pIC 1435	Plásmido control negativo Sure silencing shRNA (Amp ^R) GGAATCTCATTCGATGCATAC
pIC 1436	Plásmido Clon 1 Sure silencing shRNA (Amp ^R) CGTGGAGGCCTATATCGATTT
pIC 1437	Plásmido Clon 2 Sure silencing shRNA (Amp ^R) TCCTCCTGGTGCTGAACAAGT
pIC 1438	Plásmido Clon 3 Sure silencing shRNA (Amp ^R) CGGCCACTACAAGCAGTCAAA
pIC 1439	Plásmido Clon 4 Sure silencing shRNA (Amp ^R) GACCTTATCCACGCGGAAACA

Tabla 1: Plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de *GTPBP3*.

Estos plásmidos poseen un promotor U1 constitutivo, que recluta la RNA polimerasa II que transcribirá el shRNA y el gen de resistencia a higromicina (Figura 25). Si esta parte del plásmido se integra mediante recombinación en una zona transcripcionalmente activa obtendremos una línea celular modificada y estable en el transcurso de las generaciones, mientras que si no se integra el plásmido se perderá puesto que las células utilizadas no poseen el antígeno T del virus SV-40 (Virus del Simio 40).

2. Material químico y bioquímico

2.1. Reactivos

Todas las enzimas y reactivos químicos usados en este trabajo fueron de grado apto para biología molecular y cuando se requería aptos para cultivo celular. La mayoría fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: GE Healthcare, Invitrogen, MERCK, Lifetechnologies, Panreac, Promega, Roche y Sigma.

2.2. Material para electroforesis de RNA y proteínas

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida-urea para la resolución de tRNAs se prepararon utilizando una mezcla de acrilamida-bisacrilamida 19:1 (40%, p/v) proporcionada por Amresco. El SDS utilizado para la preparación de los geles se obtuvo de USB; la urea, el APS y el TEMED para la polimerización de los geles fueron de Merck.

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE se prepararon utilizando una mezcla de acrilamida-bisacrilamida en proporción 29:1 (40%, p/v) que fue proporcionada por Amresco, N, N, N',N'-tetrametiletenamina (TEMED) y persulfato amónico, ambos de Bio-Rad . Los geles nativos de poliacrilamida en gradiente (BN-PAGE) fueron los Bis-Tris Novex NativePAGE 3-12% de Lifetechnologies. Los marcadores de masa molecular para RNA y proteínas fueron de BioDynamics Laboratory Inc y Fermentas, respectivamente.

2.3. Extracción y purificación de DNA y RNA

Para la purificación de los plásmidos a mediana escala se empleó Genopure Plasmid Midi Kit y para el estudio del DNA mitocondrial se extrajo el DNA total de las células humanas con DNA Isolation Kit for Cells and Tissues ambos de Roche.

Para la extracción de RNA total o pequeño a partir de las células humanas se utilizó Trizol (Invitrogen) o el kit NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel), respectivamente.

Para la extracción de tRNA a partir de *E. coli* se utilizaron columnas Nucleobond (AX500) y para la purificación específica de un tRNA se utilizaron columnas de afinidad HiTrap Streptavidin HP (GE Healthcare).

2.4. Material para las reacciones de PCR y oligonucleótidos

Para la mezcla de reacción de la PCR cuantitativa (qRT-PCR) se utilizó Power SYBR Green Mix, transcriptasa inversa y un inhibidor de RNasas, todos ellos proporcionados por Applied Biosystems. Los oligonucleótidos cebadores fueron proporcionados por Sigma (excepto los específicos de GTPBP3 que fueron suministrados por SaBiosciences), y se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Nombre del gen	Oligonucleotido	Secuencia (5'→3')	Ensayo
GTPBP3	GTPBP3 Sab	GTPBP3 SaBioscience RT ² qPCR primer assay	qRT-PCR
	GTPBP3.3-Fw	GAGCTAGCTGCAGTGTGTGG	qRT-PCR
	GTPBP3.3-Rv	GCCAGGTCTTTTGACTGCTT	qRT-PCR
Actina	Actina-Fw	TGAGCGCGGCTACAGCTT	qRT-PCR
	Actina-Rv	TCCTTAATGTCACGCACGATT	qRT-PCR
Thioxiredoxina-1	Thioxiredoxina-1-Fw	GCCTTGCAAAATGATCAAGC	qRT-PCR
	Thioxiredoxina-1-Rv	TTGGCTCCAGAAAATTCACC	qRT-PCR
Thioxiredoxina-2	Thioxiredoxina-2-Fw	CGCCATTGAGTATGAGGTGTCA	qRT-PCR
	Thioxiredoxina-2-Rv	CCACCACGTCCCCATTCTT	qRT-PCR
Peroxiredoxina-3	Peroxiredoxina-3-Fw	GGCGTTCCAGTATGTAGAAACACA	qRT-PCR
	Peroxiredoxina-3-Rv	GCTGGACTTGGCTTGATCGT	qRT-PCR
Peroxiredoxina-5	Peroxiredoxina-5-Fw	CAAGGCGGAAGGCAAGGT	qRT-PCR
	Peroxiredoxina-5-Rv	CACCAGCGAATCATCTAGTAATAAGTCT	qRT-PCR
UCP2	UCP2-Fw	CATCGGCCTGTATGATTCTG	qRT-PCR
	UCP2-Rv	TGGAATCGGACCTTTACCAC	qRT-PCR
C20ORF7	C20ORF7-Fw	GCCGACCAAATTTGACTACC	qRT-PCR
	C20ORF7-Rv	GGGGGAAATTTCTGGGTATG	qRT-PCR
NUBPL	NUBPL-Fw	GGGTGGAGTCGGAAAATCTACTAC	qRT-PCR
	NUBPL-Rv	TGGCCTTGGACGAATCGT	qRT-PCR
NDUFAF3	NDUFAF3-Fw	GGGCATTGCTGTGGAAGTG	qRT-PCR
	NDUFAF3-Rv	GCCTTCATGACACAGGAAGTTG	qRT-PCR
NDUFAF4	NDUFAF4-Fw	CCTCTGTCGCTCCCAGACA	qRT-PCR
	NDUFAF4-Rv	GCTTTTCATCTTTACGAGCAATCTC	qRT-PCR

NDUFB8	NDUFB8-Fw	CTACGAACCTTACCCGGATGAT	qRT-PCR
	NDUFB8-Rv	CATGGATCTCTCATGCTGTGA	qRT-PCR
DUFS3	NDUFS3-Fw	CACAAGCAGCTCTCAGCTTT	qRT-PCR
	NDUFS3-Rv	TTGAAGCAGGACACCTGAAC	qRT-PCR
MPC1	MPC1-Fw	TGACATTCATGAGATTTGCCTACA	qRT-PCR
	MPC1-Rv	TGAGCTGGGCTACTTCATTTGTT	qRT-PCR
GLUT1	GLUT1-Fw	CATCAACGCTGTCTTCTATTACTC	qRT-PCR
	GLUT1-Rv	ATGCTCAGATAGGACATCCA	qRT-PCR
PFK1	PFK1-Fw	GCCGACTGGGTTTTTATTCCT	qRT-PCR
	PFK1-Rv	ACGAGAACCACGGGTCCTT	qRT-PCR
LDHA	LDHA-Fw	GCCTGTATGGAGTGAATGAA	qRT-PCR
	LDHA-Rv	CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG	qRT-PCR
LDHB	LDHB-Fw	GGGAAAGTCTCTGGCTGATGAA	qRT-PCR
	LDHB-Rv	CTGTACAGAGTAATCTTTATCGGC	qRT-PCR
CPT1	CPT1-Fw	TCCTCCAACCTCACATTCAG	qRT-PCR
	CPT1-Rv	GGTGTCTGTCTCCTCTCC	qRT-PCR
LCAD	LCAD-Fw	AAGTGATGTTGTGATTGTAGTTG	qRT-PCR
	LCAD-Rv	GAATAGTTCTGCGGTATCCTG	qRT-PCR
MCAD	MCAD-FW	AATTAGTGAAGAATTGGCTTATGG	qRT-PCR
	MCAD-Rv	ACATCAATGGCTCCTCAGTC	qRT-PCR
ASCT2	ASCT2-Fw	GAGGAATATCACCGGAACCA	qRT-PCR
	ASCT2-Rw	AGGATGTTTCATCCCCTCCA	qRT-PCR
SN2	SN2-Fw	GAGTTGCGGCCACTTCAG	qRT-PCR
	SN2-Rw	TCCATTCATCTTTGGATCCTG	qRT-PCR
GLS-1	Glutaminase-Fw	GCATACACTGGAGATGTGTCTGC	qRT-PCR
	Glutaminase-Rw	TGTCCAAAGTGTAGTGCTTCATCC	qRT-PCR
COX II	COX II-Fw	CGATCCCTCCCTTACCATCA	qPCR
	COXII-Rv	CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT	qPCR
SDHA	SDHA-Fw	TCTCCAGTGGCCAACAGTGTT	qPCR
	SDHA-Rv	GCCCTCTTGTTCCCATCAAC	qPCR
mt-tRNA^{Lys}	mt-tRNA ^{Lys} dig	TGGTCACTGTAAAGAGGTGTTGGT	Northern blot

mt-tRNA^{Leu(UUR)}	mt-tRNA ^{Leu(UUR)} dig	GGAATTGAACCTCTGACTGTAAAGTTTAAAG	Northern blot
mt-tRNA^{Val}	mt-tRNA ^{Val} dig	GAAATCTCCTAAGTGTAAAGTTGGGTGCTTTG	Northern blot
tRNA^{Lys(UUU)}	5tRNA ^{Lys(UUU)} coli-dig	ACCAACTGAGCTAACGACCC	Northern blot
tRNA^{Lys(UUU)}	Biotin-tRNA ^{Lys(UUU)}	Biotin- TGGTGGGTCGTGCAGGATTCGAACCTG	Aislamiento tRNA

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

2.5. Material para transfección y selección de células humanas

Para la transfección de células humanas se utilizó el reactivo comercial FuGene 6 de Roche. Para la selección de las células que silenciaban establemente GTPBP3 y el control negativo se utilizó higromicina B, proporcionada por Invivogen, a concentración final de 200 µg/ml. Los discos de clonaje utilizados fueron de 3 mm (Z374431, Sigma).

2.6. Material para *Western blot*

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Amersham Biosciences y papel Whatmam 3MM-Chr de Fisher Scientific. Para verificar la transferencia se utilizó rojo Ponceau S, proporcionado por Sigma. Para la inmunodetección se utilizaron los anticuerpos primarios que se muestran en la tabla 3. Los anticuerpos policlonales secundarios anti-*goat* (A5420), anti-*rabbit* (A6154) y anti-*mouse* (A4416) conjugados con peroxidasa fueron de Sigma. Para el revelado de las muestras se utilizó el sistema de quimioluminiscencia Lumi-Light de Roche.

Complejo	Anticuerpo Primario	Proteína	Procedencia (Referencia)
Complejo I	Anti-NDUFB8	NDUFB8	Santa Cruz Biotechnology (sc-65237)
	Anti-NDUFS3	NDUFS3	Santa Cruz Biotechnology (sc-58393)
	Anti-ND1	ND1	Abnova (H00004535-A01)

Complejo II	Anti-70 kDa	SDHA	Molecular Probes (A11142)
Complejo III	Anti-Core1	UQCRC1	Invitrogen (459140)
Complejo IV	Anti-COXII	COX-II	Molecular probes (A6404)
	Anti-COXIV	COX-IV	Cell Signaling (4850)
Complejo V	Anti-Complex V	β Subunit	Knecht 1984
	Anti-GTPBP3-His	GTPBP3	Villarroya 2008
	Anti-UCP2	UCP2	Santa Cruz Biotechnology (sc-6525)
	Anti-MPC1	MPC1	Abcam (ab74871)
	Anti-Porina	Porina	Abcam (ab343)
	Anti-fosfo-AMPK α (Thr172)	P-AMPK	Cell Signaling (2535)
	Anti-AMPK α	AMPK	Cell Signaling (2532)
	Anti-LC3	LC3	Cell Signaling (2868)
	Anti-Actina	Actina	Sigma (A2066)

Tabla 3: Anticuerpos primarios usados en este trabajo.

2.7. Material para *Northern Blot*

Los RNAs fueron transferidos a membranas de Nylon cargadas positivamente (Mannheim Boehringer). La hibridación con las sondas marcadas con digoxigenina se realizó con el tampón Dig Easy Hyb (11603558001) de Roche. Para su detección se

empleó el anticuerpo anti-digoxigenina (11093274910) y el reactivo CDP-Star (11685627001) ambos de Roche.

2.8. Material para citometría de flujo

Para el análisis del potencial de membrana mitocondrial se utilizó el fluorocromo MitroTacker Red de Invitrogen. Los fluorocromos dihidroetidio (HE) y dihidrorodamina-123 (DHR-123) para determinar los niveles de ROS fueron de Sigma.

2.9. Material para la medida de ATP intracelular

Para la medida del ATP se utilizó el kit ATP bioluminescence assay kit HSII de Roche y placas de 96 pocillos blancas con el fondo transparente de Corning Costar Corporation.

2.10. Radioisótopos

El trabajo con radioisótopos se llevó a cabo en la instalación radiactiva de 2ª categoría del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) (CSN/AIN/05/IRA/2685/07), mediante protección con pantallas de metacrilato de 2 cm de espesor y con un contador de radiactividad Geiger-Müller.

El isótopo radiactivo utilizado fue [³⁵S] del mix "EasyTagTMEXPRESS ³⁵S-Protein Labeling Mix" (actividad específica >1x10³ Ci/mmol) suministrado por PerkinElmer.

3. Instrumentación científica

Los ensayos realizados se llevaron a cabo utilizando los siguientes instrumentos de laboratorio:

- Cabina de flujo laminar: Telstar Bio-II-A.
- Electroforesis de DNA: cubetas de Owl, fuentes eléctricas de Amersham y transiluminador Multiimage Light Cabinet de Alpha Innotec.
- Termocicladores PTC-100 y PTC-150 de MJ Research.

- PCR cuantitativa: Step One Real-Time PCR System de Applied Biosystems.
- Electroforesis de proteínas: sistema Mini-Protean SE 250 de Hoeffler y fuentes eléctricas de Amersham.
- Transferencia de proteínas: tanque de transferencia húmeda de Bio-Rad.
- Centrífugas: Sorvall RC-58 con rotores GSA y SA-300, Hereaus Biofuge 22R y Eppendorf 5810R.
- Espectofotómetros: Unicam UV-Visible de Hellios- λ , Nanodrop ND-1000 de Nanodrop Technologies y Spectra Max M5 de Molecular Devices.
- Citómetro: Cytomics F-500 de Beckman-Coulter.
- Electrodo de tipo Clark YSI 5300A Biological Oxygen Monitor de YSI.

Además, se utilizaron otros instrumentos habituales en un laboratorio de biología celular como micropipetas, fuentes de electroforesis, balanzas, incubadores, estufas, pHmetro, etc.

4. Programas informáticos

- Windows Office para el tratamiento de textos.
- GraphPad Prism para el análisis estadístico descriptivo e inferencial.
- Primer3 y Primer Express para el diseño y análisis de oligonucleótidos para PCR.
- Step One software 2.0 para el tratamiento de datos de PCR cuantitativa.
- Cytomics RXP para el análisis de los datos de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo.
- ImageQuant para el análisis densitométrico.
- EndNote para manejo de referencias e indexación.

B. MÉTODOS

1. Técnicas microbiológicas

1.1 Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas

Para el cultivo rutinario de *E. coli* se usó LBT (Luria-Bertani broth con timidina 40 µg/ml) y LAT (LBT con agar Difco 20 g/l). Cuando se requería antibiótico, se añadía ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 80 µg/ml. El crecimiento de los cultivos se determinó mediante turbidometría, midiendo la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (DO₆₀₀).

Para la conservación de las cepas bacterianas se utilizaron glicerizados y *stabs*. Los glicerizados se realizaron en criotubos añadiendo DMSO 10% al cultivo, que se congeló en nitrógeno líquido y luego se almacenó en un congelador de -80 °C. Los *stabs* se realizaron a partir de cultivos líquidos que se sembraron por picadura sobre medio Nutrient Broth (Oxoid) depositado en tubos. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad.

1.2. Preparación de células competentes

Una vez las células habían crecido en LBT hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0.6 se enfriaron en hielo. A continuación, se centrifugaron a 2300 g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en CaCl 0.1 M frío. Las células se incubaron 30 minutos en hielo, se volvieron a centrifugar y resuspender en CaCl 0.05 M y glicerol 20%, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

1.3. Transformación de las cepas bacterianas

La transformación se realizó poniendo en contacto 150 µl de células competentes y 0.1 µg de DNA plasmídico. La mezcla se incubó en hielo 20 minutos y después se realizó un choque térmico de 2 minutos a 42 °C. Se volvió a incubar 5 minutos la mezcla en hielo, se añadió LBT y se mantuvo en agitación durante 90 minutos. Por último, las bacterias se sembraron en medio selectivo y se incubaron 24 horas a 37 °C.

2. Cultivo de células humanas

2.1. Cultivo de las líneas celulares

Las células humanas HEK-293 fueron cultivadas en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado (a 56 °C durante 30 minutos) y penicilina G 100 U/ml y mantenidas a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂. Las células se despegaron del frasco de cultivo con tripsina-EDTA durante 2 minutos a 37 °C y luego se recogieron con medio MEM con suero para inactivar la tripsina.

La densidad celular fue determinada al microscopio óptico mediante cámara de conteo (hemocitómetro Bürker). Se contaron las células presentes en 4 áreas de 25 cuadrículas por duplicado. La media aritmética del conteo multiplicado por un factor de 10⁴ proporcionaba el número de células por mililitro. Al mismo tiempo, se determinó la viabilidad con la prueba de exclusión del azul tripán, para lo cual las células se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de cultivo y se tomó una alícuota de 50 µl en un tubo eppendorf. Dicha alícuota, se diluyó a la mitad con una solución del colorante azul tripán 0.4%. En las células viables, con membrana intacta, no se incorpora dicha molécula; por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas, permitiendo distinguir entre las células vivas y las muertas por la presencia de color azul. Finalmente se tomaba el volumen adecuado de suspensión celular y se sembraba sobre las placas donde se iba a realizar el experimento.

La congelación de las células (para su conservación) y descongelación se realizaron usando condiciones estándar. Para la congelación, se tripsinizaron, se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en suero bovino fetal inactivado con un 10% de DMSO y se guardaron en un criotubo en la cámara de congelación con isopropanol a -80 °C. Después de 24 horas, los viales se sacaron de la cámara y se dejaron a -80 °C, y tras 2 o 3 días se introdujeron en nitrógeno líquido. Para la descongelación, las células se resuspendieron en medio de cultivo atemperado asegurando la dilución del DMSO, se centrifugaron a 100 g durante 10 minutos a 18 °C y se resuspendieron en medio completo sembrándose en frascos de cultivo de superficie adecuada.

2.2. Transfección de plásmidos

La línea celular HEK-293 se utilizó en el ensayo de transfección permanente. Las células fueron transfectadas con los plásmidos shRNA (0.5 µg/ml) mediante el uso del

reactivo de transfección FuGene 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. La selección con antibióticos de los clones positivos se inició 24 horas después de la transfección, con el antibiótico higromicina B a 200 µg/ml.

2.3. Curvas de crecimiento

La determinación del tiempo de duplicación (DT), tiempo que tarda una población en duplicarse, se llevó a cabo mediante curvas de crecimiento. Para realizar este ensayo, se utilizaron placas de microcultivo de 6 pocillos. El experimento se realizó durante 5 días, sembrando un pocillo para cada día y para cada condición, con 15×10^4 células de la línea celular sujeta a estudio. Todas las células se sembraron en el mismo medio. La proliferación celular se realizó por recuento de células viables diariamente usando una cámara Bürker. El tiempo de duplicación de la población se obtuvo por regresión exponencial <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

2.4. Cálculo de la dosis letal 50

Con el fin de evaluar la capacidad de supervivencia de las células silenciadas en presencia de cloranfenicol o cicloheximida, que inhiben la síntesis de proteínas mitocondriales o citosólicas, respectivamente, se realizaron ensayos de citotoxicidad indirectos mediante el cálculo de la dosis letal 50 (LD50) (Moreno-Loshuertos *et al.*, 2011).

Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (200 µl de medio/pocillo) a una densidad de 3×10^3 células/ml. Cuando las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial, se expusieron a distintas concentraciones de la droga a evaluar durante 48 horas. Una vez eliminada la droga, se permitió que las células se recuperasen durante otras 48-72 horas con el fin de distinguir entre las células viables que son capaces de proliferar y aquellas que todavía viven pero ya no se pueden dividir. Las células supervivientes se determinaron indirectamente mediante el kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay según las instrucciones del fabricante.

El cálculo de la dosis letal 50 (LD50: dosis de droga necesaria para que la supervivencia celular se reduzca a la mitad), se llevó a cabo representando gráficamente

la viabilidad celular frente a la dosis de droga ensayada y ajustando la gráfica a una ecuación exponencial de pendiente negativa.

2.5. Diálisis del Suero Fetal Bovino (FBS)

En el proceso de diálisis se utilizaron las membranas 7Spectra/Por® Diálisis Membrana MW CO: 3500 (SPECTRUM® LABS.COM) con tamaño de exclusión igual o menor que 3.5×10^3 kDa, en tampón fosfato (PBS: NaCl 9 g/l, K_2HPO_4 0,5M y KH_2PO_4 0,5M) a 4 °C y con agitación.

El manejo de las membranas debe realizarse en condiciones estériles. La diálisis se llevó a cabo sumergiendo las membranas (conteniendo el FBS) en un recipiente con PBS a 4 °C y con agitación, haciendo un total de 10 cambios de 5 l de PBS (relación tampón/suero de 100/1) cada 2 o 12 horas (cuando coincidía con las noches), durante 2 días. Finalmente, las membranas se vaciaron en un recipiente estéril, el FBS dializado fue filtrado a través de un filtro de 0.22 μ m de tamaño de poro, alicuotado y conservado a -20 °C.

3. Procedimientos

3.1. Aislamiento de DNA y RNA

3.1.1. Aislamiento de DNA

Tanto para la purificación de los plásmidos a mediana escala como para el estudio del DNA mitocondrial se extrajo el DNA con los kits referidos en el apartado de materiales 2.3 Extracción y purificación de DNA y RNA, según las instrucciones del fabricante en ambos casos, las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop y se guardaron a -20 °C.

3.1.2. Aislamiento de RNA total

Una vez que los cultivos celulares alcanzaron el 90% de confluencia, se extrajo el RNA total mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante

(Chomczynski & Mackey, 1995). Para ello 1 ml del reactivo fue añadido directamente en la placa de cultivo. Se desprendieron las células con la ayuda de un raspador, la mezcla fue transferida a un tubo eppendorf y, tras esperar 5 minutos, se añadieron 200 μ l de cloroformo. Pasados 5 min, se centrifugó a 12×10^3 g durante 15 min a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. La fase acuosa se mezcló con 500 μ l de alcohol isopropílico y tras 10 min se centrifugó a 12×10^3 g por 10 min a 4 °C. Posteriormente, se lavó el precipitado 2 veces con 1 ml de etanol al 75%, centrifugando cada vez a 7.5×10^3 g a 4 °C y eliminando el alcohol con ayuda de una pipeta. Se centrifugó otro minuto extra para conseguir eliminar todo el alcohol posible. Se dejó secar el precipitado y se disolvió con agua libre de RNasas. Por último, las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop y se guardaron a -80 °C.

3.1.3. Aislamiento de RNA pequeño total

Para el aislamiento de RNA pequeño se utilizó el Kit NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por último, las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop y se guardaron a -80 °C.

3.1.4. Purificación de tRNA específico

Para obtener tRNA específico, se extrajo el tRNA total y a continuación el tRNA específico fue separado del resto de tRNAs mediante cromatografía de afinidad basada en la unión biotina-estreptavidina siguiendo el método descrito por (Suzuki & Suzuki, 2007).

Para obtener tRNA total de *E. coli* las cepas correspondientes en cada caso se crecieron en medio Luria-Bertani a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria y se recogieron mediante centrifugación a 7.5×10^3 g durante 10 minutos a 4 °C. Las células fueron lisadas y el RNA total obtenido (Emilsson & Kurland, 1990) se resuspendió en tampón R200 (Tris- H_3PO_4 100 mM pH 6.3, etanol 15% y KCl 200 mM) y se añadió a las columnas Nucleobond (AX500) equilibradas con el mismo tampón. Las columnas se lavaron con 6 ml de tampón R200 y 2 ml de tampón R650 (igual que R200 pero conteniendo 650 mM KCl). La elución del tRNA total se consiguió con 7 ml de tampón R650 y posteriormente, se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol frío mediante centrifugación a 4 °C durante 45 min a 7.5×10^3 g. Los precipitados se lavaron dos veces

con etanol 70% frío, se secaron y fueron resuspendidos en tampón de unión (NaCl 1.2 M, HEPES 30 mM pH 7.5 y EDTA 15 mM pH 8).

El tRNA específico se purificó a partir del tRNA total. El tRNA total se pasó varias veces por la columna de afinidad HiTrap Streptavidin HP (1 ml, de GE Healthcare) previamente inmovilizada con el oligonucleótido biotinilado (complementario a la secuencia del tRNA a purificar) hibridando específicamente a 72 °C. La columna se lavó 2 veces a temperatura ambiente con el tampón (NaCl 0.1 M, HEPES 2.5 mM pH7.5 y EDTA 1.25 mM pH 8). Finalmente, se eluyó el tRNA con el tampón (0.02 M NaCl, 0.5 mM HEPES pH7.5 y 0.25 mM EDTA pH 8) a 72 °C. El tRNA específico fue precipitado con etanol y resuspendido en agua. Por último, se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop y se alicuotaron guardándose a -20 °C.

3.2. Análisis mediante APM-Northern Blot

El protocolo se realizó como ha sido descrito previamente para el análisis del nivel de tiolación de los mt-tRNAs (Meseguer *et al.*, 2014). Esencialmente, el RNA total (7.5 µg) se corrió en un gel del poliacrilamida al 15%, urea 7M y APM (cloruro de mercurio fenil N-acrilamida) 10 µg/ml, posteriormente se transfirieron a membranas de Nylon cargadas positivamente. La pre-hibridación e hibridación con las sondas marcadas con digoxigenina se realizó con el tampón Dig Easy Hyb de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tRNA^{Lys} se detectó con un oligodeoxinucleótido marcado con digoxigenina (tabla 2). Posteriormente, se realizó la inmunodetección con el anticuerpo anti-digoxigenina y el reactivo DCP-Star de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3. Digestión *in vitro* de los RNAs pequeños humanos y el tRNA^{Lys} nativo de *E. coli*

Para la reacción de digestión de los RNAs pequeños humanos con angiogenina se mezclaron 1 µg de RNA pequeño total purificado como se indica en el apartado 3.1.3., 2.5 µg/ml de rANG (angiogenina humana recombinante), HEPES 30 mM pH 7.4, NaCl 30 mM y BSA 0.01 %. Las reacciones de digestión del tRNA^{Lys} de *E. coli* contenían

0.6 µg de tRNA^{Lys} nativo purificado, 12.5 µg/ml de rANG, 30 mM HEPES pH 7.4, 30 mM NaCl y 0.01 % de albumina de suero bovino.

Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 0, 1, 2 o 3 horas y se pararon añadiendo 5 µl de tampón de carga (Gel Loading Buffer II, Lifetechnologies). Los productos resultantes de la digestión de los RNAs humanos y de *E. coli* se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (del 15% y 10% respectivamente) con urea 7 M. Seguidamente se transfirieron a membranas de Nylon cargadas positivamente. La pre-hibridación e hibridación con las sondas marcadas con digoxigenina se realizó con el tampón Dig Easy Hyb de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los mt-tRNA^{Lys}, mt-tRNA^{Leu(UUR)} y mt-tRNA^{Val} humanos y el tRNA^{Lys} de *E. coli* se detectaron con oligodeoxinucleótidos específicos para cada tRNA marcados con digoxigenina (tabla 2). Posteriormente, se realizó la inmunodetección con el anticuerpo anti-digoxigenina y el reactivo DCP-Star de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.4. Medida del estado de modificación de la U34 mediante HPLC

Para determinar la composición de nucleósidos del tRNA específico purificado como se describe en el apartado 3.1.4., el tRNA se trató con nucleasa P1, fosfatasa alcalina y posteriormente los nucleósidos resultantes se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) como se ha descrito previamente (Martinez-Vicente *et al.*, 2005). El análisis de los cromatogramas del HPLC se realizó a una longitud de onda de 314 nm para conseguir la mayor absorción de los nucleósidos tiolados. Los nucleósidos se identificaron de acuerdo a su espectro UV (Gehrke & Kuo, 1989) y su comparación con los controles apropiados.

3.5. Cuantificación de los niveles de mRNAs mediante qRT-PCRs

Para cuantificar los niveles de mRNAs se realizaron qRT-PCRs en un paso, analizando la fluorescencia emitida por el fluoróforo "SYBR Green". Al final de cada reacción, se analizaron las curvas de disociación para comprobar que únicamente se amplificaba el producto de PCR específico. Paralelamente, al mRNA objeto de estudio se determinaron los niveles de mRNA para actina para normalizar los niveles de cDNA obtenidos en cada muestra. La mezcla específica de la reacción, para un volumen final de 20 µl, estaba compuesta por los correspondientes oligonucleótidos específicos 200

nM, (tabla 2), SYBR Green Power mix (1x), retrotranscriptasa (0.25 U/ μ l), inhibidor de RNAsas (0.1 U/ μ l) y RNA total de cada condición (50-300 ng). La reacción se realizó según las condiciones de la tabla 4 en una placa de 48 pocillos. La cuantificación relativa del cDNA, y por tanto del mRNA, se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_t$.

Condiciones de PCR		
T (°C)	Tiempo	Ciclos
48	30 minutos	1
95	10 minutos	1
95	15 segundos	40
60	1 minuto	

Tabla 4: Programa RT-PCR empleado para el análisis de los niveles de mRNA.

3.6. Cuantificación del número de copias de mtDNA mediante qRT-PCRs

Para la cuantificación del mt-DNA se realizó una RT-PCR a partir de DNA total como se ha descrito previamente (Moreno-Loshuertos *et al.*, 2011). La mezcla específica de la reacción, para un volumen final de 20 μ l, estaba compuesta por oligonucleótidos específicos 200nM (tabla 2) , SYBR Green Power mix (1x) y DNA total (3 ng). La reacción se realizó según las condiciones de la tabla 5 en una placa de 48 pocillos. Paralelamente, se determinaron los niveles de DNA del gen *SDHA* para normalizar los niveles de DNA obtenidos. La cuantificación relativa de mtDNA se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_t$.

Condiciones de PCR		
T (°C)	Tiempo	Ciclos
50	2 minutos	1
95	10 minutos	1
95	15 segundos	40
60	1 minuto	

Tabla 5: Programa RT-PCR empleado para el análisis de mt-DNA.

3.7. Obtención y preparación de extractos celulares

Para obtener los extractos celulares totales en los que se iba a determinar los niveles de proteínas específicas, se dejaban crecer las células en placas de 55 cm² de superficie hasta una confluencia del 95%. Las células se lavan con PBS y se recogen raspando la base de la placa con la ayuda de un raspador ("Cell Lifter"), en tampón RIPA de lisis con inhibidores de proteasas (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, deoxicolato sódico 0.5%, PMSF 1 mM, leupeptina 100 μM y EDTA 2 mM, pH 8). A continuación, las muestras se sometieron a 8-10 ciclos de congelación-descongelación, agitando con vortex cada vez. Seguidamente los extractos se centrifugaron a 13x10³ g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células intactas y los restos nucleares, determinando la concentración proteica del sobrenadante por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cuando se iba a inmunodetectar una fosfoproteína en el extracto celular se preparaba un tampón de lisis con inhibidores de fosfatasas para preservar las fosforilaciones (Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, NaCl 0.01 M, Nonidet P-40 1%, glicerol 15%, PMSF 1 mM, leupeptina 100 μM, Na₂VO₄ 2 mM, NaF 100 mM y Na₄P₂O₇ 20 mM).

3.8. Purificación de mitoplastos y mitocondrias

3.8.1. Obtención de mitoplastos

Para la obtención y purificación de mitoplastos con digitonina se partió de 1 placa de 55 cm² de superficie confluyente aproximadamente un 90%. Las células se tripsinizaron, se recogieron en medio completo y se mantuvieron en hielo a partir de este momento y durante todo el proceso de la purificación.

Las células se sedimentaron por centrifugación, el pellet celular se lavó con PBS frío mediante resuspensión y centrifugación. A continuación, el pellet se resuspendió en un volumen arbitrario de PBS frío y se cuantificó la cantidad de proteínas. Se volvieron a sedimentar las células y se resuspendió el pellet en el volumen de PBS frío que diese una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Seguidamente, se añadió un volumen igual de digitonina a 4 mg/ml en PBS, se mezcló e incubó en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se diluyó con PBS frío hasta un volumen final de 1.5 ml y se centrifugó a 1x10⁴ g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de PBS mediante resuspensión y centrifugación en las condiciones anteriores, para eliminar la digitonina residual.

El pellet de mitoplastos obtenido se usó para los experimentos de Blue-Native, por ello se resuspendió en el mismo volumen inicial de tampón BN (1.5 M ácido aminocaproico y 50 mM Bis-Tris pH 7) y añadir una décima parte del volumen de BN de lauril maltoside (10%). Resuspender con la pipeta cuidadosamente, evitando la formación de espuma. A continuación se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por lo menos un día para facilitar la extracción que se llevó a cabo tras la descongelación, e incubación en hielo durante 20 minutos. Finalmente se centrifugó a $2 \times 10^4\text{ g}$ durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se recogió el sobrenadante donde se cuantificó la concentración de proteínas.

3.8.2. Obtención de mitocondrias

Para la obtención y purificación de mitocondrias, se partió de, al menos, 5 placas de 150 cm^2 de superficie prácticamente confluentes. Las células se tripsinizaron, se recogieron en medio completo y se mantuvieron siempre en hielo a partir de este momento.

Las células se sedimentaron por centrifugación y el pellet celular fue lavado 2 veces con NKM 1x frío (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 7.5 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 7.4) mediante resuspensión y centrifugación. A continuación, el pellet de células se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante, como mínimo, 10 minutos para facilitar la ruptura celular. El proceso puede pararse en este momento dejando las células a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La fracción mitocondrial se aisló por homogeneización mecánica del pellet de células en tampón hipotónico, del modo que se describe a continuación. El pellet celular congelado se resuspendió en tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM pH 7.2), en una proporción aproximada de volúmenes tampón:células de 7:1. La suspensión de células se incubó durante 2 minutos en hielo antes de ser homogeneizada mediante 8–10 pases ("pops") en homogeneizador Potter-Elvehjem (volumen 5 ml). 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 $1 \times 10^3\text{ g}$ durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para eliminar los núcleos y las células que no se han roto.

El sobrenadante se resuspendió y se centrifugó a $1 \times 10^4\text{ g}$ durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El pellet de mitocondrias obtenido se resuspendió en el medio adecuado según el uso que se le fuese a dar.

3.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunodetección

Las proteínas de las diferentes muestras se separaban mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida-SDS, en condiciones de amperaje constante (50 mA por gel). El porcentaje de acrilamida que se utilizó fue del 10 al 16.5%. A las muestras se les añadía un volumen de tampón de carga para electroforesis (2x) (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, SDS 5% y azul de bromofenol 0.2%, pH 6.8) y se calentaban a 90 °C durante 10 minutos. Las proteínas se transferían electroforéticamente a una membrana de PVDF durante 16 horas a 4 °C, empleando un tanque de transferencia húmeda y un tampón de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192 mM, pH 8.3).

Para verificar la eficacia de las transferencias, las membranas se teñían 10 minutos con rojo Ponceau al 0.5% en ácido acético al 1% y se desteñían en tampón T1 (Tris-HCl 100 mM y NaCl 150 mM). A continuación, la membrana se sometía a un tratamiento con solución bloqueante (leche deshidratada al 5% en T1) durante 1 hora. En el caso de querer detectar una fosfo-proteína la solución bloqueante se realiza con BSA al 5% en T1.

Posteriormente, para la detección de las proteínas específicas, las membranas se incubaban durante 16 horas a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 3), en T1 con BSA al 3%. Tras dos lavados de 10 minutos en agitación constante con T1-T (T1 conteniendo un 0.05% de Tween-20), la membrana se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, a una dilución 1:5000 en T1 con BSA al 3%. Tras 2 lavados con T1-T de 10 minutos y uno más con T1 también de 10 minutos, las proteínas se visualizaban mediante detección por quimioluminiscencia, utilizando el sistema Lumi-Light de Roche en las condiciones que indicaba el fabricante.

3.10. Inmunopurificación de anticuerpos

Para obtener una mayor reactividad del anticuerpo obtenido en el laboratorio para la proteína GTPBP3 se realizó la inmunopurificación de dicho anticuerpo. Para ello, se realizó una electroforesis SDS-PAGE donde se cargó la proteína humana GTPBP3 recombinante sin los 35 primeros aminoácidos y con una etiqueta de 6 histidinas en un gel de poliacrilamida al 10%. El resultado de la electroforesis se transfirió a una

membrana de PVDF, como se ha indicado en el apartado anterior (3.9). Posteriormente la membrana se incubó con un tratamiento bloqueante (leche desnatada en PBS al 5%) durante 50 minutos. Tras 3 lavados con PBS de 5 minutos, se fija la membrana a una tira de parafilm limpia (situada en el fondo de una placa Petri) y se incuba en agitación 2-3 horas con el suero que se quiere inmunopurificar (200 µl de suero por 1x3 cm de membrana). Durante la incubación debe observarse regularmente notando que el suero está bien repartido por la membrana. A continuación, se elimina el suero y con ello los anticuerpos no pegados, se lava la membrana con PBS durante 10 minutos y se eluyen los anticuerpos incubando durante 20 minutos la membrana con 200 µl del tampón de elución (glicina 0.2 M, EGTA 1 mM pH 7.2). Finalmente, se recoge el sobrenadante y se neutraliza con un volumen de Tris base 100 mM. La membrana se puede lavar con PBS (3 veces), secar y guardar a 4 °C para un segundo uso.

3.11. Síntesis *in vivo* de proteínas mitocondriales

La síntesis de proteínas mitocondriales *in vivo* se realizó siguiendo el método de Chomyn (Chomyn, 1996). Para ello, las células se sembraron en placas de 21 cm² dos días antes del experimento en un número adecuado para conseguir un 70-80% de confluencia en el momento del ensayo.

Primeramente se retiró el medio de cultivo de las placas y tras un lavado con PBS se adicionó medio DMEM, FBS 10%, uridina 50 µg/ml durante 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con DMEM libre de metionina y cisteína adicionado con FBS dializado 10%, piruvato 0.11 mg/ml, uridina 50 µg/ml. Seguidamente, se retiró el medio de las placas y se volvió a incubar con el mismo medio suplementado con emetina 100 µg/ml (inhibidor de la traducción citoplásmica) durante 1 hora a 37 °C.

A continuación, se añadió a la placa "EasyTagTM EXPRESS ³⁵S-Protein Labeling Mix" 0.1 mCi cuya actividad específica era > 1x10³ Ci/mmol, se mezcló cuidadosamente, y se dejó incubando 1 hora a 37 °C para marcar exclusivamente las proteínas sintetizadas en la mitocondria.

Una vez transcurrido el tiempo de marcaje, se eliminó el medio de las placas, y se incubaron durante 5 minutos con medio DMEM con FBS 10%. Seguidamente se eliminó el medio de las placas, se lavaron las células con PBS y se recogieron por tripsinización y

centrifugación. El pellet celular resultante se lavó con 1 ml de PBS y se resuspendió en un volumen de Tris-HCl 10 mM pH 7.4, SDS 0.1%, PMSF 1 mM adecuado al tamaño de pellet celular, guardándose a -80° C.

Las células se rompieron mediante ciclos de congelación-descongelación mecánica (hielo seco-vórtex). Se determinó la concentración proteica del sobrenadante por el método Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y el extracto de proteínas (50 µg) se cargó en un gel desnaturante en gradiente del 15 al 20%.

3.12. Electroforesis de proteínas en gradiente exponencial de SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas mitocondriales sintetizadas *in vivo*, se realizó en un gel con gradiente exponencial de poli(acrilamida) del 15 al 20%, tal y como describe Chomyn (Chomyn, 1996), ya que permite una mayor resolución de las mismas.

El gel separador se preparó siempre el día anterior a su uso y se mantuvo tapado a 4 °C para evitar que se secase. Para preparar el gel, se montó, en un soporte vertical, un *sandwich* con dos cristales (uno de 25 x 16.5 cm y el otro de 23 x 16.5 cm), separados por espaciadores de 0.1 cm, y se sellaron los bordes laterales con agarosa. La base se selló con una mezcla con acrilamida al 20%, se vertió la mezcla en la base de sujeción de los cristales y se esperaron unos 5 minutos hasta que polimerizó completamente. Para la preparación del gel resolutivo se hicieron dos mezclas de acrilamida, una al 20% y otra al 15%, de forma independiente en dos matraces Erlenmeyer de 50 ml. Cada matraz se colocó sobre una placa agitadora de tal manera que quedaran a la misma altura, con un imán en su interior. A continuación, ambos matraces se conectaron mediante tubos a una bomba peristáltica de doble canal (Figura 26). Así, la disolución de acrilamida del 20% era bombeada hasta la abertura superior entre los dos cristales, mientras que la disolución del 15% era conducida al matraz que contenía la disolución del 20%, manteniendo en este último un volumen constante.

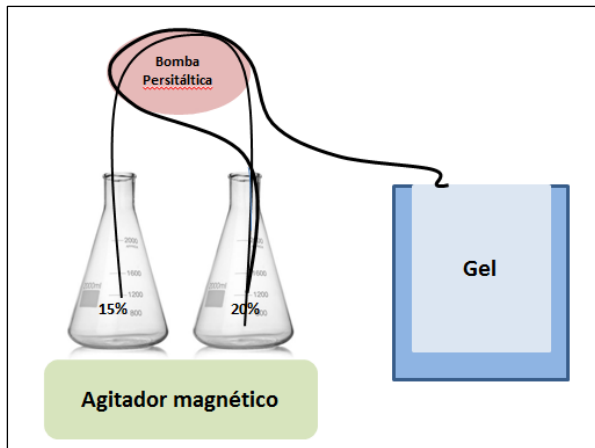


Figura 26. Esquema de montaje para crear el gel en gradiente.

De este modo, el espacio entre los cristales se llenó a una velocidad de unos 3.5 ml/minuto, hasta que faltaron unos 3 cm para llegar al borde superior. Se añadió 1 ml de isopropanol muy lentamente y se dejó polimerizar el gel. Antes de guardarlo a 4° C hasta el día siguiente, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua destilada, se llenó con tampón de separación 1x, y se cubrió con plástico hasta el día siguiente. Mientras el gel se atemperaba, se preparó el gel concentrador y se vertió la mezcla del gel concentrador introduciendo el peine hasta la polimerización del gel durante unos 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el peine, se montó el gel en el soporte apropiado para la electroforesis y se llenaron los reservorios superior e inferior de la cubeta con tampón de electroforesis 1x (Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M y SDS 1%).

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 4x y se cargaron en el gel, que se corrió a amperaje constante de 20 mA durante 30 minutos, y a 30 mA hasta una hora después de que el frente de azul de bromofenol saliese del gel (entre 7 y 8 horas).

Cuando la electroforesis hubo finalizado, se sacó el gel de entre los cristales y se fijó en una solución de metanol:ácido acético 30%:10% (v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez fijadas las proteínas, el gel se sumergió en un reactivo fluorográfico (Amplify de GE Healthcare) durante 30-45 minutos para potenciar la señal radiactiva de las proteínas. Seguidamente, se deshidrataron los geles en un secador Double-up Gel Dryer Rack de Bio-Rad conectado a una bomba de vacío, durante 2 horas a 80 °C.

Una vez seco el gel se colocó en una cassette (Kodak cassette BioMax) y se expuso con una película fotográfica a -70 °C con pantalla intensificadora (Kodak BioMax

TranScreen-LE) durante el tiempo adecuado. Pasado el tiempo de exposición, la autorradiografía se reveló de forma rutinaria en una máquina reveladora.

3.13. Electroforesis de proteínas en geles Blue Native

Tras montar el gel Bis-Tris Novex NativePAGE 3-12% en el soporte adecuado, en la cámara fría, se añadieron los tampones del cátodo A (Bis-Tris 15 mM, Tricina 50 mM y azul Coomassie Brilliant G-250 0.02% pH 7.0) y del ánodo (Bis-Tris 50 mM pH 7.0) y se limpiaron los pocillos. Las muestras, preparadas como se indica en el apartado 3.8.1 se mezclaron con un volumen (que correspondiese a la mitad del volumen usado de lauril maltoside en su extracción) de tampón de carga (azul Coomassie Brilliant G-250 5% en ácido aminocaproico 0.75 mM) y se cargaron en el gel. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 100 V hasta que las muestras hubieron entrado completamente en el gradiente del gel (~30 minutos). En ese momento, se limitó la corriente a 500 V y 15 mA, y se mantuvo así hasta que el colorante azul llegó hasta el final del gel (~14 cm). Cuando las muestras hubieron avanzado hasta la mitad del gel, se cambió el tampón del cátodo A por el B (Bis-Tris 15 mM y Tricina 50 mM, pH 7.0) para poder apreciar mejor las bandas de los complejos protéicos a lo largo del recorrido electroforético. Una vez terminada la electroforesis, se transfirieron a membrana de PVDF inmediatamente después de desmontar el gel de su soporte con tampón de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3). Para la inmunodetección se procedía como en el apartado de métodos 3.9.

3.14. Estudio de la autofagia

El nivel de autofagia de las células shGTPBP3 fue evaluado a partir de la detección de LC3-II, una proteína esencial en el proceso de autofagia y un marcador indicativo de la formación de autofagosomas. Para ello, se incubaron las células durante 1 hora en condiciones de elevada proteólisis (en PBS). Para evitar la degradación de LC3-II en los autolisosomas (lisosomas con un pH ácido resultantes de la fusión de los autofagosomas con endosomas/lisosomas) la incubación se hizo en presencia de inhibidores lisosomales (CINH₄ 20 mM y leupeptina 0.1 mM). Las células se recogieron tal como se indica en el apartado 3.7 de Métodos y se procedió a su análisis mediante *Western blot*.

3.15. Medida del ATP intracelular

La cantidad de ATP se midió por luminiscencia con el ATP Bioluminescence Kit HSII (Roche) que se basa en la emisión de luz al oxidarse la luciferina por la enzima luciferasa. Esta reacción es dependiente de ATP, que es proporcionado por las células. Para ello las células crecidas en placas de 12 pocillos (aproximadamente 3×10^5) se recogieron en el tampón para muestras proporcionado por el fabricante. Una vez resuspendidas, las células se lisaron utilizando el tampón de lisis comercial. A continuación se añadió la mezcla luciferasa-luciferina proporcionada por el kit en una proporción 1:1 (v:v) y la luminiscencia emitida se midió inmediatamente en el lector de placas Spectra Max M5 (Molecular Devices). El contenido proteico de cada muestra se determinó por el método de Lowry y los valores relativos de luminiscencia se refirieron a la cantidad de proteína de cada extracto.

3.16. Consumo de oxígeno

La tasa de respiración endógena se midió tal como ha sido descrito (Núñez *et al.*, 2005). Brevemente, las células se recogieron por tripsinización y fueron resuspendidas en medio de cultivo. A continuación, las células fueron depositadas en una cámara equipada con un electrodo de oxígeno tipo de Clark (YSI 5331A Oxygen Probe), calibrado previamente con medio de cultivo saturado de aire y suponiendo 200 μM de concentración de O_2 . Los valores se obtuvieron utilizando un dispositivo de adquisición de datos (5300A monitor, YSI).

3.17. Estudios de citometría de flujo

Las células fueron despegadas con tripsina-EDTA y resuspendidas en medio de cultivo a una densidad celular de 10^6 cels./ml. Para medir el potencial de membrana mitocondrial las células en suspensión se incubaron con de la sonda fluorescente CMXRos MitoTracker Red 100 nM durante 30 min a 37 °C, y se cuantificó la fluorescencia emitida (620 ± 20 nm) (Martin *et al.*, 2002). Para los estudios de ROS, las células se incubaron con HE 5 μM o DHR-123 5 μM , durante 30 min a 37 °C, se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron y se midió la fluorescencia emitida en la zona del rojo (620 ± 20 nm) para la HE (indicativa de los niveles de anión superóxido O_2^-) y en la

zona del verde (525 ± 20 nm) para la DHR-123 (indicativa de los niveles de H_2O_2) (Capella *et al.*, 2007). En el caso de las células sometidas a estrés oxidativo extracelular, las células se incubaron con H_2O_2 0.3 mM durante 2 horas. Después de la exposición se retiró el medio y se cuantificó la fluorescencia de DHR-123 como se ha descrito anteriormente. En todos los casos se analizaron 10^4 células y se recogieron los datos usando un citómetro de flujo Cytomics FC 500 (Beckman Coulter).

3.18. Análisis de la actividad de la catalasa, SOD y GPx

Para analizar la actividad de enzimas antioxidantes, las células fueron recogidas mediante tripsinización y resuspendidas en medio de cultivo. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 100 g, se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo. El sedimento se resuspendió en PBS con Triton X-100 0.5 % frío y se sonicó durante dos ráfagas de 15 segundos a 4 °C (Ellerby & Bredesen, 2000). Los sonicados se centrifugaron a 15×10^3 g durante 10 minutos a 4 °C y se midió la concentración de proteínas en los sobrenadantes resultantes.

La actividad enzimática de la catalasa se midió en el extracto celular por espectrofotometría siguiendo el método de Aebi (Aebi, 1984). Este método utiliza los cambios en la absorbancia a 240 nm a 25 °C de la solución de H_2O_2 10 mM en tampón fosfato, pH 7. La disminución en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa.

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó de forma indirecta siguiendo a 550 nm una reacción colorimétrica acoplada a la reacción de la xantina oxidasa: se midió la inhibición de la reducción del cyt c por el O_2^- producido en la oxidación de la xantina por la xantina oxidasa (McCord & Fridovich, 1969).

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se analizó siguiendo a 340 nm la oxidación del NADPH por la glutatión reductasa utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato (Lawrence & Burk, 1976).

3.19. Análisis de la actividad de los complejos OXPHOS

Para estudiar la actividad de los complejos OXPHOS, se aislaron mitocondrias como se describe en el apartado de Métodos 3.8.2. y se resuspendieron en tampón

fosfato 25 mM y $MgCl_2$ 5 mM pH 7.2. Las mitocondrias se rompieron tras someterlas a ciclos de congelación y descongelación mecánica (utilizando el vórtex). Los homogenados se utilizaron para determinar la actividad de los complejos OXPHOS I, II, IV, V y citrato sintasa, en un espectrofotómetro Varian Cary 300 Conc con controlador de temperatura.

El Complejo I se midió siguiendo la tasa de oxidación de NADH a 340 nm, mediante la incubación del homogenado mitocondrial a 30 °C en tampón fosfato 20 mM pH 8, NADH 200 μ M, NaN_3 1 mM, BSA-EDTA 0,1%, y ubiquinona-1 100 μ M. Se añadió rotenona a 5 μ M, inhibidor del Complejo I, para calcular la tasa de oxidación de NADH sensible a rotenona (Lopez-Armada *et al.*, 2006).

Se determinó la actividad del Complejo II siguiendo la reducción del 2,6-diclorofenolindolfenol (DCPIP) a 600 nm en tampón Tris-fosfato 50 mM pH 7, KCN 1.5 mM, succinato 32 mM y DCPIP 100 mM (Lopez-Armada *et al.*, 2006).

La actividad del Complejo IV se analizó a partir de la velocidad de oxidación de oxidación del cyt c a 550 nm, mediante la incubación del homogenado mitocondrial a 25 °C en tampón fosfato 10 mM pH 7 y cyt c reducido 80 μ M (Lopez-Armada *et al.*, 2006).

La actividad del Complejo V se midió por una reacción acoplada a ATPasa midiendo la oxidación del NADH a 340 nm a 30 °C en presencia y ausencia de oligomicina (Del Hoyo *et al.*, 2010; Soper & Pedersen, 1979). La mezcla de reacción contenía tampón HEPES-Mg 50 mM pH 8.0, NADH 0.2 mM, fosfoenolpiruvato 2.5 mM, y después se añadía 5 μ l de piruvato-quinasa (10 mg/ml) y lactato-deshidrogenasa 10 μ l (5 mg/ml) en presencia de antimicina A 10 μ l (0.2 mg/ml en etanol al 50%). La fracción sensible a oligomicina se midió añadiendo 10 μ l de oligomicina (0.2 mg/ml en etanol al 50%).

La actividad citrato sintasa se determinó a 420 nm, mediante la incubación del homogenado mitocondrial a 30 °C en Tris-HCl 75 mM pH 8.0, ácido 5,5 '-ditiobis-(2-nitrobenzoico) 100 μ M, acetil CoA 350 μ g/ml, oxalacetato 0.5 mM y Triton X-100 0.1% (Lopez-Armada *et al.*, 2006). Las actividades específicas se expresaron como $nmol \times min^{-1} \times mg \text{proteína}^{-1}$, referidas a las actividades específicas de la citrato sintasa para corregir el volumen mitocondrial.

3.20. Microscopía electrónica

Para los estudios de microscopía electrónica, las células se sembraron en cámaras Lab-Tek (Nunc). Una vez tenían la densidad celular adecuada, se lavaron y se fijaron con glutaraldehído al 3%. Las células se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio 1% durante 1 hora, se lavaron, deshidrataron, incubaron durante 2 horas con acetato de uranilo 2% y se incluyeron en Araldite (Sigma-Aldrich). Se cortaron secciones ultrafinas, tiñeron con citrato de plomo, y se examinan bajo un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

Para cada clon se analizaron 24 micrografías electrónicas de dos experimentos diferentes, que se habían seleccionado al azar y el área total del citoplasma representaba más de 500 μm^2 .

La densidad de volumen mitocondrial se estimó mediante el conteo de puntos, utilizando un test de cuadrícula doble con un espaciado de 1.5 μm . La densidad de volumen (Vv) se calcula como porcentaje de volumen:

$$Vv = (P_i/P_t) \times 100$$

P_i es el número de puntos que caen dentro de alguna estructura mitocondrial y P_t es el número de puntos que caen en el citoplasma.

El número de mitocondrias se estimó contando el número de mitocondrias en cada micrografía y refiriéndolo al área del citoplasma en cada micrografía.

4. Análisis estadístico

La comparación estadística entre los grupos se realizó mediante el test t de Student. Los datos muestran la media y el SEM de, al menos, 3 experimentos diferentes. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias se indican mediante asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$) y cuando no se encontró diferencia se indica con n.s..

Resultados

1. Obtención de células humanas silenciadas establemente para el gen *GTPBP3* (células sh*GTPBP3*)

La estrategia utilizada para abordar el estudio de la función de *GTPBP3* en humanos ha sido el silenciamiento estable del gen en células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano). En nuestro laboratorio se había realizado con anterioridad (Villarroya *et al.*, 2008) un silenciamiento transitorio de *GTPBP3* en estas células, pero este procedimiento dificultaba el abordaje de algunos aspectos de la caracterización funcional (como, por ejemplo, el estado de modificación de los mt-tRNAs) que sí se estudian en este trabajo.

Utilizamos cinco plásmidos para realizar la transfección estable, cuatro que contenían shRNAs diferentes contra *GTPBP3* (nombrados del 1 al 4 y no validados previamente) y un control negativo (CN), con un shRNA que es una secuencia artificial sin diana en el genoma humano. Tras realizar la transfección y la selección con higromicina B, obtuvimos 25 clones resistentes. En todos ellos se cuantificó el nivel de mRNA de *GTPBP3* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para determinar la eficiencia del silenciamiento en cada caso (Figura 27).

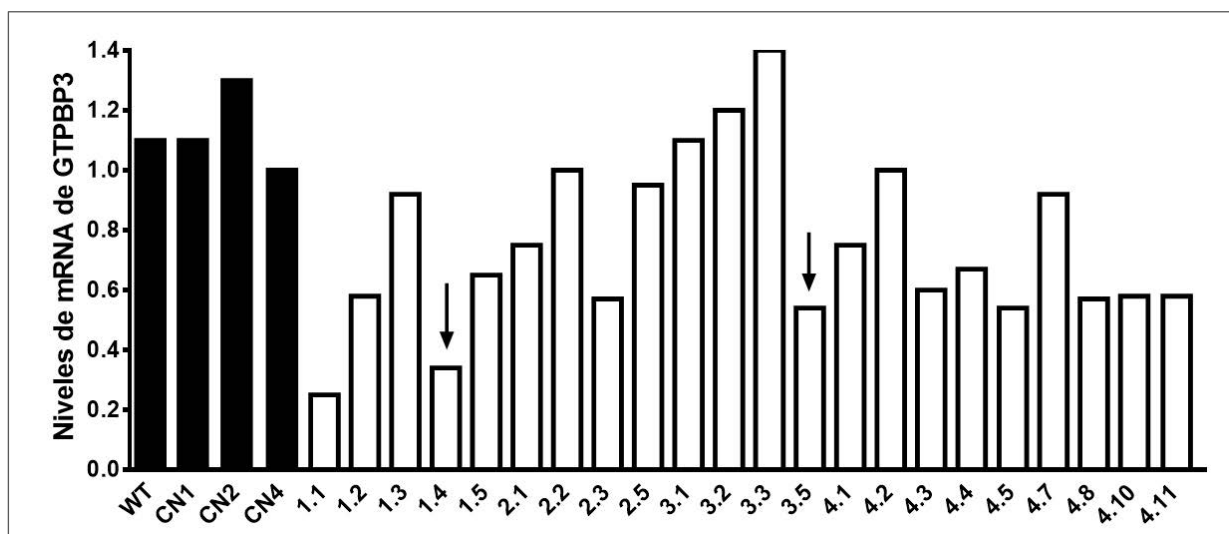


Figura 27. Análisis del silenciamiento estable de *GTPBP3* en células HEK-293. En la figura se muestran los niveles de mRNA de *GTPBP3* en los clones sh*GTPBP3* (1.1-1.5, 2.1-2.3, 2.5, 3.1-3.3, 3.5, 4.1-4.5, 4.7, 4.8, 4.10 y 4.11) en comparación con los controles negativos (CN1, CN2 y CN4) y silvestre (WT). Los datos corresponden a un experimento representativo. En la nomenclatura de los clones sh*GTPBP3* el primer número corresponde al número de plásmido utilizado (1 a 4) y el segundo a un número asignado aleatoriamente a cada clon. Las flechas indican los clones seleccionados para su caracterización.

En los clones 1.4 (sh*GTPBP3*-1) y 3.5 (sh*GTPBP3*-2) se observó una reducción significativa y altamente reproducible de los niveles de mRNA de *GTPBP3* y, por ello,

fueron seleccionados para nuestros experimentos (Figura 28). La reducción observada inicialmente en otros clones no se mantuvo en el transcurso de las generaciones y fueron desechados en el estudio.

Entre los portadores del control negativo no se observaron alteraciones destacables en los niveles de mRNA de GTPBP3. Se eligió el clon CN1 para nuestros experimentos por presentar un nivel de mensajero de GTPBP3 intermedio entre los clones obtenidos como controles negativos.

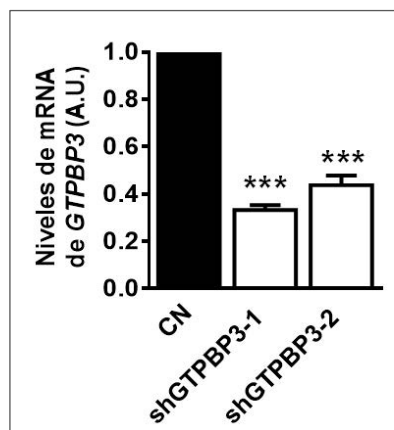


Figura 28. Eficiencia del silenciamiento de GTPBP3 en las células shGTPBP3. En la figura se muestran los niveles de mRNA de GTPBP3 en los clones shGTPBP3 seleccionados (shGTPBP3-1 y 2) en comparación con el control negativo (CN). Los datos muestran la media y el SEM de, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas de cada clon silenciado con el valor del control (** $p < 0.001$).

El silenciamiento obtenido en los clones shGTPBP3 alcanzó su nivel medio próximo al 70% en el clon shGTPBP3-1, mientras que en el clon shGTPBP3-2 fue del 60% aproximadamente. Sin embargo, la diferencia entre los clones no fue estadísticamente significativa.

1.1. Análisis del nivel de la proteína GTPBP3 en las células shGTPBP3

En los experimentos realizados previamente en el laboratorio se había podido detectar la proteína GTPBP3 en células humanas empleando un anticuerpo anti-GTPBP3 con extractos proteicos totales cuando se sobre-expresaba la proteína de interés o bien cuando se inmunoprecipitaba (Figura 29) (Villarroya *et al.*, 2008). El anticuerpo anti-GTPBP3 se obtuvo en el laboratorio a partir de suero de conejos inoculados con cuerpos de inclusión producidos por la sobre-expresión, en *E. coli*, de la proteína GTPBP3 marcada con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal.

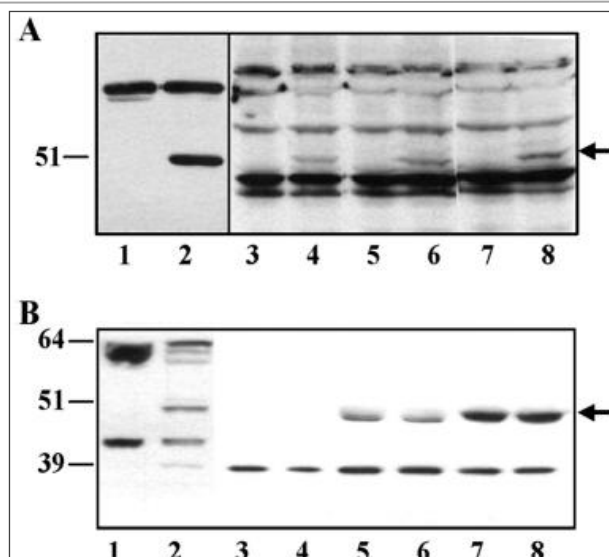


Figura 29. Expresión de GTPBP3 en células HEK-293. En la Figura se muestran los resultados obtenidos en Villarroja *et al.* (2008). **A)** Inmunodetección de GTPBP3 a partir de extractos de células HEK-293 no transfectadas (calles 3, 5 y 7), HEK-293 sobre-expresando establemente GTPBP3 (calles 4, 6 y 8) y extractos de la cepa de *E. coli* DH5α/pIC1296 crecida en ausencia (calle 1) y presencia (calle 2) de arabinosa que induce la expresión de una proteína GTPBP3 recombinante usada como referencia. La cantidad de extracto proteico cargado fue: 100 µg (1 y 2), 200 µg (3 y 4), 300 µg (5 y 6), y 400 µg (7 y 8). Las bandas inespecíficas fueron utilizadas como control de carga. La flecha marca la posición de GTPBP3. **B)** Inmunodetección de GTPBP3. Se inmunoprecipitaron extractos de células HEK-293 y HEK-GTPBP3 con anti-GTPBP3 y los precipitados fueron inmunodetectados con anti-GTPBP3 y True-blot. Calle 1, extracto total de células HEK-293 no transfectadas (100 µg); calle 2, extracto total de células HEK-GTPBP3 (50 µg); calles 3 y 4, material unido a las bolas de agarosa con anti-IgG de conejo (sin anticuerpo); calles 5 y 6, inmunoprecipitados de células HEK-293 no transfectadas; calles 7 y 8, inmunoprecipitados de células HEK-GTPBP3. La flecha marca la posición de GTPBP3.

En los experimentos mencionados, el anticuerpo se inmunopurificó utilizando una proteína GTPBP3 con la etiqueta GST. La proteína GST dimeriza y podría plegarse sobre GTPBP3, ocultando parte de los epítopos reconocidos por el anticuerpo. Quizá esto fuese la causa de una sensibilidad limitada de las preparaciones del anticuerpo inmunopurificado de esta manera, a tenor de lo observado en esta Tesis. En este trabajo se utilizó una proteína GTPBP3 sin los primeros 35 aminoácidos y con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína (HisΔ35GTPBP3) para inmunopurificar el anticuerpo anti-GTPBP3. Con el fin de determinar qué banda correspondía a la proteína GTPBP3, ya que en los experimentos anteriores se habían detectado bandas inespecíficas, utilizamos el anticuerpo inmunopurificado para la detección de GTPBP3 en extractos totales de células que sobre-expresan transitoriamente la proteína (wt+GTPBP3) y en células silvestres (wt) (Figura 30A). Este anticuerpo permitió detectar 3 bandas con masas moleculares estimadas de 56, 52 y 48 kDa. En la calle correspondiente al extracto donde se sobre-expresaba la proteína GTPBP3

(wt+GTPBP3), se observan las tres bandas: la de mayor masa molecular correspondería a la preproteína, la banda mayoritaria a la proteína mitocondrial procesada y la banda de menor masa molecular, a una banda inespecífica, puesto que se encuentra tanto en las células sobre-expresadas como en las células wt con intensidad parecida. En este panel (Figura 30A) también se ve la proteína mitocondrial procesada en células wt, aunque el nivel es mucho menor.

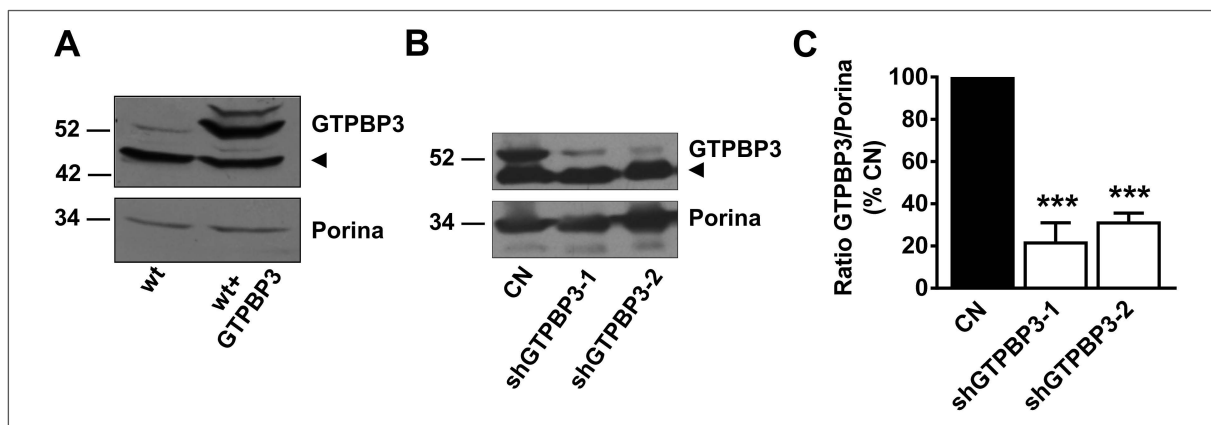


Figura 30. Determinación del silenciamiento de *GTPBP3* en las células sh*GTPBP3* mediante inmunodetección de la proteína *GTPBP3*. En la figura se muestran los niveles de las proteínas *GTPBP3* y porina, como control, mediante inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **A)** 200 μ g de extracto de proteínas totales de células HEK-293 (wt) y HEK-293 sobre-expresando transitoriamente *GTPBP3* (wt + *GTPBP3*). La flecha marca la banda inespecífica, que también sirve como control de carga. **B)** 200 μ g de extractos mitocondriales del control negativo (CN) y los clones sh*GTPBP3* (sh*GTPBP3*-1 y sh*GTPBP3*-2). **C)** Análisis densitométrico de los niveles de la proteína *GTPBP3* normalizados con los de la porina en las células sh*GTPBP3* y expresados en porcentaje respecto al control negativo (CN). Se muestran la media y el SEM. Los datos son representativos de, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas de cada clon silenciado con el valor del control (***) $p < 0.001$.

Para poder analizar los niveles de *GTPBP3* en células sh*GTPBP3*, teniendo en cuenta que el nivel de expresión y de detección en células wt era muy bajo (Figura 29A), se decidió utilizar extractos mitocondriales de las células sh*GTPBP3* y de las control (Figura 30B). Debe señalarse que en la carrera correspondiente al control (CN) sólo se detecta la proteína de *GTPBP3* de 52 kDa, es decir, la proteína procesada (sin péptido señal). Comparando la carrera correspondiente al control (CN) con las células sh*GTPBP3* (clones sh*GTPBP3*-1 y sh*GTPBP3*-2) se puede apreciar la disminución en éstas de la proteína *GTPBP3*. Cuantificando densitométricamente los experimentos realizados se halló una disminución significativa del 75% aproximadamente en el nivel de la proteína *GTPBP3* en los clones sh*GTPBP3*-1 y sh*GTPBP3*-2 (Figura 30C).

La nueva inmunopurificación del anticuerpo anti-GTPBP3 con His-GTPBP3 ha permitido obtener un anticuerpo más reactivo y la utilización de extractos de proteínas mitocondriales ha facilitado la detección de GTPBP3. Por lo tanto, estos dos cambios han sido claves para determinar el efecto del silenciamiento en los niveles de GTPBP3.

2. Estudio del estado de modificación de los tRNAs substrato de GTPBP3 y MTO1 en las células shGTPBP3

El análisis de la modificación $\tau\text{m}5$ en la U34 de los mt-tRNAs humanos es difícil de realizar debido a la relativamente baja abundancia de los mismos en relación a sus homólogos citosólicos (Sissler *et al.*, 2008) y la limitación en la cantidad de muestras que se pueden obtener. La identificación de la modificación $\tau\text{m}5$ se pudo hacer partiendo de aproximadamente 5 kg de hígado bovino (Suzuki & Suzuki, 2007) o 27 kg de placenta humana (Kirino *et al.*, 2004) (usando en ambos casos espectrometría de masas MALDI-TOFF) y entre 1 y 10 mg de células derivadas de pacientes MELAS (que poseen la mutación A3244G en el tRNA^{Leu}(UUR), cuya presencia impide la modificación de la U34), usando en este caso métodos radiactivos (Kirino & Suzuki, 2005; Suzuki *et al.*, 2002). La complejidad de las técnicas y la limitación en la cantidad de las muestras disponibles es la causa de que el estado de modificación de los mt-tRNAs no se haya analizado en los pacientes portadores de mutaciones *GTPBP3* (Kopajtich *et al.*, 2014). Por ello, no hay evidencias directas de que GTPBP3 esté implicada en la síntesis de $\tau\text{m}5$.

2.1 Digestión de los mt-tRNAs con angiogenina en las células shGTPBP3

En este trabajo hemos abordado el estudio de la modificación de los mt-tRNAs de las células shGTPBP3 mediante la digestión de los mt-tRNAs con angiogenina, una enzima miembro de la familia de la RNasa A que se ha visto que tiene actividad específica para tRNAs (Blanco *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2009; Li & Hu, 2012; Saxena *et al.*, 1992; Schaefer *et al.*, 2010; Yamasaki *et al.*, 2009). Escogimos esta estrategia porque en estudios previos se había observado que la pérdida de modificaciones específicas favorecían la digestión por angiogenina de tRNAs citosólicos de *Drosophila*, ratón y humano (Blanco *et al.*, 2014; Schaefer *et al.*, 2010). Tras la digestión *in vitro* con angiogenina de los mt-tRNAs de las células shGTPBP3-1 y del control negativo, seguido de un análisis mediante

Northern blot, encontramos que los tRNA^{Lys} y tRNA^{Leu(UUR)}, que son sustratos de GTPBP3, eran más sensibles a la angiogenina cuando se obtenían de las células shGTPBP3 que los de las células control (Figura 31,A y B). Por el contrario, no detectamos diferencias en los patrones de digestión con angiogenina de un tRNA no sustrato de GTPBP3 (tRNA^{Val}) entre las células shGTPBP3 y las CN (Figura 31C). Estos resultados sugieren que la mayor sensibilidad al corte por angiogenina de los tRNAs^{Lys} y tRNA^{Leu(UUR)} obtenidos de células shGTPBP3 se debe a la disminución del grupo τm^5 .

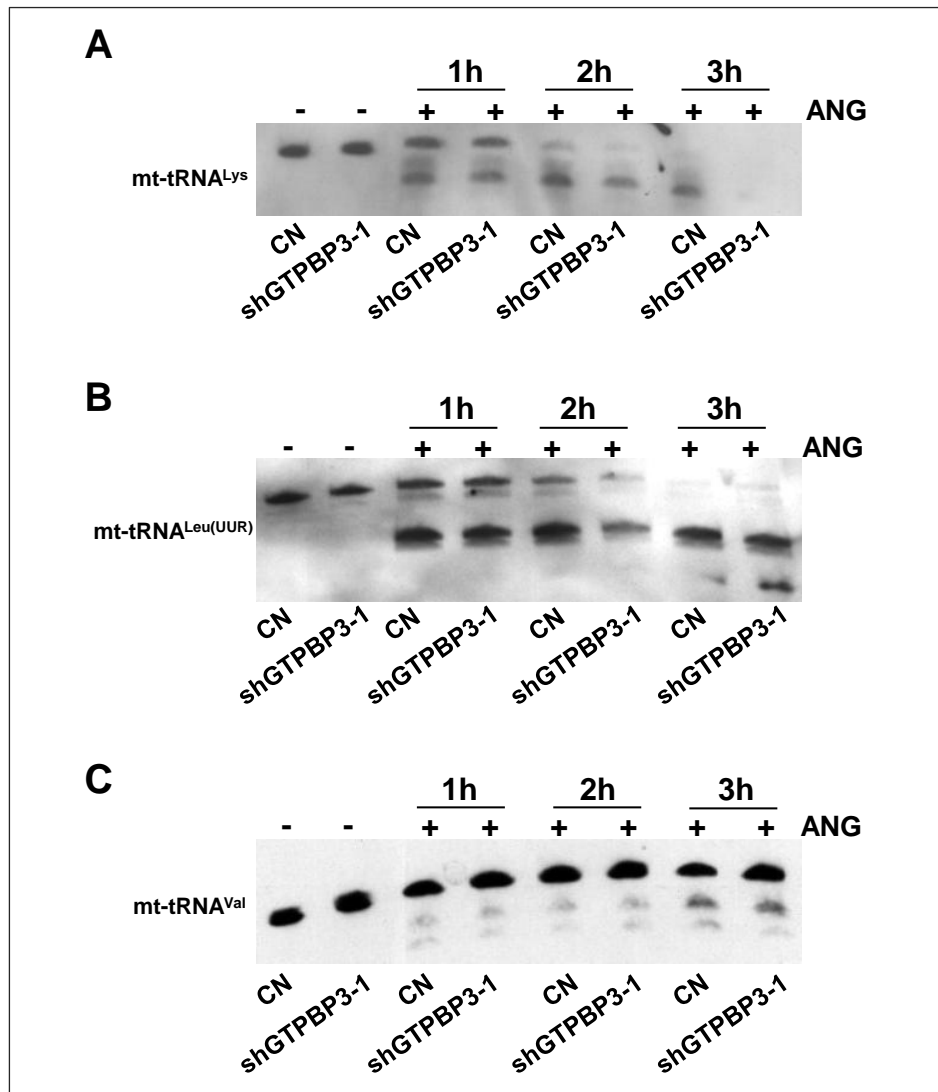


Figura 31. Alteración del patrón de digestión con angiogenina de los mt-tRNAs sustrato de GTPBP3 en las células shGTPBP3. (A, B y C) Análisis mediante Northern blot de la digestión *in vitro* con angiogenina (ANG) durante 1, 2 y 3 horas de los mt-tRNA^{Lys} (A), mt-tRNA^{Leu(UUR)} (B) y mt-tRNA^{Val} (C) a partir de RNAs pequeños purificados de las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1) y del control negativo.

También analizamos la presencia del grupo tiol en la posición 2 de la U34 (s2U) en tRNAs de células shGTPBP3 mediante geles APM. Estos geles se polimerizan en presencia de cloruro [(N-acriloil amino) fenil] mercúrico (APM), un agente que se une

específicamente a los grupos tioles causando un retraso en la migración de tRNAs conteniendo tales grupos. Tras análisis Northern con sondas específicas, observamos que el mt-tRNA^{Lys} de las células shGTPBP3 muestra niveles normales de s2U, ya que el obtenido a partir de estas células muestra el mismo retraso que el obtenido en el control negativo (Figura 32). Estos datos sugieren que la tiolación en la posición 2 ocurre independientemente de la presencia de la modificación en la posición 5, tal como también se ha observado en *E. coli* y *S. cerevisiae* (Armengod *et al.*, 2012; Umeda *et al.*, 2005).

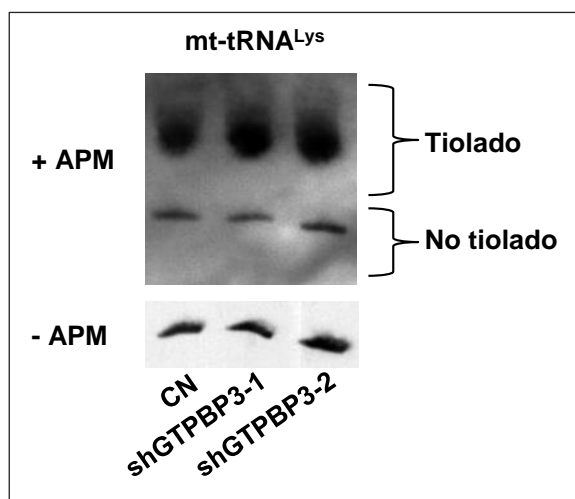


Figura 32. Nivel de tiolación en mt-tRNA^{Lys} en las células shGTPBP3. Análisis APM-Northern del estado de tiolación de los mt-tRNAs^{Lys} en células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN). Se cargó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-urea en presencia (+) o ausencia (-) de APM la misma cantidad de RNA total (7.5 µg), como se describe en (Meseguer *et al.*, 2014). Los tRNAs tiolados se detectaron como bandas retardadas en presencia de APM.

2.2. Validación del ensayo de angiogenina mediante el uso de tRNA^{Lys} de *E. coli*

Ante la imposibilidad de analizar directamente en los mt-tRNAs humanos la presencia de $\tau m5$ decidimos probar el ensayo de angiogenina con tRNAs de *E. coli* para verificar la validez del ensayo de angiogenina empleado anteriormente, ya que en este caso (al no haber limitación en la cantidad de muestra) sí que podemos determinar la composición de nucleósidos de los tRNAs mediante otras técnicas y determinar si existe correlación con los resultados obtenidos. Con tal fin usamos tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU} purificado de cepas de *E. coli* y, por un lado, lo tratamos con angiogenina mientras que, por otro lado, lo digerimos con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina bacteriana, analizando los nucleósidos resultantes mediante HPLC (Moukadiri *et al.*, 2014). Encontramos que la digestión del tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU} de *E. coli* purificado de una cepa de un mutante nulo *mnmE* ($\Delta mnmE$), que no posee la proteína MnmE (homóloga de GTPBP3) era más sensible a la digestión con angiogenina que cuando se obtenía de una cepa silvestre (Figura 33A). La mayor resistencia o sensibilidad a la angiogenina se correlaciona con la

presencia en la cepa silvestre o con la ausencia en la cepa mutante $\Delta mnmE$ de la modificación en la posición 5 de la U34, como se determinó mediante análisis de HPLC de los hidrolizados del tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU} (Figura 33B). Debe observarse que la tiolación en la posición 2 de la U34 está presente en el tRNA purificado del mutante $\Delta mnmE$, lo que indica que la tiolación en posición 2 (realizada por la homóloga bacteriana de TRMU) es independiente de la modificación realizada por MnmE en la posición 5. Los resultados obtenidos con el sistema bacteriano apoyan la idea de que la sensibilidad a la angiogenina depende de la modificación mediada por MnmE. Consecuentemente, es razonable asumir que una mayor sensibilidad a la angiogenina del mt-tRNA^{Lys} y del mt-tRNA^{Leu(UUR)} de las células shGTPBP3 es debida a la disminución de la modificación dependiente de GTPBP3. Nuestros datos suponen por tanto la primera evidencia experimental de la implicación de GTPBP3 en la modificación de los mt-tRNAs humanos. Además, el ensayo de angiogenina aparece como una estrategia asequible para evaluar cualitativamente el estado de modificación de los mt-tRNAs de pacientes portadores de mutaciones GTPBP3.

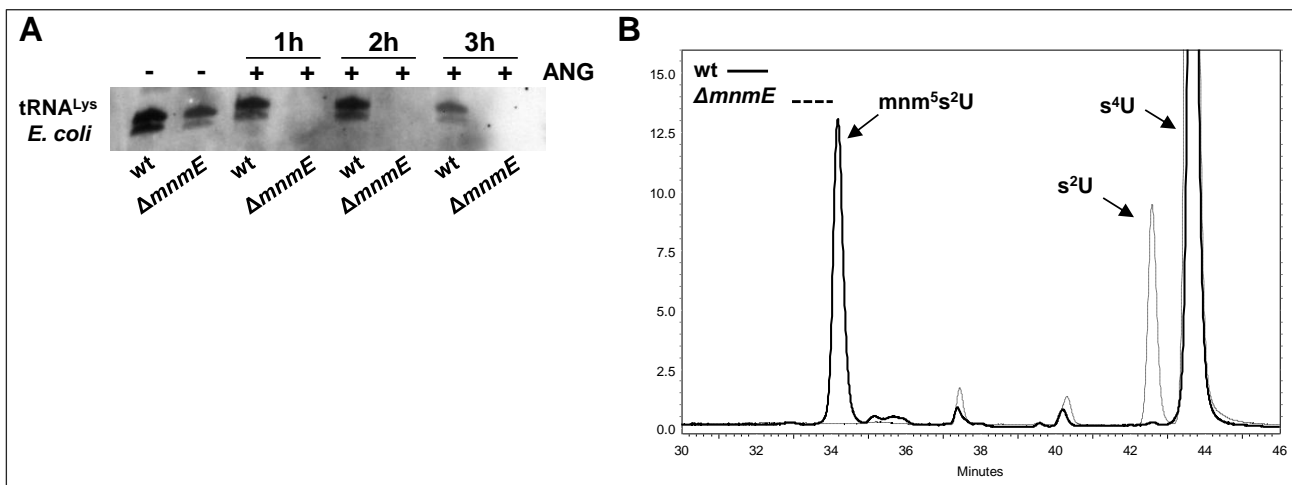


Figura 33. Validación del ensayo de angiogenina con tRNAs de *E. coli*. **A)** Análisis mediante Northern blot de la digestión *in vitro* con angiogenina (ANG) durante 1, 2 y 3 horas del tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU} purificado de una cepa silvestre (wt) y de una cepa carente de la proteína MnmE ($\Delta mnmE$) de *E. coli*. **B)** Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de los nucleósidos s²U, s⁴U y mnm⁵s²U tras la digestión con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina del tRNA^{Lys} aislado a partir de una cepa silvestre (wt, línea continua) y de una cepa carente de la proteína MnmE ($\Delta mnmE$, línea punteada) de *E. coli*. El nucleósido s⁴U se usa como control interno, ya que está presente en las mismas cantidades en ambas cepas. En el análisis por HPLC, la absorbancia se determinó a 314 nm para maximizar la detección de los nucleósidos tiolados.

3. Evaluación de la función mitocondrial en las células shGTPBP3

Como vimos en la Introducción, la función principal de la mitocondria es proporcionar la mayoría del ATP que consume la célula. Sin embargo, la mitocondria también está implicada en otras funciones importantes, como son la regulación de la homeostasis iónica, la producción y detoxificación de ROS, la apoptosis y la necrosis, el control sobre el ciclo y el crecimiento celular, la síntesis y catabolismo de metabolitos y su propio transporte a los lugares adecuados dentro de la célula. Por eso, cualquier anomalía que afecte al funcionamiento mitocondrial puede repercutir en los procesos mencionados. En este trabajo, se analiza en concreto la repercusión que el silenciamiento de GTPBP3 tiene sobre varios aspectos del funcionamiento mitocondrial.

3.1 Determinación del potencial de membrana mitocondrial en las células shGTPBP3

La mitocondria genera ATP utilizando el potencial de gradiente electroquímico de protones. Tres complejos de la cadena de transporte electrónico (I, III y IV) bombean protones a través de la membrana interna mitocondrial y la reentrada de estos a la matriz a través de la ATP sintasa activa la síntesis de ATP (Figura 34). El mantenimiento del potencial de membrana no solo es crucial para la síntesis de ATP, sino también para otras funciones mitocondriales (por ejemplo, la homeostasis iónica y el transporte de substratos metabólicos y de proteínas a la matriz mitocondrial (Palmeira & Rolo, 2012).

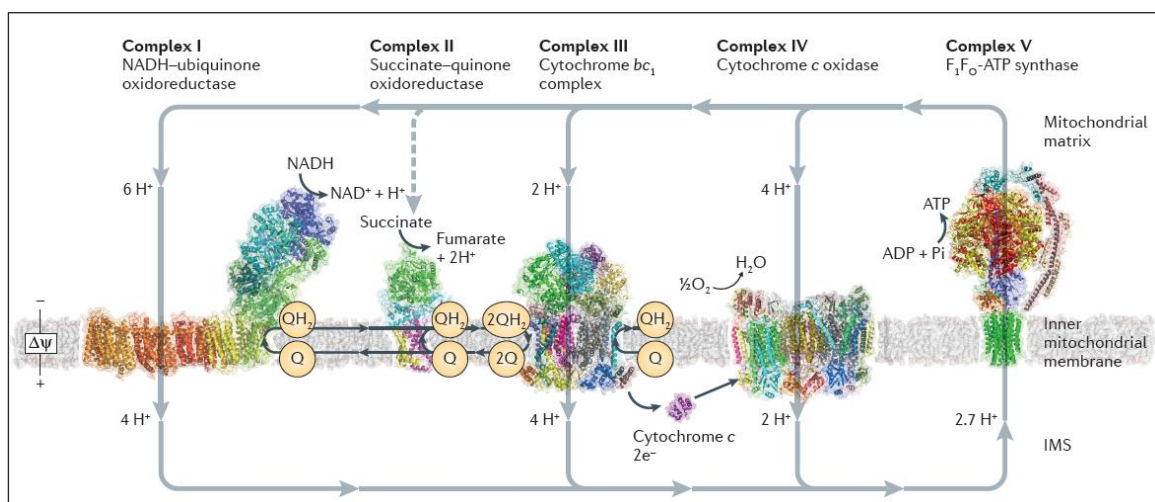


Figura 34. Esquema del circuito de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La figura muestra la cadena de transporte electrónico en la membrana mitocondrial interna, el flujo de protones a través de ellos (flechas grises) y la distribución de las cargas en la membrana mitocondrial interna (símbolos + y -). Tomada de (Sazanov, 2015).

Como estrategia para estudiar el gradiente electroquímico existente en las células shGTPBP3, determinamos el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo. Utilizamos como marcador específico el fluoróforo catiónico MitoTracker Red CMXRos que se acumula en la mitocondria de células vivas de manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial y, gracias a sus grupos clorometilo, forma enlaces covalentes con las proteínas de la matriz mitocondrial. La fluorescencia emitida se analizó en el canal FL3 (625 nm). En la Figura 35 podemos ver que el potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) disminuyó un 20-25% en las células shGTPBP3 respecto al control negativo. Con el fin de confirmar que el cambio en el $\Delta\psi_m$ sucede en la dirección de la señal del fluoróforo y que estamos interpretando correctamente los resultados, utilizamos como un control positivo la azida sódica (NaN_3), puesto que es capaz de inhibir al Complejo IV mitocondrial formando un enlace irreversible con el cofactor hemo, que disminuye el potencial de membrana en función de la intensidad del tratamiento.

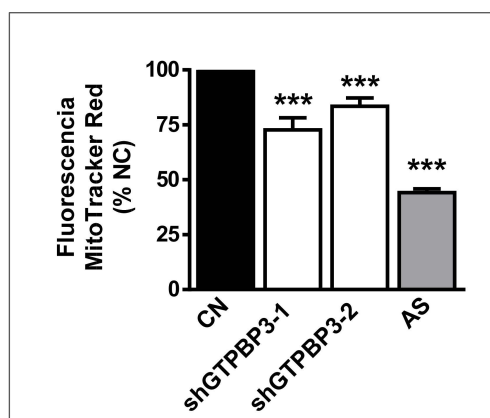


Figura 35. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). En la figura se muestra la fluorescencia emitida por el Mitotracker Red CMXRos en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2), expresada como porcentaje respecto al control negativo (CN). Como control positivo se empleó azida sódica (NaN_3 , AS). Se muestran las medias y el SEM obtenidos en, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (***) $p < 0.001$.

La disminución del potencial de membrana en las células shGTPBP3 fue similar al observado anteriormente en experimentos de silenciamiento transitorio de *GTPBP3* (Villarroya *et al.*, 2008).

3.2. Control de la respiración celular en las células shGTPBP3

Las mitocondrias son mayoritariamente responsables de la respiración celular, ya que en la cadena de transporte electrónico mitocondrial los electrones reducen el O_2 para dar lugar al H_2O . Puesto que la tasa de consumo de oxígeno es un buen indicador de la preservación o el deterioro de la integridad mitocondrial, se determinó este parámetro en las células shGTPBP3 y en el control negativo con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Figura 36).

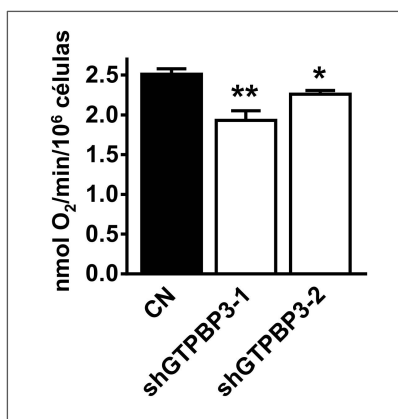


Figura 36. Medida del consumo de oxígeno en las células shGTPBP3. Se muestra la velocidad del consumo de oxígeno, expresada por minuto y millón de células (nmol O₂/min/10⁶células), en las células shGTPBP3 (-1 y -2) y en el control negativo (CN). Se muestran las medias y el SEM obtenidos en, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (*p<0.05 y **p<0.01).

Como se muestra en la Figura 36, el consumo de O₂ disminuyó significativamente en las células shGTPBP3, aunque algo menos que en los experimentos de silenciamiento transitorio de *GTPBP3* en los que la disminución fue próxima al 30% (Villarroya *et al.*, 2008). Estos nuevos datos sugieren que el silenciamiento permanente de *GTPBP3* puede activar la expresión de mecanismos compensatorios de los defectos producidos.

3.3. Estudio de los niveles de especies reactivas del oxígeno en las células shGTPBP3

La pérdida de electrones por la cadena de transporte electrónico y su combinación con el O₂ puede dar origen a especies reactivas del oxígeno (ROS). El O₂⁻ y el H₂O₂ son producidos en condiciones normales, respectivamente, por la reducción univalente o bivalente del O₂ durante el metabolismo aerobio (Figura 18). En condiciones normales, entre el 1 al 5% del O₂ consumido dará lugar a especies reactivas del oxígeno. Varias reacciones biológicas contribuyen a la concentración de ambas especies, aunque la mitocondria parece ser la mayor fuente de ellas (Cadenas & Davies, 2000).

Se determinaron los niveles de especies reactivas del oxígeno mediante citometría de flujo en las células shGTPBP3 y en los controles, utilizando HE y DHR-123 como marcadores. La fluorescencia emitida se analizó en el canal FL3 (625 nm), para el HE, y en FL1 (525 nm), para la DHR-123. La Figura 37 muestra los resultados obtenidos. Curiosamente, en las células shGTPBP3 no se evidencian diferencias en los niveles de especies reactivas del oxígeno respecto al control negativo con cualquiera de los dos marcadores. Estos datos también difieren de los resultados previos obtenidos en el silenciamiento transitorio de *GTPBP3*, donde se observaba un aumento significativo (28%) de los niveles de superóxido usando MitoSox (Villarroya *et al.*, 2008). Es posible que en un proceso a largo plazo, como lo es el silenciamiento estable de *GTPBP3*, las

células tengan tiempo de adaptar su respuesta al estrés oxidativo aumentando sus defensas antioxidantes. De acuerdo con esta idea, la incubación de las células con 0.3 mM de H_2O_2 durante 2 horas, produjo un incremento de los niveles de H_2O_2 intracelulares en las células control, pero no en las células shGTPBP3 (Figura 37B). Por tanto, los resultados apoyan la hipótesis de que las células shGTPBP3 tienen activados mecanismos antioxidantes.

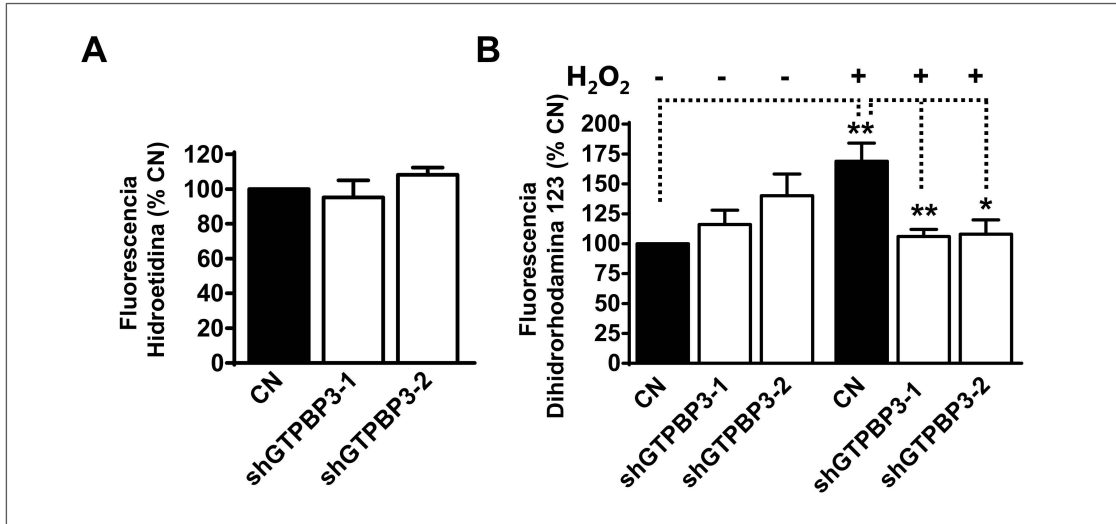


Figura 37. Niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células shGTPBP3 y control negativo (CN). **A)** Determinación de los niveles de ROS mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente dihidroetidio. **B)** Medida de los niveles de ROS mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente DHR-123, en condiciones normales y tras la exposición a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) exógeno 0.3 mM durante 2 horas. Los datos en **A** y **B** se expresan como porcentaje del control negativo según la intensidad de la fluorescencia del control. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas respecto a los valores control (* $p < 0.05$).

3.4. Sistemas antioxidantes enzimáticos en las células shGTPBP3

Las enzimas clásicas implicadas en la detoxificación de las ROS son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 38).

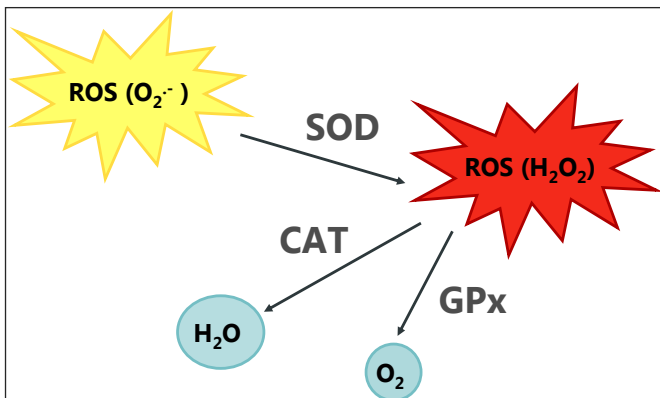


Figura 38. Sistema de detoxificación de ROS. Esta figura muestra un esquema de las vías de detoxificación de ROS en las células eucariotas y el paso en el que interviene cada enzima. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa y GPx, glutatión peroxidasa.

SOD fue la primera enzima descubierta que metabolizaba ROS (McCord & Fridovich, 1969). Su función fisiológica es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio. Cumple un papel fundamental en la defensa antioxidante, ya que a pesar de que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y se dismuta espontáneamente, la velocidad de dismutación no enzimática es relativamente baja en comparación con la reacción catalizada por la superóxido dismutasa, que incrementa esta velocidad unas 10^4 veces (Fridovich, 1974). La enzima catalasa suele contener un grupo hemo y su localización subcelular predominante es en los peroxisomas, donde cataliza la dismutación del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular. Se conocen 4 GPxs que contienen selenocisteína, la GPx1 y la GPx4, que se encuentran en el citoplasma y la GPx2 y la GPx3, que son extracelulares y que se expresan mayoritariamente en el tracto gastrointestinal y en el riñón, respectivamente. Todas ellas catalizan la reducción del H_2O_2 usando glutatión como sustrato.

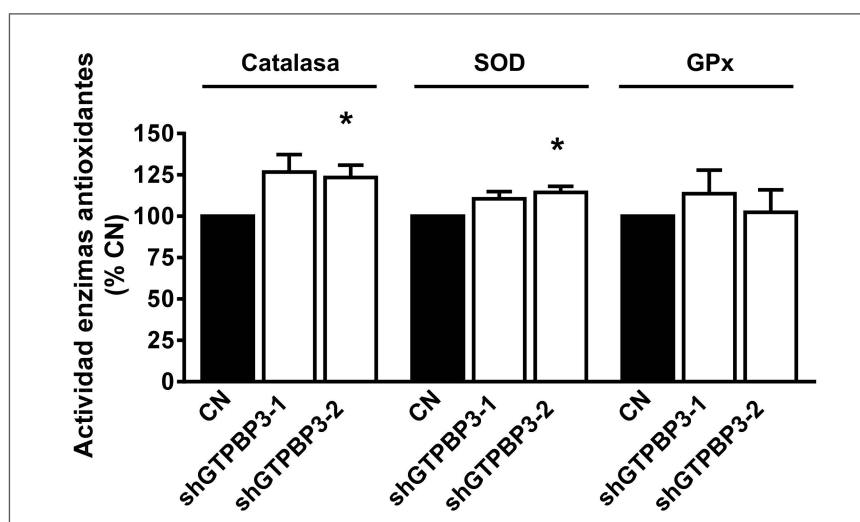


Figura 39. Actividades de enzimas antioxidantes. Actividades de las enzimas catalasa, SOD (superóxido dis-mutasa) y GPx (glutatión peroxidasa), expresadas como porcentaje del control negativo (CN). Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$).

En las células shGTPBP3 se encontró una tendencia hacia una mayor actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD, que solo fue significativa en el clon shGTPBP3-2, y no se encontraron cambios en la actividad de la proteína GPx (Figura 39). En la búsqueda del sistema antioxidante operante en las células shGTPBP3 decidimos estudiar también la expresión de algunos componentes del sistema de tiorredoxina, un sistema antioxidante que mantiene el balance redox mediante la actividad de la tiorredoxina y de la tiorredoxina reductasa y que regula la actividad de las peroxirredoxinas (Cox *et al.*, 2010; Sies, 2014). Estas últimas son capaces de reducir directamente los peróxidos y diferentes hidroperóxidos, mientras que las tiorredoxinas

regeneran las peroxirredoxinas oxidadas que se han formado durante el ciclo catalítico. Como se muestra en la Figura 40, en las células silenciadas observamos una tendencia hacia una mayor expresión de la tioredoxina-2, la peroxirredoxina-3 y la peroxirredoxina-5, todas ellas de localización mitocondrial (Cox *et al.*, 2010; Lowes & Galley, 2011).

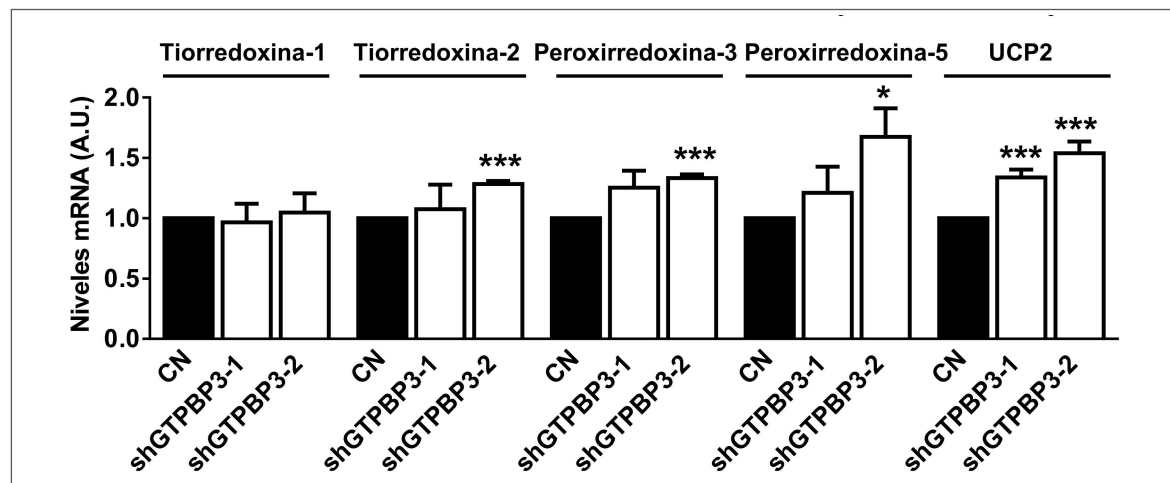


Figura 40. Niveles de expresión de enzimas antioxidantes. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de mRNA de tioredoxina-1, tioredoxina-2, peroxirredoxina-3, peroxirredoxina-5 y UCP2 (proteína desacoplante 2), en las células shGTPBP3 y en control negativo (CN). Los datos representan la media y el SEM de 3 experimentos independientes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

Además, observamos un incremento significativo en los niveles de RNA mensajero y de proteína para la proteína desacoplante 2 (UCP2) en las células shGTPBP3 (Figura 41). La proteína UCP2 se ha asociado con funciones protectoras contra un exceso de producción de ROS, aunque su función precisa aún está sometida a debate (Bouillaud, 2009; Jezek *et al.*, 2014; Kukat *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Pecqueur *et al.*, 2009; Pecqueur *et al.*, 2008; Shabalina & Nedergaard, 2011; Vozza *et al.*, 2014). Trabajos recientes indican que UCP2 promueve un viraje metabólico, reduciendo la oxidación del piruvato y aumentando la de la glutamina y de los ácidos grasos como vías para proporcionar equivalentes de reducción a la cadena respiratoria. Según estos trabajos, la disminución de ROS sería un efecto secundario del control metabólico ejercido por UCP2, en lugar de tratarse de un efecto directo debido a una actividad de esa enzima que desacoplase la respiración de la síntesis de ATP como se había propuesto inicialmente en base a ciertas semejanzas de UCP2 con la proteína UCP1 que tiene verdaderamente una función desacopladora. Sea cual sea la función precisa de UCP2, la duplicación del nivel de esta proteína en las células shGTPBP3 sugiere que contribuye a su mayor capacidad antioxidante.

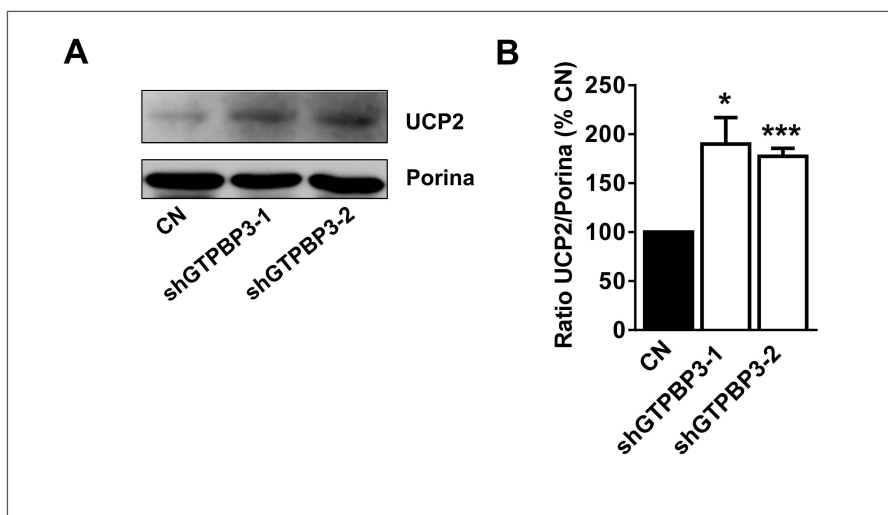


Figura 41. Inmunodetección de UCP2. **A)** Niveles de las proteínas UCP2 y porina detectados mediante inmunodetección con los anticuerpos correspondientes. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de la proteína UCP2 normalizados respecto a los de porina. Los datos se expresan en porcentaje de los valores obtenidos en el control negativo (CN). Se muestran la media y el SEM. Los datos son representativos de, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas de cada clon silenciado con el valor del control (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$).

3.5. Estudio de los niveles de ATP intracelular

La molécula combustible adenosina-5'-trifosfato (ATP) hace que sean posibles muchos de los procesos celulares que requieren energía, puesto que en la catálisis por ejemplo la mayoría de enzimas necesitan energía química para la aceleración de reacciones químicas que de otra manera sucederían muy lentamente. Por lo tanto, un fallo en el mantenimiento de unos niveles adecuados de ATP en la célula conlleva importantes alteraciones metabólicas.

La determinación de los niveles de ATP en las células shGTPBP3 reveló una disminución próxima al 50% en las células shGTPBP3 respecto al control negativo (CN) (Figura 42). Este importante déficit de energía observado en las células shGTPBP3 debe tener repercusiones en el funcionamiento celular y, probablemente, contribuya al fenotipo de los pacientes con mutaciones *GTPBP3*.

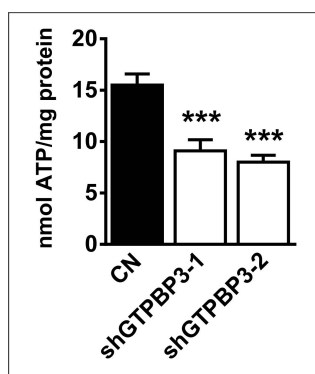


Figura 42. Medida del ATP intracelular en las células shGTPBP3. En esta figura se muestran los niveles de ATP intracelular, en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y el control negativo (CN), expresados en nanomoles de ATP por mg de proteína. Los valores mostrados corresponden a las medias y el SEM obtenidos en, al menos, 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (***) $p < 0.001$.

3.6. Estudio de la actividad de enzimas OXPHOS

Considerando los bajos niveles de ATP en las células shGTPBP3, no parece que los posibles mecanismos compensatorios que estén actuando puedan finalmente mantener un correcto funcionamiento del sistema OXPHOS en las células shGTPBP3 (Figura 43).

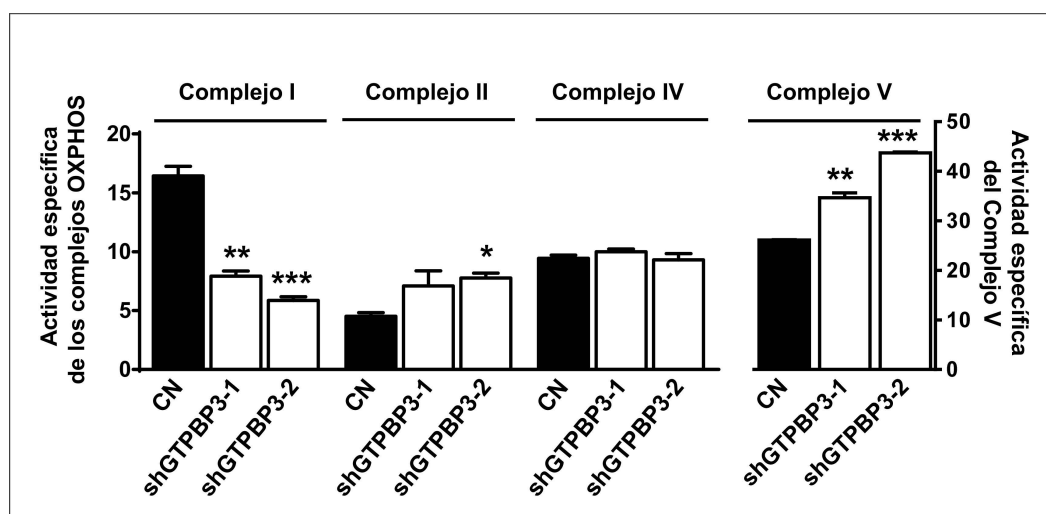


Figura 43. Actividades de los complejos OXPHOS. Actividades de los Complejos I, II, IV y V en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) expresadas como actividades específicas, referidas a las de la citrato sintasa para corregir diferencias en el volumen mitocondrial y multiplicadas por 100 $((\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prote\u00edna})/(\text{actividad espec\u00edfica de la citrato sintasa}) \times 100)$. Los datos representan la media y SEM de 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

De hecho, la actividad del Complejo I, pero no la del Complejo IV, se encontró reducida de forma severa en las células shGTPBP3 (Figura 43). Además, se vio una tendencia al aumento en la actividad del Complejo II y en la actividad ATPasa del Complejo V (Figura 43) que podrían compensar algunos efectos de la deficiencia del Complejo I. Por un lado, el aumento de la actividad del Complejo II puede incrementar

la entrada de electrones en el sistema a través del succinato. Además también, la operación reversa del Complejo V en la que hidroliza ATP y bombea H^+ al espacio intermembrana puede ayudar a mantener el potencial de membrana mitocondrial en las células shGTPBP3. A este respecto, se ha visto previamente que cuando se inhibe el Complejo I, el potencial de membrana se mantiene por la función reversa de la ATPasa- F_0F_1 , aunque el mecanismo por el que la ATPasa- F_0F_1 revierte su función se encuentra todavía en estudio (Chinopoulos & Adam-Vizi, 2010).

3.7. Análisis del sensor energético celular AMPK (proteína quinasa estimulada por AMP)

AMPK es un sensor de energía celular muy conservado que protege a la célula actuando como un sistema de detección de una disponibilidad baja de energía, puesto que se activa cuando la relación AMP:ATP aumenta (Canto & Auwerx, 2010; Hardie, 2011; Nunnari & Suomalainen, 2012; Viollet *et al.*, 2010). La actividad de AMPK está regulada mediante fosforilación de la treonina 172 de la subunidad catalítica α (Hardie, 2007). Esta fosforilación se induce por condiciones de depleción de ATP. Puesto que AMPK es un sensor de energía, pensamos que sería posible que se encontrara activado en las células shGTPBP3 ya que en ellas se encuentran disminuidos los niveles de ATP. El análisis mediante inmunodetección mostró que, efectivamente, la fosforilación de la treonina 172 de AMPK α estaba aumentada en las células shGTPBP3 (Figura 44).

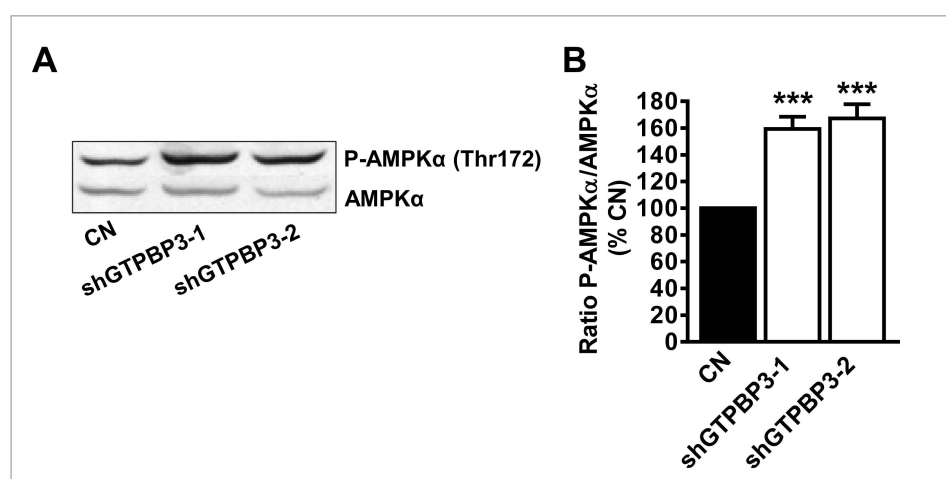


Figura 44. Inmunodetección de los niveles de AMPK α fosforilada y AMPK α en las células shGTPBP3. **A)** Inmunodetección representativa de 3 experimentos diferentes realizados, cargando 75 μ g de extracto total de proteínas del control negativo (CN) y de las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2), usando los anticuerpos anti-fosfo-AMPK α (Thr172) y anti-AMPK α . **B)** Análisis densitométrico de los niveles de la proteína fosfo-AMPK α normalizados con los de AMPK α y representados como porcentaje del control negativo. Se muestran las

medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (**p<0.01, ***p<0.001).

Como corresponde al papel de AMPK en el mantenimiento de la homeostasis energética, cabe esperar que la activación de esta quinasa, puesta de manifiesto por un aumento en el nivel de su fosforilación en la Thr172, tenga consecuencias a nivel celular. Entre todos los procesos que se pueden activar o a inhibir mediante la acción de AMPK (Figura 43) podemos destacar:

- Represión de la síntesis de ácidos grasos (vías anabólicas), un proceso que se encuentra muy activo en células en proliferación (Metallo *et al.*, 2009), lo que en consecuencia podría contribuir a un descenso en la tasa de proliferación celular.
- Activación de vías catabólicas que generan ATP como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.
- Activación de la biogénesis mitocondrial, promoviendo la replicación del mtDNA y la expresión de proteínas mitocondriales codificadas por genes nucleares.
- Activación de la autofagia y de ciertos mecanismos antioxidantes (UCP2).

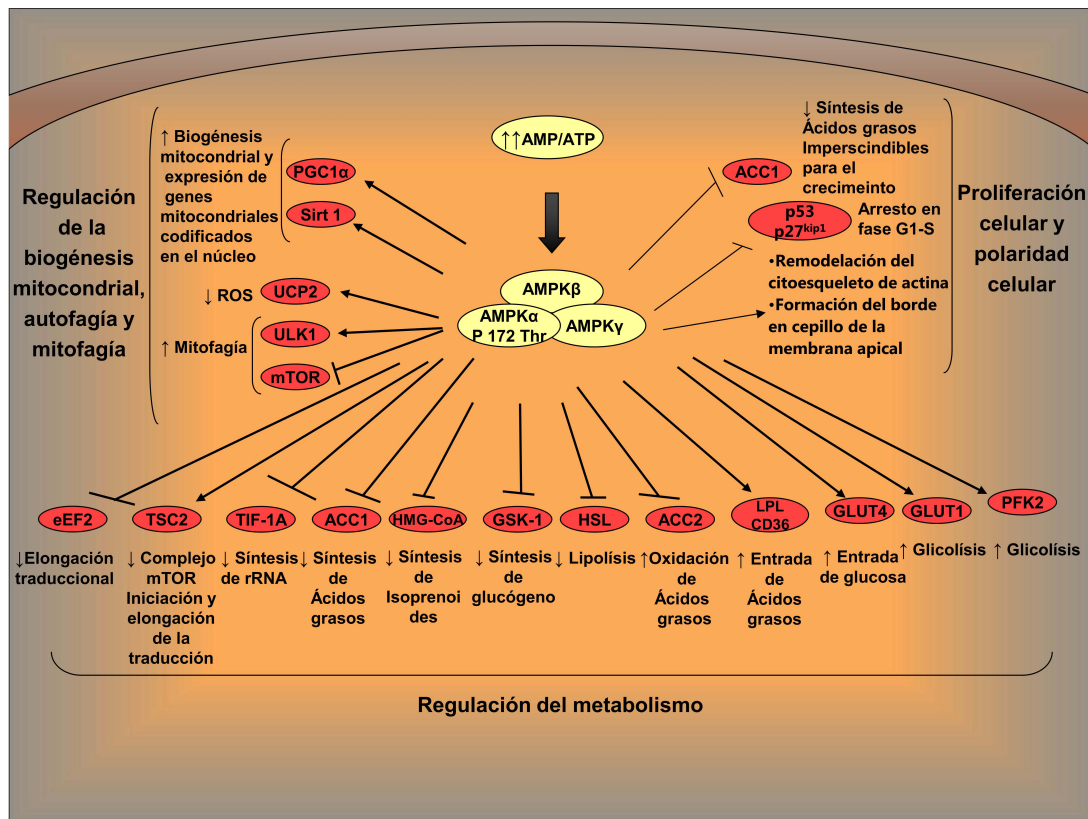


Figura 45. AMPK es un regulador principal del metabolismo. AMPK regula el metabolismo de lípidos, proteínas y glucosa mediante la modulación de numerosas dianas, así como la biogénesis mitocondrial, la autofagia y la proliferación celular. Su activación promueve la

biogénesis mitocondrial a través del coactivador transcripcional PGC-1 α , que induce la expresión de genes mitocondriales codificados por el núcleo mediante los factores PPAR α y PPAR γ (que activan genes necesarios para oxidación de ácidos grasos) y los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF-1 y -2) (que transcriben TFAM, un factor imprescindible para la replicación mitocondrial). Modificada de Abcam.

3.8. Afectación de procesos celulares: crecimiento celular y autofagia

Las mitocondrias están íntimamente implicadas en las rutas de señalización celular, participando en la regulación de procesos clave como el crecimiento celular y la autofagia (Battersby & Richter, 2013; Nunnari & Suomalainen, 2012; Tait & Green, 2012). Dado que estos procesos pueden verse afectados por una alteración de la función OXPHOS (Cotan *et al.*, 2011; Dodson *et al.*, 2013; Hamalainen *et al.*, 2013; Moran *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014), decidimos ver qué ocurría en las células shGTPBP3. Hemos encontrado que mientras el crecimiento se reduce (Figura 46), la autofagia está activada, ya que se acumula la proteína LC3-II, un marcador de autofagia, cuando las células se mantienen en un medio privado de nutrientes esenciales y en presencia de inhibidores lisosomales (Figura 47).

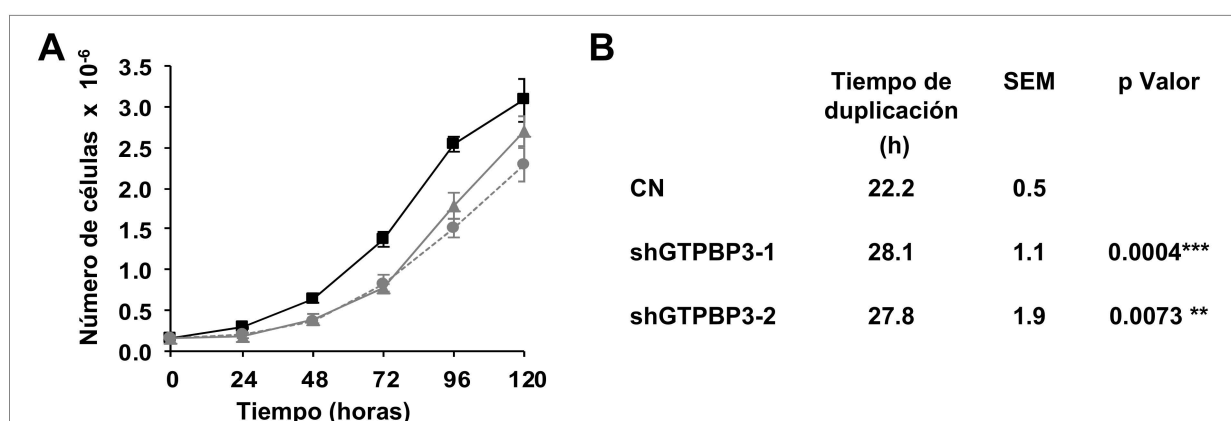


Figura 46. Proliferación celular en las células shGTPBP3. **A)** El gráfico representa las curvas de crecimiento en valor absoluto (número de células $\times 10^{-6}$) del control negativo (CN, cuadrados negros), de shGTPBP3-1 (triángulos grises) y de shGTPBP3-2 (círculos grises). **B)** Tiempo de duplicación en horas en las células shGTPBP3 y en el control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

Es bien conocido que la activación de AMPK estimula la autofagia (Hardie, 2011; Moruno *et al.*, 2012; Scarpulla *et al.*, 2012). Sin embargo, este, a pesar de ser un proceso catabólico, requiere energía para, al menos, dos pasos: el secuestro del material citosólico en autofagosomas y el mantenimiento de la actividad de la bomba de

protones en la membrana lisosomal para producir la acidificación requerida en la degradación por las hidrolasas ácidas (Moruno *et al.*, 2012). En cualquier caso, con los experimentos realizados sí podemos concluir que la acumulación de LC3-II observada en las células shGTPBP3 es debida a una autofagia incrementada causada probablemente por los niveles reducidos de ATP.

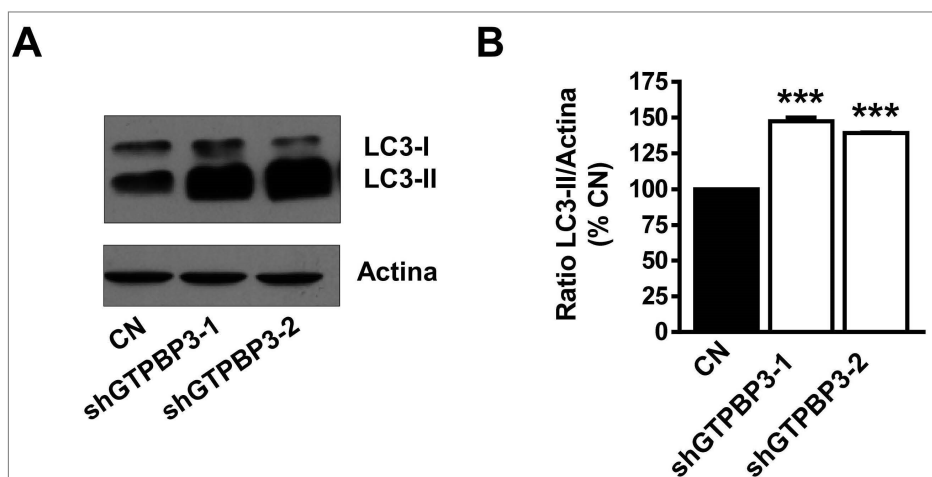


Figura 47. Detección de los niveles de autofagia. **A)** Análisis de la autofagia mediante inmunodetección de la proteína LC3-II en células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y control negativo (CN), utilizando actina como control de carga, tras la exposición durante 1 hora al medio PBS en presencia de inhibidores lisosomales. **B)** Análisis densitométrico de los niveles de la proteína LC3-II normalizados con los de actina y representados como porcentaje del control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (***) $p < 0.001$.

3.9. Estudio de la morfología mitocondrial y del número de copias de DNA mitocondrial en las células shGTPBP3

Según el tipo celular y sus necesidades energéticas la red mitocondrial cambia de una manera dinámica su morfología y volumen a través de una fusión y fisión mitocondriales. Los experimentos de microscopía electrónica realizados en las células shGTPBP3 nos han permitido observar la distribución, forma y tamaño de las mitocondrias en estas células y en el control negativo (Figura 48).

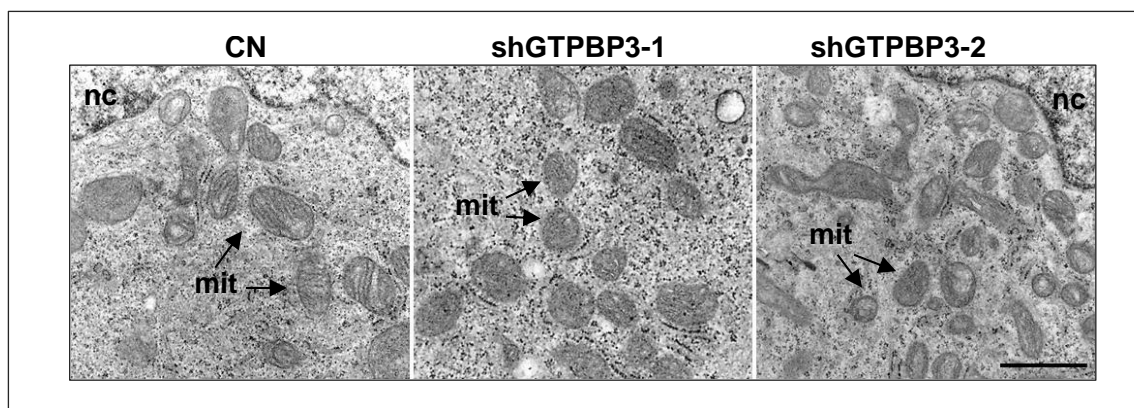


Figura 48. Microfotografía electrónica representativa de las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y del control negativo (CN). Barra: 1 μ m. nc: núcleo; mit: mitocondrias.

Las mitocondrias de estas células fueron mas pequeñas (Figura 49A) y algo más abundantes que las de las células control (Figura 49B). La fragmentación mitocondrial (a causa de un desequilibrio entre los procesos de fusión y fisión que controlan la morfología mitocondrial) es una respuesta de estrés frecuentemente utilizada para segregar y eliminar mitocondrias disfuncionales por la vía de la autofagia (Dominy & Puigserver, 2013; Gao *et al.*, 2014; Twig *et al.*, 2008). Se sabe que la disminución en los niveles de ATP dispara la fragmentación de la red mitocondrial a consecuencia de la inactivación funcional de Opa1, una proteína implicada en la fusión mitocondrial (Twig *et al.*, 2008). Conviene en este punto señalar que el volumen fraccional mitocondrial está reducido en las células shGTPBP3 (Figura 49C), un hecho que podría estar relacionado con una mitofagia (una autofagia específica que degrada mitocondrias alteradas) aumentada con el objeto de eliminar mitocondrias lesionadas. A pesar de ello, no observamos una disminución en el número de copias del mtDNA (Figura 49D), lo que, en este contexto, sugiere que debe estar activado un programa de mantenimiento del mtDNA. Es conocido que el número de copias del mtDNA puede modularse de acuerdo con los requerimientos energéticos de la célula (Lee & Wei, 2005) y que la activación de AMPK, al mismo tiempo que promueve la eliminación de mitocondrias defectuosas y reduce el crecimiento celular, aumenta la biogénesis del mtDNA (Dominy & Puigserver, 2013; Hardie, 2011; Scarpulla *et al.*, 2012). Por lo tanto, la activación de AMPK puede contribuir al crecimiento más lento, a la autofagia aumentada y al mantenimiento del número relativo de copias de mtDNA exhibidos por las células shGTPBP3.

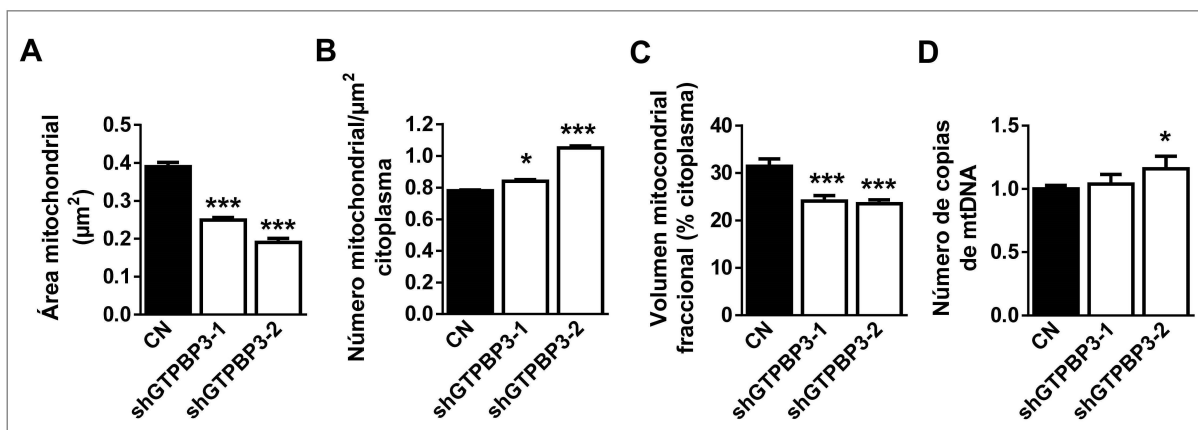


Figura 49. Análisis morfométrico de las mitocondrias en las células shGTPBP3 y número de copias de mtDNA. Se muestran determinaciones de estos parámetros en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN). **A)** Área mitocondrial (μm^2). **B)** Número de mitocondrias por unidad de superficie (μm^2) del citoplasma celular. **C)** Volumen mitocondrial fraccional. **D)** Cuantificación relativa, mediante qPCR, del gen *COXII* codificado por el mtDNA frente al gen *SDHA* codificado en el núcleo. Los datos muestran la media y el SEM de 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas de cada clon silenciado con el valor del control (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$).

4. Mecanismo patogénico en las células shGTPBP3

Tras esta primera caracterización del fenotipo presentado por las células shGTPBP3 nos preguntamos cuál podía ser el mecanismo subyacente. Lo más obvio era relacionarlo con el papel jugado por GTPBP3 y sus homólogas en la modificación del tRNA. En bacterias se ha observado que el defecto en la proteína homóloga de GTPBP3 (llamada MnmE) afecta a la fidelidad y a la velocidad en la lectura de codones y al mantenimiento de la pauta de lectura (Armengod *et al.*, 2014; Armengod *et al.*, 2012). Las bacterias que carecen de la proteína MnmE presentan un fenotipo variado, que incluye un crecimiento más lento, una sensibilidad extrema a ciertas condiciones de estrés (como a un pH ácido) y una letalidad que ocurre cuando la ausencia de MnmE se presenta en combinación con otras mutaciones que también afectan al proceso de traducción. Por esto, se ha propuesto que la falta de la modificación dependiente de MnmE afectaría a la lectura de mRNAs con determinadas señales internas, entendiendo por éstas la combinación de codones en regiones del mRNA que facilitarían el cambio de pauta de lectura y la aparición de codones de paro. Pese a eso, no se han obtenido pruebas directas que demuestren la relación entre un determinado fenotipo (por ejemplo la sensibilidad al pH) y la traducción alterada de proteínas implicadas en la resistencia a ese estrés.

Desde que se descubrió la modificación $\tau m5$ en los tRNAs mitocondriales (Suzuki *et al.*, 2002), se ha relacionado su falta con un fallo en la traducción mitocondrial de proteínas, especialmente de proteínas relativamente ricas en codones de cajas mixtas acabados en G (Watanabe & Yokobori, 2011). Por ejemplo, la proteína ND6 tiene un contenido inusual (en relación al resto de proteínas codificadas por el mtDNA) de codones UUG (leucina), lo que explicaría que la síntesis de esta proteína del Complejo I se viese especialmente afectada por la falta de la modificación de la U34 en el tRNA^{Leu(UUR)} (necesaria para un apareamiento G3•U34 entre la tercera base del codón y la primera del anticodon). Sin embargo, esto no explica bien por qué, por ejemplo, en algún paciente con mutaciones GTPBP3 no se ha observado defecto en la síntesis mitocondrial de proteínas a pesar de haber fallecido el paciente precozmente (8 meses) de un fallo cardíaco (Kopajtich *et al.*, 2014). Por tanto, queda por resolver hasta qué punto y de que manera está implicada la traducción mitocondrial en la patogenia de la enfermedad y/o si existen mecanismos adicionales que intervengan en la misma.

4.1. Traducción mitocondrial en las células shGTPBP3

Considerando el papel de GTPBP3 y sus homólogos en la modificación de tRNAs, no sería sorprendente que la traducción mitocondrial estuviese afectada en las células shGTPBP3. De hecho, en el silenciamiento transitorio de *GTPBP3* (Villarroya *et al.*, 2008), se analizó la síntesis de proteínas mitocondriales mediante experimentos de pulso en los que se realizaba un marcaje radiactivo con ³H- Leu seguido de contaje en un contador de centelleo. Los resultados mostraron que la síntesis de proteínas mitocondriales estaba disminuida en un 20%.

Recientemente, se ha analizado también la síntesis mitocondrial de proteínas en fibroblastos de pacientes que tienen mutaciones en *GTPBP3* mediante marcaje radiactivo con ³⁵S-metionina y análisis mediante SDS-PAGE y se encontró un descenso uniforme en la síntesis mitocondrial de un 20-30% en 3 de los 4 casos estudiados, mientras que el análisis en células HeLa transfectadas transitoriamente con dos siRNAs diferentes para *GTPBP3* produjo resultados dispares (Kopajtich *et al.*, 2014).

Con el fin de investigar el estado de la síntesis mitocondrial de proteínas en las células shGTPBP3, se analizó esta mediante experimentos de pulso en los que se realizaba de nuevo un marcaje radiactivo, pero con ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína mediante pulso en presencia de emetina (inhibidor de la traducción citoplásmica) y análisis en SDS-PAGE, en las células shGTPBP3 y en el control negativo (Figura 50). No

se encontraron cambios consistentes en la síntesis mitocondrial global, ni se observó tampoco ningún polipéptido con migración anómala en las células shGTPBP3 (Figura 50A). Sin embargo, sí observamos una disminución específica y significativa en el marcaje de las subunidades ND1 y ND3 del Complejo I cuando se examinaron las relaciones respecto a la subunidad A6 del Complejo V (Figura 50B) o respecto a la subunidad Cyt b del Complejo III (datos no mostrados).

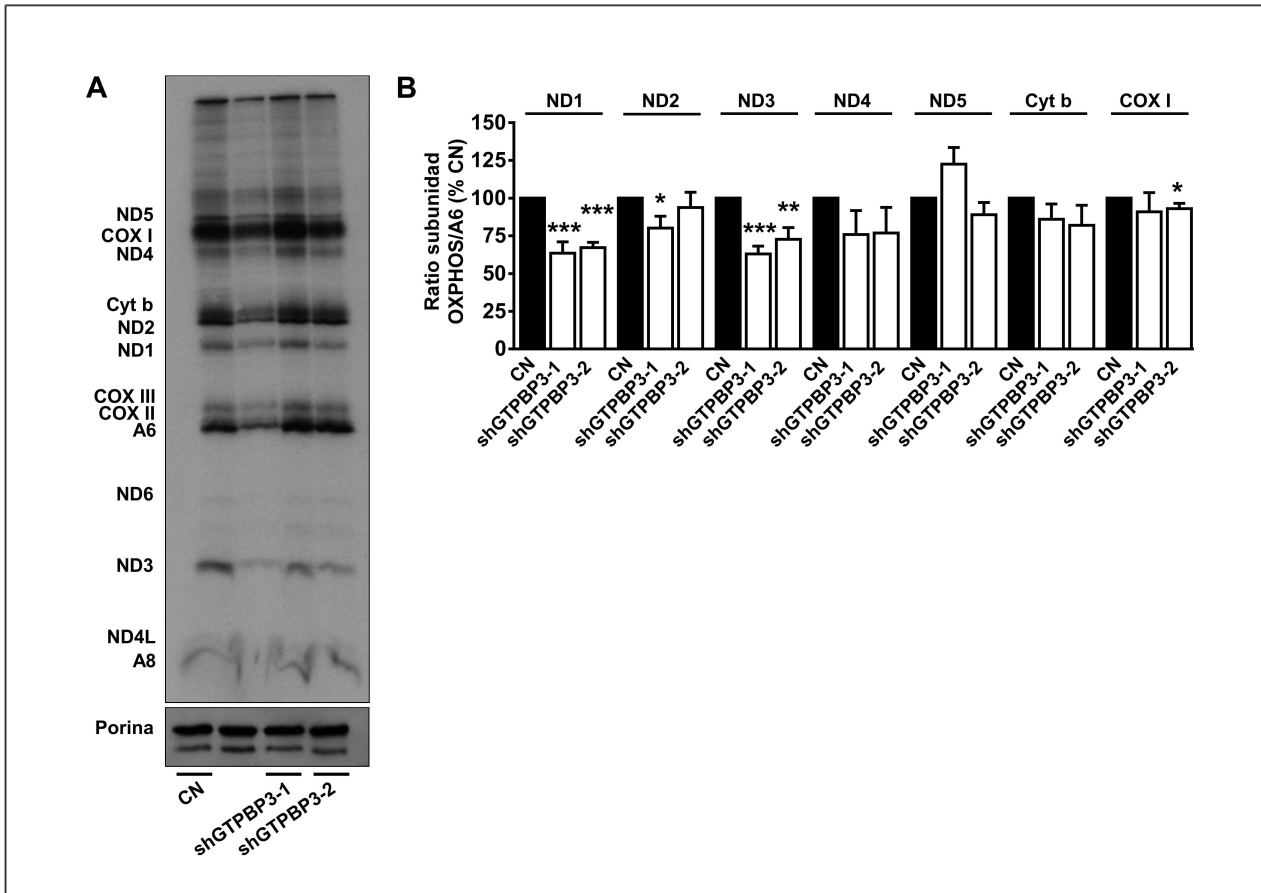


Figura 50. La traducción mitocondrial está afectada levemente en las células shGTPBP3. A) Análisis de la traducción mitocondrial mediante marcaje metabólico con ^{35}S -metionina y ^{35}S -cisteína durante 1 hora en presencia de emetina en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN). ND1 a ND6: subunidades 1 a 6 de la NADH deshidrogenasa; Cytb: citocromo b; COX I, II y III: subunidades I a III de la Citocromo c oxidasa; A6 y A8: subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa mitocondrial. **B)** Cuantificación del marcaje radiactivo de varias subunidades OXPHOS, expresado como porcentaje del control negativo en las células shGTPBP3 y en el control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

En algunos estudios (Boczonadi *et al.*, 2013; Ghezzi *et al.*, 2012; Kemp *et al.*, 2011; Kopajtich *et al.*, 2014; Moreno-Loshuertos *et al.*, 2011; Sasarman *et al.*, 2011) se han reportado observaciones confusas relativas al efecto de mutaciones que afectan a componentes del sistema de traducción mitocondrial, lo que sugiere que para que

pueda ponerse de manifiesto un descenso de la traducción mitocondrial mediante ciertas tecnologías, este tiene que ser muy severo y/o que deben existir mecanismos compensatorios, cuya expresión puede depender del fondo genético o del tipo celular, que contribuyen a la mejora de la eficiencia traduccional. Por lo tanto, con el fin de conseguir una estrategia más sensible, tratamos las células con cloranfenicol, un inhibidor de la traducción mitocondrial, puesto que pensábamos que si la síntesis mitocondrial de proteínas estuviera afectada en cierto grado en las células shGTPBP3, estas serían más sensibles a la droga. De hecho, encontramos que la dosis letal 50 (LD50) para el cloranfenicol era significativamente menor (un 50% aproximadamente) para las células shGTPBP3 que para las células control (Figura 51A), mientras que la LD50 para la cicloheximida (un inhibidor de la traducción citoplásmica) era similar en los dos tipos celulares (Figura 51B). Estos resultados sugieren que en las células shGTPBP3 existe cierto grado de estrés en la traducción mitocondrial (pese a que no se refleje en una disminución consistente en la síntesis global de proteínas) y que este se incrementa (por un efecto sinérgico) cuando el cloranfenicol se une al sitio A del mitorribosoma.

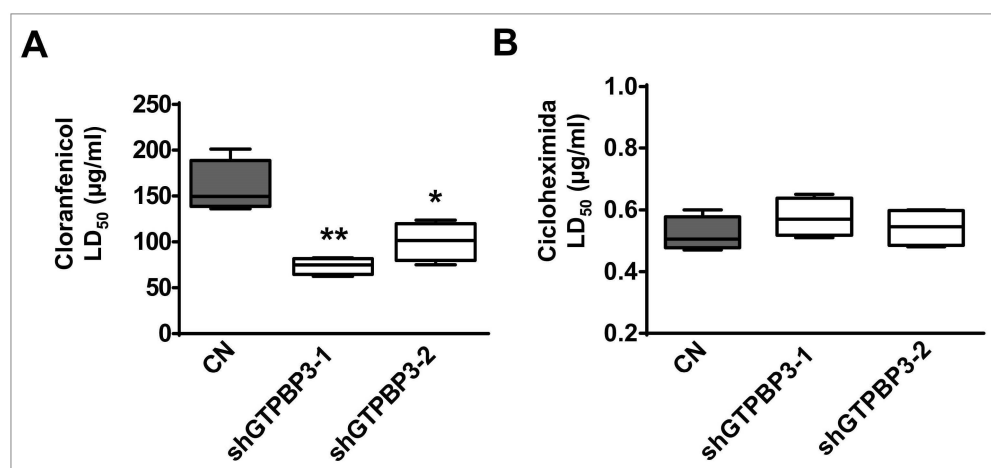


Figura 51. Efecto diferencial del cloranfenicol y la cicloheximida en las células shGTPBP3 versus el control negativo. **A)** Dosis letal 50 del cloranfenicol en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN). **B)** Dosis letal 50 de la cicloheximida en las células shGTPBP3 y en el control negativo. En **A** y **B**, las cajas representan el rango intercuartílico, la línea central la mediana y las barras indican las observaciones mínima y máxima. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$).

4.2. Niveles de subunidades OXPHOS en las células shGTPBP3

El descenso cercano al 50% de la actividad del Complejo I en las células shGTPBP3 no parece estar justificado sólo por la leve disminución observada en la síntesis de las proteínas ND1 y ND3. Por ello pensamos que el procesamiento post-traduccional pudiese estar alterado y, consecuentemente, analizamos los niveles en estado

estacionario de algunas subunidades OXPHOS codificadas tanto por el mtDNA como por el nDNA. Específicamente analizamos subunidades de los complejos más afectados en los pacientes portadores de mutaciones en *GTPBP3*, concretamente, los Complejos I y IV (Kopajtich *et al.*, 2014) y algunas subunidades de los Complejos II y V codificadas por el núcleo (Figura 52).

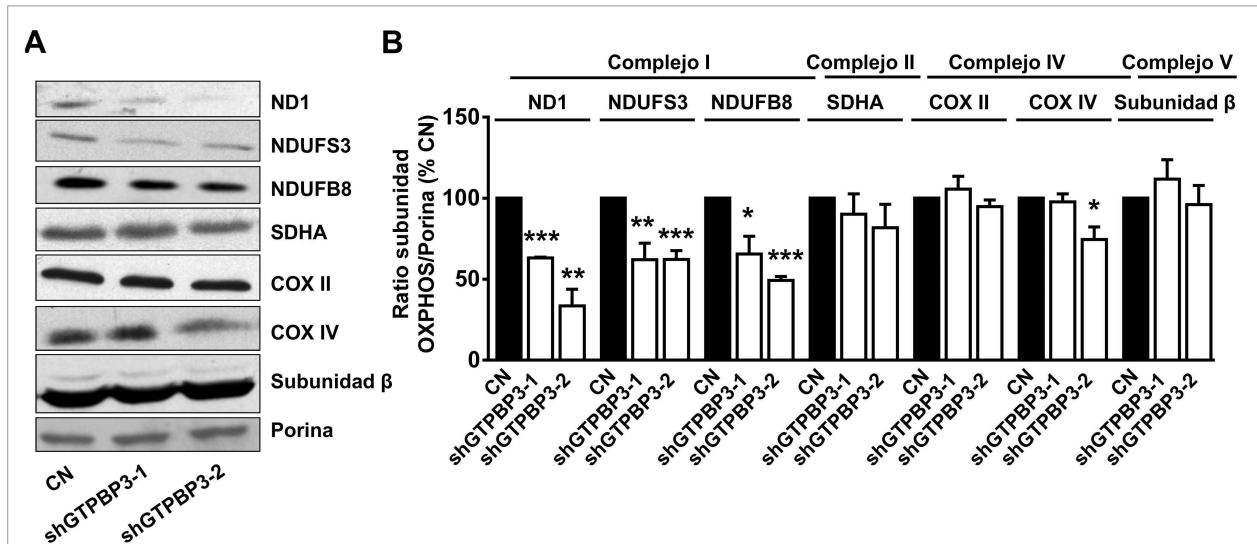


Figura 52. Disminución del nivel de las subunidades del Complejo I en las células shGTPBP3. **A)** Análisis de los niveles de las siguientes subunidades OXPHOS: ND1, NDUFS3 y NDUF8 que forman parte del Complejo I; SDHA que forma parte del Complejo II; COX II y COX IV que forman parte del Complejo IV y la subunidad β (Sub β) del Complejo V, mediante inmunodetección en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN). En la misma membrana se detectó también la porina como control de carga. **B)** Análisis densitométrico de las subunidades OXPHOS normalizadas con el control de carga (porina) y representadas como porcentaje respecto al control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

Se observó una disminución significativa en los niveles de las proteínas del Complejo I, (ND1 codificada por el genoma mitocondrial y NDUFS3 y NDUF8 codificadas por el núcleo) en las células shGTPBP3 (Figura 52A y B). En las células shGTPBP3 no se encontraron variaciones consistentes (sólo en el clon shGTPBP3-2) respecto al control negativo en los niveles de las proteínas del Complejo IV (COX II codificada por el genoma mitocondrial y COX IV codificada por el genoma nuclear). Tampoco se encontró variación en los niveles de las proteínas codificadas por el núcleo SDHA (del Complejo II) y subunidad β (del Complejo V). La observación más importante que se obtuvo en este análisis fue que la disminución de las proteínas NDUFS3 y NDUF8 no se correlaciona con una disminución similar en los niveles de mRNA de

dichos genes (Figura 53). Esto sugiere que en las células shGTPBP3 está alterada la traducción o la estabilidad de estas dos proteínas.

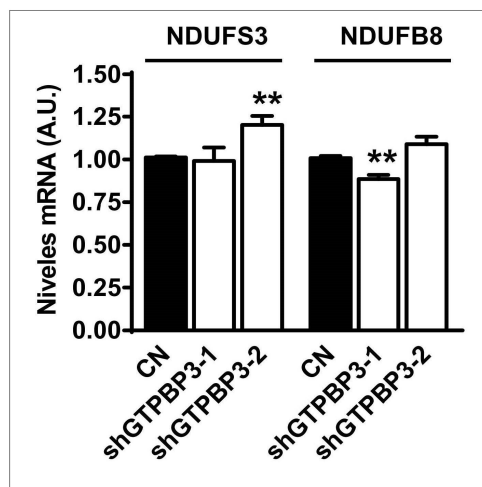


Figura 53. Los transcritos de las subunidades del Complejo I se mantienen inalterados en las células shGTPBP3. Análisis de los niveles de mRNA de *NDUFS3* y *NDUF8* en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) mediante qRT-PCR. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (** $p < 0.01$).

4.3. Ensamblaje de los complejos mitocondriales en las células shGTPBP3

Para determinar hasta qué punto lo observado a nivel de las subunidades OXPHOS individuales se reflejaba a nivel de los correspondientes complejos de los que forman parte, analizamos el nivel de estos en estado estacionario mediante electroforesis BN-PAGE seguida de inmunodetección (Figura 54A). El análisis reveló una disminución importante y significativa del Complejo I en las células shGTPBP3, mientras que el resto de complejos permaneció sin cambios (Figura 54B). Cuando se realizaron exposiciones más largas de las membranas tampoco se observó ninguna acumulación de intermediarios de ensamblaje del Complejo I, sugiriendo que el fallo en el ensamblaje del Complejo I en las células shGTPBP3 ocurre en etapas tempranas.

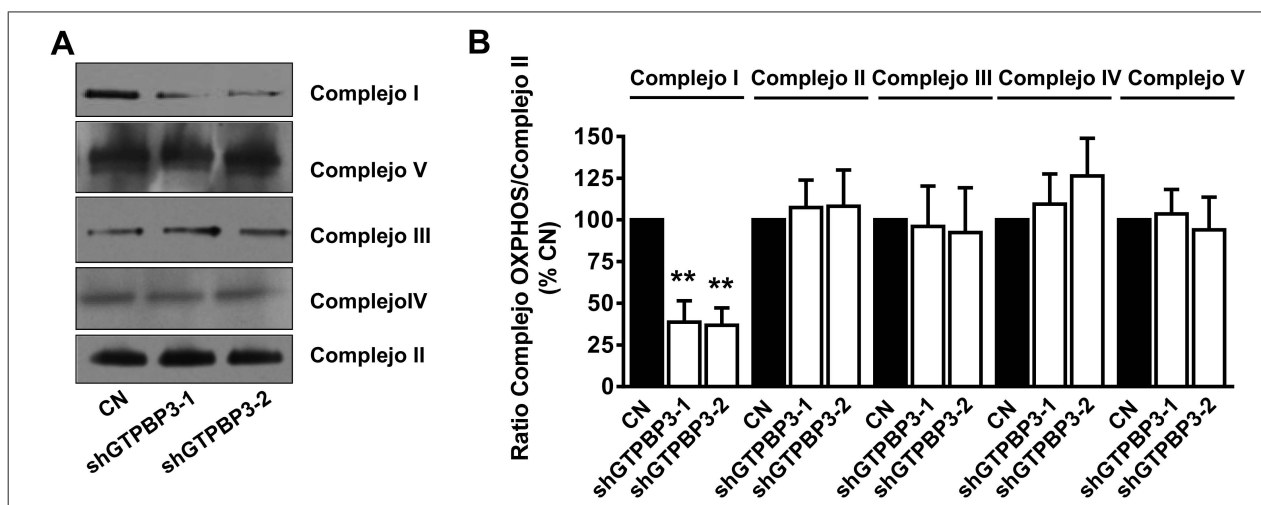


Figura 54. Disminución del nivel de Complejo I en las células shGTPBP3. A) Análisis de los niveles de los complejos OXPHOS en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el

control negativo (CN) mediante electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida en gradiente (BN-PAGE). **B**) Análisis densitométrico de los niveles de los complejos OXPHOS normalizados con los del Complejo V como control de carga y representados en porcentaje del control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (** $p < 0.01$).

Por tanto todos estos datos en conjunto apoyan la idea de que el ensamblaje del Complejo I está severamente afectado por el silenciamiento estable de *GTPBP3* y que esa afectación ocurre en etapas tempranas previas a la formación de intermediarios de ensamblaje.

La subunidad ND1 participa en la formación temprana de un subcomplejo de ~400 kDa que nuclea el proceso de ensamblaje del Complejo I (Ghezzi & Zeviani, 2012; Mimaki *et al.*, 2012). Por lo tanto, un defecto en la síntesis de ND1 podría ser responsable de los niveles reducidos del Complejo I en las células sh*GTPBP3*. No obstante, el efecto del silenciamiento estable de *GTPBP3* sobre los niveles en estado estacionario de la subunidad ND1 y del Complejo I (Figuras 52 y 54, respectivamente) parecen más severos que el efecto más suave que encontramos en la síntesis de ND1 (Figura 50), sugiriendo que hay una importante perturbación en la estabilidad y/o ensamblaje del Complejo I. A este respecto, es importante señalar que defectos en el ensamblaje temprano del Complejo I producen una rápida disminución de la subunidad ND1 (Zurita Rendon & Shoubbridge, 2012). Por consiguiente, decidimos analizar la expresión de algunos de los genes que codifican tales factores (Ghezzi & Zeviani, 2012; Mimaki *et al.*, 2012; Zurita Rendon & Shoubbridge, 2012).

Como se muestra en la Figura 55, la expresión de los genes *NDUFAF3* y *NDUFAF4* está reducida significativamente. Se debe resaltar que en las mitocondrias derivadas de pacientes con mutaciones en el gen *NDUFAF3*, el ensamblaje del Complejo I está interrumpido sin que se observe acumulación de intermediarios, lo que apoya nuestra observación de que no parece que ocurra una acumulación de intermediarios del Complejo I en las células sh*GTPBP3*. También se ha mostrado que hay una fuerte interacción entre *NDUFAF3* y *NDUFAF4*, de forma que, la disminución de la expresión de uno de ellos conduce simultáneamente al descenso de ambas proteínas (Saada *et al.*, 2009). Esto sugiere que la disminución en la expresión de *NDUFAF3* y *NDUFAF4* que encontramos en las células sh*GTPBP3* puede tener un impacto importante en el nivel de ambas proteínas y, por tanto, en el ensamblaje del Complejo I. Por ello, proponemos que el silenciamiento estable de *GTPBP3* produce una señalización retrógrada que afecta a la expresión de *NDUFAF3* y de *NDUFAF4*, lo que a su vez afecta al ensamblaje

del Complejo I y contribuye a la rápida disminución de la subunidad ND1. De acuerdo con esta hipótesis, la disminución de ND1 observada en los experimentos de pulso (Figura 50) puede ser debida, al menos parcialmente, a una proteólisis rápida de la proteína ND1 recién sintetizada.

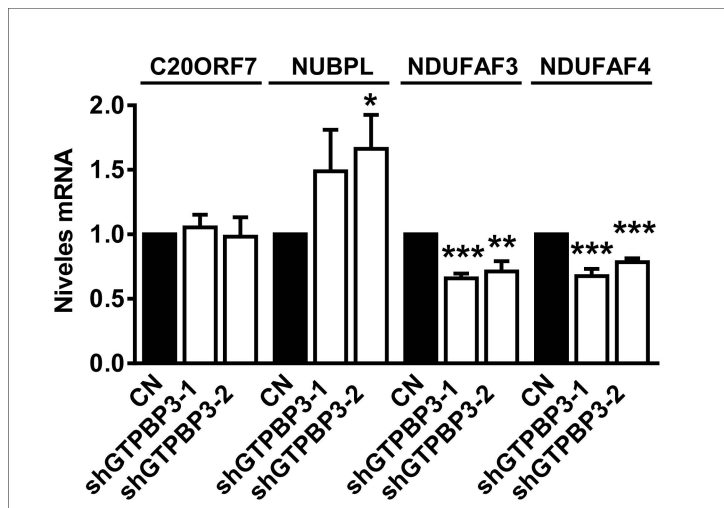


Figura 55. La expresión de los genes codificadores de los factores de ensamblaje NDUFAF3 y NDUFAF4 está disminuida en las células shGTPBP3. Análisis de los niveles de los mRNAs de *C20ORF7*, *NUBPL*, *NDUFAF3* y *NDUFAF4* en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) mediante qRT-PCR. Se muestran las medias y el SEM de 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

4.4. Señalización retrógrada en las células shGTPBP3

AMPK regula la mayoría de los aspectos de la función celular y media respuestas adaptativas de las células con disfunción mitocondrial (Canto & Auwerx, 2010; Hardie, 2011; Viollet *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Por ello, nos preguntamos si la disminución de la expresión de *NDUFAF3* y *NDUFAF4* podía estar relacionada con la activación de AMPK en las células shGTPBP3. Para abordar este punto, primero tratamos durante 48 horas las células shGTPBP3 y el control negativo con 1 mM de 5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1- β -D-ribofuranosido (AICAR), un activador de AMPK ampliamente usado, lo que produjo un incremento en la fosforilación de AMPK en todas las células (Figura 56A) y, simultáneamente, la reducción de los niveles de mRNA de *NDUFAF4* en las células shGTPBP3 y en el control negativo (Figura 56B). Además, tratamos las células con 5 μ M de Compuesto C, un inhibidor de la fosforilación de AMPK (Figura 56A), observando un aumento concomitante de los niveles de mRNA de *NDUFAF4* en las células shGTPBP3 hasta alcanzar los niveles mostrados por las células control (Figura 56B). Todos estos resultados juntos sugieren que la activación de AMPK participa en la disminución de la expresión del gen *NDUFAF4* en las células shGTPBP3.

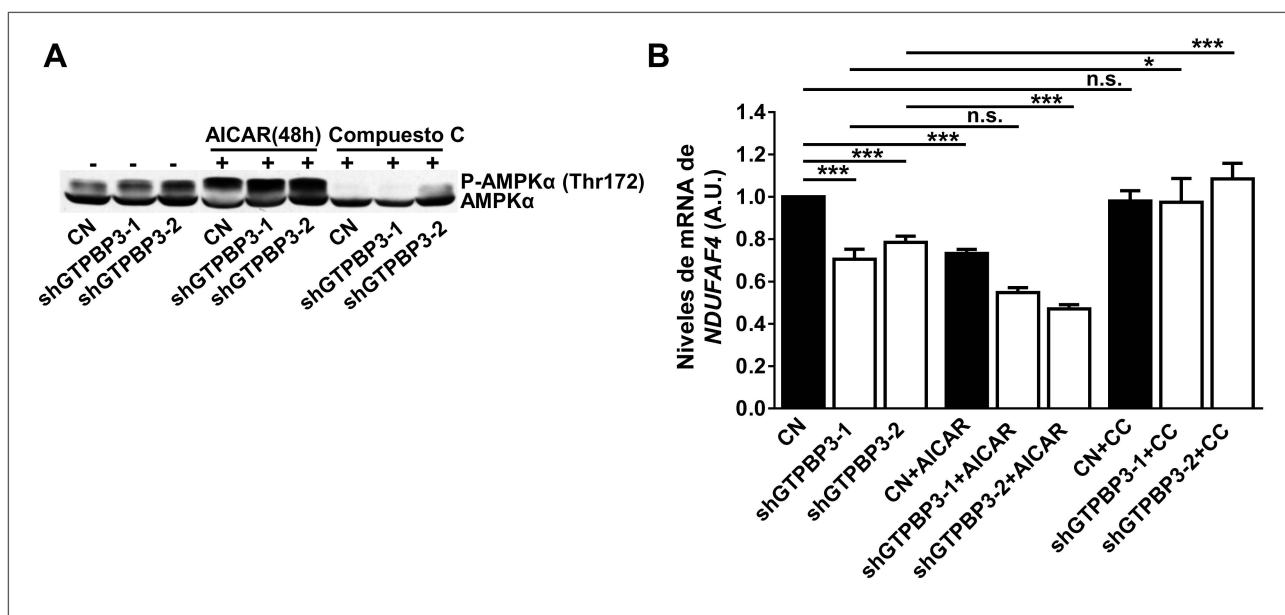


Figura 56. La señalización mediada por AMPK disminuye los niveles de mRNA de los factores de ensamblaje del Complejo I, NDUFAF3 y NDUFAF4. A) Inmunodetección de fosfo-AMPK α en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) sin tratar, tratadas con AICAR (1mM) durante 48 horas y tratadas con el Compuesto C (5 μ M) durante 1 hora. La membrana se incubó también con anti-AMPK α . **B)** Análisis de los niveles de mRNA de *NDUFAF4* en las células shGTPBP3 y en el control negativo mediante qRT-PCR sin tratar, tratadas con AICAR (1mM) durante 48 horas y tratadas con el Compuesto C (CC, 5 μ M) durante 1 hora. Se muestran las medias y el SEM obtenidos a partir de 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas (* p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001). n.s.: no significativo.

La disminución del factor de ensamblaje NDUFAF4 se espera que produzca una disminución de los niveles de NDUFAF3 (o viceversa) y afecte a la biogénesis del Complejo I (Saada *et al.*, 2009; Zurita Rendon & Shoubbridge, 2012). De acuerdo con esta premisa, se encontró que los niveles en estado estacionario del Complejo I estaban disminuidos tras el tratamiento con AICAR en las células shGTPBP3 y NC (Figura 57, A y C). En cambio, el tratamiento con el Compuesto C promovió la estabilización del Complejo I (Figura 57, B y C).

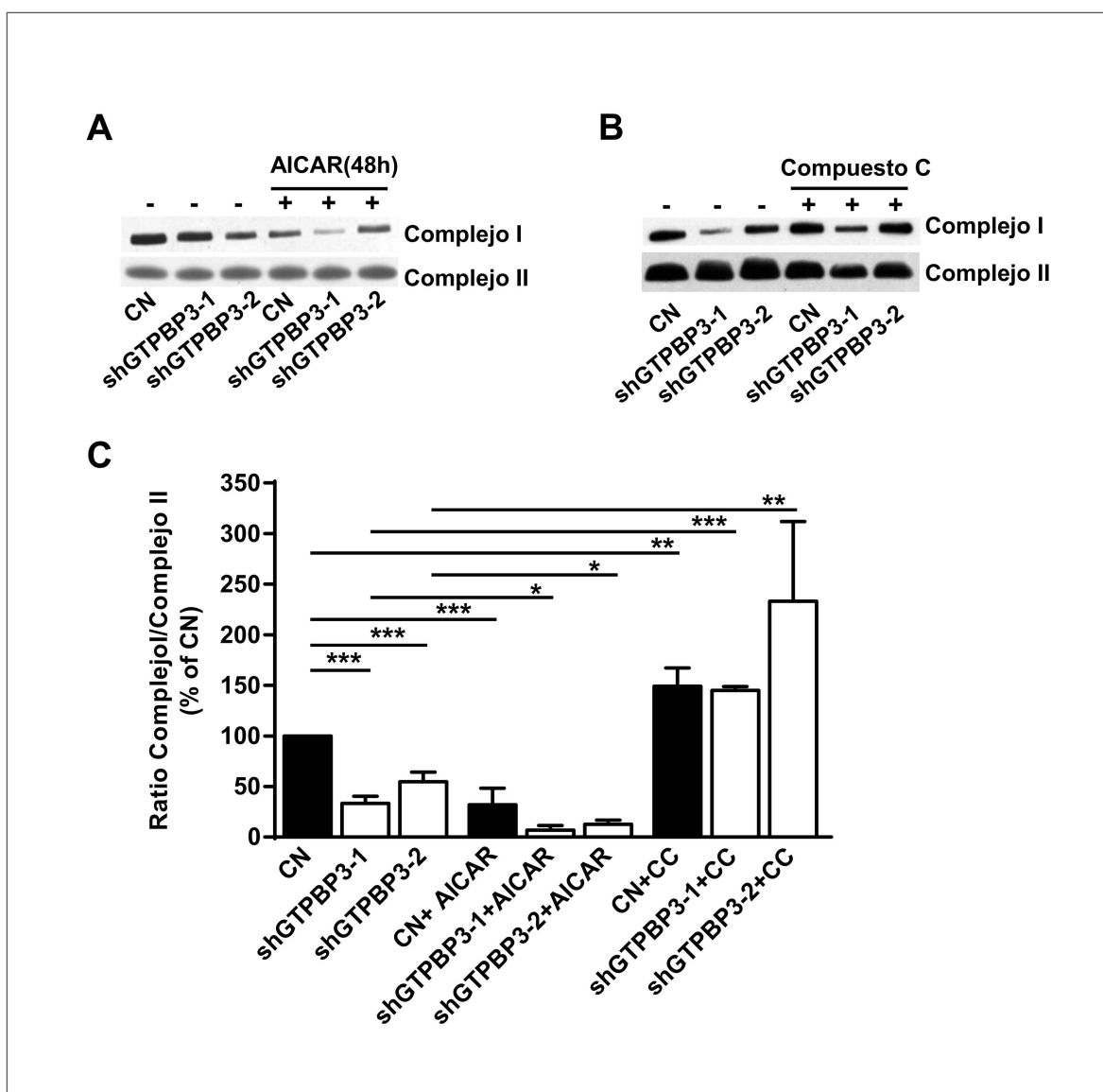


Figura 57. Niveles del Complejo I tras el tratamiento con AICAR y con el compuesto C. **A)** Inmunodetección del Complejo I tras electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente nativo (BN-PAGE) en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y control negativo (CN), sin tratar (-) y tratadas (+) con AICAR (1 mM) durante 48 horas. **B)** Inmunodetección del Complejo I tras electroforesis en gel nativo de poliacrilamida en gradiente (BN-PAGE) en las células shGTPBP3 y en el control negativo sin tratar y tratadas con el Compuesto C (5 μ M) durante 1 hora. En **A** y **B** las membranas se incubaron también para detectar el Complejo II como control de carga. **C)** Análisis densitométrico de los niveles del Complejo I normalizados con el control de carga y representados como porcentaje del control negativo. Se muestran las medias y el SEM obtenidos a partir de 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$). n.s.: no significativo.

La activación de AMPK se ha relacionado con la sobre-expresión de *UCP2* (Calegari *et al.*, 2011; Foretz *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2008). Por ello hemos analizado las relaciones entre la activación de AMPK y la inducción de *UCP2* observada en las células shGTPBP3.

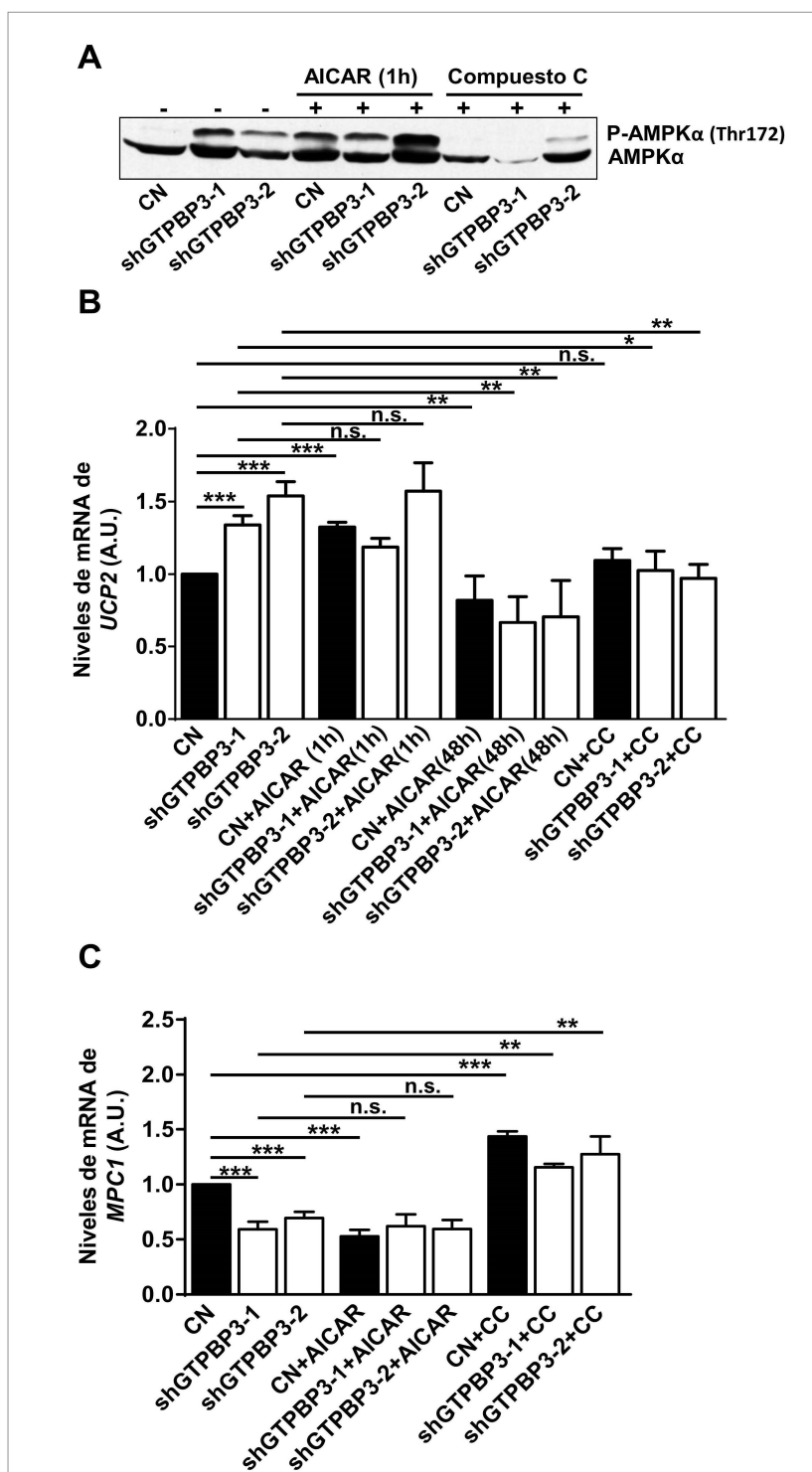


Figura 58. Niveles del mRNA de UCP2 tras el tratamiento con AICAR y el compuesto C.

A) Immunodetección de fosfo-AMPK α en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) sin tratar (-), tratadas (+) con AICAR (1 mM) durante 1 hora y tratadas (+) con el Compuesto C (5 μ M) durante 1 hora. La membrana se incubó también para detectar AMPK α . **B)** Análisis de los niveles de mRNA de UCP2 en las células shGTPBP3 y en el control negativo mediante qRT-PCR sin tratar, tratadas con AICAR (1 mM) durante 1 hora o 48 horas y tratadas con el Compuesto C (CC, 5 μ M) durante 1 hora. **C)** Análisis de los niveles de mRNA de MPC1 en las células shGTPBP3 y en el control negativo mediante qRT-PCR sin tratar, tratadas con AICAR (1 mM) durante 1 hora y tratadas con el Compuesto C (CC, 5 μ M) durante 1 hora. Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). n.s.: no significativo.

Hemos encontrado que el tratamiento con AICAR (1 mM durante 1 hora) aumentaba los niveles de mRNA de UCP2 en las células control, pero no así en las células shGTPBP3 (Figura 58B). Es posible que una activación exacerbada de AMPK en las células shGTPBP3 o la activación de rutas independientes de AMPK (Corton *et al.*,

1995) interfieran de alguna manera con la inducción de *UCP2* en las células shGTPBP3. De hecho, un tratamiento más largo con AICAR (1 mM durante 48 horas) no afecta los niveles de mRNA de *UCP2* en las células control y reduce su expresión en las células shGTPBP3 hasta el nivel de las células control. Llamativamente, el tratamiento con el Compuesto C, que es un inhibidor de la activación de AMPK, reduce significativamente los niveles de mRNA de *UCP2* en las células shGTPBP3 (Figura 58B), apoyando la idea de que la inducción en estas células está mediada por AMPK.

Se ha visto recientemente que *UCP2* reconstituido en vesículas lipídicas cataliza el intercambio desde lados opuestos de la membrana de malato, oxalacetato y aspartato por fosfato y un protón (Vozza *et al.*, 2014). Por consiguiente, se piensa que *UCP2* limita el catabolismo del piruvato originado por la glucosa mediante la exportación de compuestos C4 fuera de la mitocondria, mientras que promueve la oxidación de sustratos alternativos como la glutamina o los ácidos grasos (Kukat *et al.*, 2014; Vozza *et al.*, 2014). Por lo tanto, la inducción de *UCP2* en las células shGTPBP3 puede ser un mecanismo compensatorio para el defecto del Complejo I exhibido por estas células, favoreciendo el flujo de electrones desde el Complejo II y/o ETF.

Otros datos han mostrado que la supresión del transportador del piruvato (MPC) mediante inhibición transcripcional o farmacológica induce también una forma de flexibilidad metabólica asociada con el uso de lípidos y glutamina para mantener el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCAC) (Vacanti *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). Estos datos junto al hecho de que los pacientes con mutaciones en *GTPBP3* suelen presentar acidosis láctica (Kopajtich *et al.*, 2014), nos llevó a hipotetizar que la disminución crónica de MPC podría ser una respuesta adaptativa de las células deficientes para *GTPBP3*. Por ello, analizamos la expresión de *MPC1*, que codifica una de las dos subunidades parálogas que forman la MPC humana (Gray *et al.*, 2014), en las células shGTPBP3 y encontramos una disminución significativa del 40% en los niveles de mRNA (Figura 58C). A continuación, nos preguntamos si la activación de AMPK podía jugar un papel en este efecto. Al tratar las células CN con AICAR (1 mM) durante 1 hora se observó una disminución significativa en los niveles de mRNA de *MPC1* similar a la que se encontraba en las células shGTPBP3 sin tratar (Figura 58C). Por otro lado, no se encontró ningún efecto en la expresión de *MPC1* al tratar las células shGTPBP3 con AICAR (1 mM) durante 1 hora (Figura 58C). Sin embargo, el tratamiento con el Compuesto C aumentó los niveles de mRNA de *MPC1* en las células shGTPBP3 hasta alcanzar los valores exhibidos por las células CN (Figura 58C). Estos datos sugieren que la expresión de

MPC1 en las células shGTPBP3 ocurre a través de un mecanismo en el que interviene la activación de AMPK.

4.5. Expresión de genes implicados en glucólisis, oxidación de ácidos grasos y catabolismo de la glutamina

La activación de AMPK moviliza la glucosa hacia procesos como la glucólisis y activa la oxidación de ácidos grasos para la generación de ATP (Canto & Auwerx, 2010; Hardie, 2011; Mihaylova & Shaw, 2011). No obstante, tanto la sobre-expresión de *UCP2* como la infra-expresión de *MPC1* han sido asociados con un cambio metabólico que determina la oxidación del piruvato, de la glutamina y de los ácidos grasos para proveer de equivalentes reducidos para el sistema OXPHOS (Bouillaud, 2009; Kukat *et al.*, 2014; Pecqueur *et al.*, 2009; Vacanti *et al.*, 2014). Por lo tanto, analizamos la expresión de algunos genes implicados en estas rutas con la idea de obtener un mayor conocimiento de los cambios metabólicos experimentados por las células shGTPBP3. Encontramos que las células shGTPBP3 muestran un aumento en la expresión de *GLUT1*, un transportador de glucosa que se activa transcripcionalmente y post-transcripcionalmente mediante AMPK (Barnes *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2013), y del gen *LDHB*, codificador de la lactato deshidrogenasa B (la isoenzima que mayoritariamente cataliza la conversión del piruvato a lactato, con la concomitante interconversión de NADH y el NAD⁺ en el corazón)(Figura 59) Estos datos sugieren que la glucólisis y la producción de lactato están activadas en las células shGTPBP3. Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de la lactato deshidrogenasa A (*LDHA*), la isoenzima principal en hígado y músculo esquelético, y la fosfofructoquinasa (*PFK1*), uno de los reguladores principales de la glucólisis (Figura 59). No obstante, se sabe que *PFK1* puede activarse indirectamente por AMPK mediante fosforilación de la fosfofructoquinasa 2 (*PFK2*), que convierte la fructosa 6 fosfato en fructosa-2,6-bisfosfato, un estimulador alostérico de la *PFK1* (Marsin *et al.*, 2000).

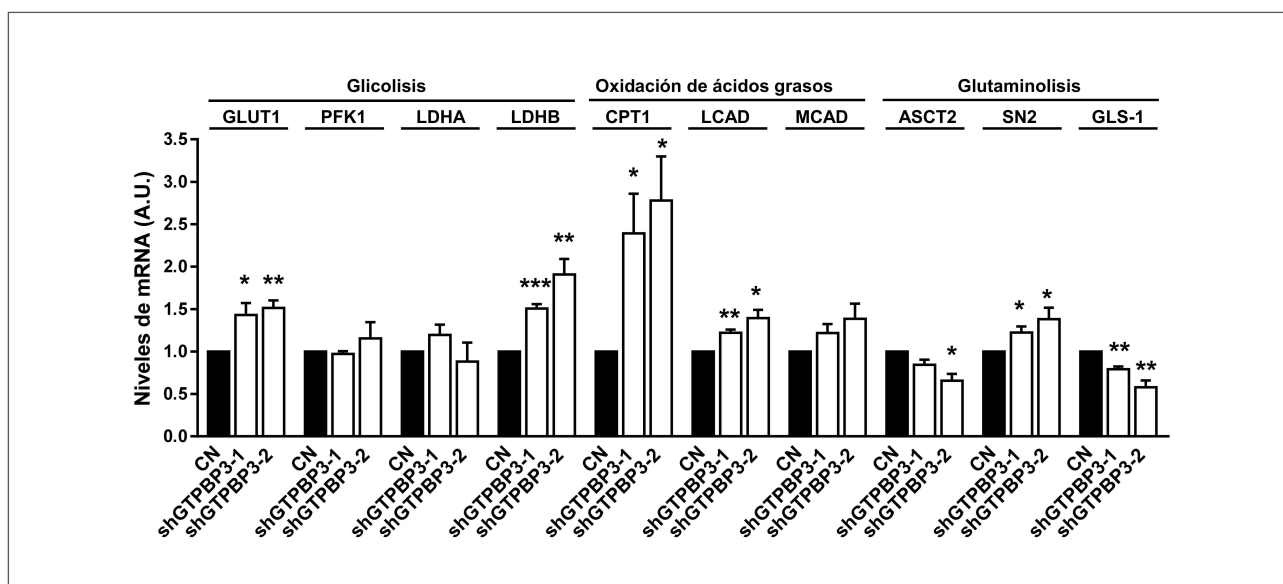


Figura 59. Expresión de genes implicados en glucólisis, oxidación de ácidos grasos y catabolismo de glutamina en las células shGTPBP3. Análisis mediante qRT-PCR en las células shGTPBP3 (shGTPBP3-1 y shGTPBP3-2) y en el control negativo (CN) de los niveles de mRNA de genes partícipes de la glucólisis (*GLUT1*, *PKF1*, *LDHA* y *LDHB*), oxidación de ácidos grasos (*CPT1*, *LCAD*, *MCAD*) y glutaminólisis (*ASCT2*, *SN2* y *glutaminasa*). Se muestran las medias y el SEM obtenidos en 3 experimentos diferentes. Las estrellas indican diferencias significativas con los valores control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

AMPK también estimula la oxidación de ácidos grasos para incrementar los niveles de energía (Canto & Auwerx, 2010). La fosforilación de la acetil CoA carboxilasa (Cox *et al.*), la enzima que cataboliza los pasos iniciales de síntesis de lípidos, la inactiva. Esto libera la expresión de *CPT1B*, una enzima mitocondrial que asociada a la membrana externa mitocondrial, media el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la misma, aumentando el flujo de ácidos grasos a la mitocondria para la β -oxidación (Fillmore & Lopaschuk, 2013). Nosotros encontramos un aumento significativo en los niveles de expresión de *CPT1B* en las células shGTPBP3, así como en los de la deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga (*LCAD*), que cataliza el primer paso de su β -oxidación utilizando FAD como cofactor (Figura 59). Estos datos sugieren que el silenciamiento estable de GTPBP3 aumenta la oxidación de ácidos grasos.

Finalmente, se exploró la expresión de algunos genes relacionados con la glutaminólisis, como los genes codificantes de la *glutaminasa* y los transportadores de la glutamina *ASCT2* y *SN2*. Se encontró que los niveles de mensajero de la *glutaminasa* (*GLS-1*), la enzima que inicia la ruta de conversión de la glutamina a α -cetoglutarato, estaban significativamente disminuidos en las células shGTPBP3 (Figura 59).

Por tanto, en conjunto, nuestros datos juntos sugieren que la inhibición de la oxidación del piruvato debido a la sobre-expresión de *UCP2* y la infra-expresión de *MPC1* pueden reconducir el metabolismo celular estimulando la oxidación de ácidos grasos, pero no la glutaminólisis, como principal ruta para suplir los equivalentes reducidos al sistema OXPHOS en las células shGTPBP3.

Discusión

Mutaciones en *GTPBP3* causan cardiomiopatía hipertrófica, acidosis láctica y encefalopatía, y han sido asociadas con defectos en la traducción mitocondrial (Kopajtich *et al.*, 2014). En este trabajo se muestra que la expresión deficiente de *GTPBP3* afecta al estado de modificación de los mt-tRNAs y desencadena una señalización dependiente de AMPK, que conduce a respuestas adaptativas y mal-adaptativas a través de la sobre-expresión de *UCP2* y la infra-expresión de factores de ensamblaje del Complejo I y de *MPC*.

GTPBP3 es homólogo de los genes *mnmE* y *MSS1* de *E. coli* y levadura, respectivamente, por consiguiente se piensa que la proteína humana debe estar implicada directamente en la modificación post-transcripcional de los mt-tRNAs humanos (Li & Guan, 2002; Li & Guan, 2003; Umeda *et al.*, 2005). En *E. coli*, MnmE, una proteína de unión a GTP y a tetrahidrofolato, forma un complejo con la proteína MnmG (homóloga de MTO1) en el que ambas proteínas son funcionalmente interdependientes (Yim *et al.*, 2006). El complejo cataliza *in vitro* la reacción de modificación del tRNA, en la que MnmE juega un doble papel: provee el derivado de tetrahidrofolato que actúa como fuente del grupo metileno que se unirá directamente al carbono 5 de la U34, y orquesta la reacción de modificación mediante su ciclo GTPasa (Armengod *et al.*, 2014; Armengod *et al.*, 2012; Moukadiri *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2013). MnmG es una proteína de unión a FAD y NADH que presumiblemente experimenta un ciclo de oxidación-reducción durante la reacción de modificación y juega un papel principal en la unión del tRNA (Armengod *et al.*, 2014; Armengod *et al.*, 2012; Moukadiri *et al.*, 2009; Osawa *et al.*, 2009). En *E. coli* se añade amonio o glicina al carbono 5 del grupo metileno, mientras en los mt-tRNAs de levadura o de humano se añade glicina o taurina, respectivamente (Bjork *et al.*, 1987; Hillen *et al.*, 1978; Suzuki *et al.*, 2001). Las mutaciones en los genes *mnmE* o *mnmG* producen la pérdida de la modificación en la posición 5 de la U34 en los tRNAs sustrato (Elseviers *et al.*, 1984; Yim *et al.*, 2006). Se ha visto que las mutaciones en los genes homólogos de levadura producen el mismo efecto en los mt-tRNAs (Umeda *et al.*, 2005). Sin embargo, es difícil de analizar directamente el estado de modificación en los mt-tRNAs humanos, porque los procedimientos existentes requieren grandes cantidades de material biológico para el análisis de los mt-tRNAs

(Suzuki & Suzuki, 2007; Suzuki & Suzuki, 2014; Suzuki *et al.*, 2002; Umeda *et al.*, 2005; Yasukawa *et al.*, 2000a; Yasukawa *et al.*, 2000b). En este trabajo presentamos una técnica indirecta basada en la sensibilidad hacia la digestión con angiogenina para detectar la falta del grupo τm^5 en el mt-tRNA^{Lys} y en el mt-tRNA^{Leu(UUR)} en las células shGTPBP3. Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia experimental de que la expresión deficiente de *GTPBP3* altera la composición de ambos tRNAs, puesto que los mt-tRNAs obtenidos de células shGTPBP3 son más sensibles a la angiogenina que los de células control. Además, los datos indican que la tiolación en la posición 2 de la U34, que es catalizada por TRMU (Sasarman *et al.*, 2011), no se encuentra afectada por el defecto de *GTPBP3*, apoyando la idea de que la función de TRMU es independiente de la presencia del grupo τm en la posición 5.

Debemos resaltar que en el modelo celular construido (células shGTPBP3), el silenciamiento de *GTPBP3* deja un remanente de proteína cercano al 35% (Figura 30) y, en consecuencia, podemos asumir que parte de los tRNAs substrato estén modificados. A pesar de ello, el ensayo con angiogenina muestra un patrón de digestión diferencial entre los mt-tRNAs purificados a partir de las células shGTPBP3 o CN. Por lo tanto, pensamos que el ensayo puede ser una técnica cualitativa útil para estimar el fallo en la modificación del mt-tRNA en células de pacientes, incluso en el caso de mutaciones con pérdida parcial de función.

Las modificaciones en el tRNA dependientes de las proteínas homólogas a *GTPBP3* y *MTO1* son importantes para la fidelidad y la velocidad de la traducción (Bregeon *et al.*, 2001; Elseviers *et al.*, 1984; Kruger *et al.*, 1998; Urbonavicius *et al.*, 2001). Por lo tanto, se espera que defectos de *GTPBP3* afecten a la traducción mitocondrial. De hecho se halló una disminución del 20-30% en la traducción mitocondrial durante el silenciamiento transitorio de *GTPBP3* con siRNAs y en algunas células (pero no en todas) de pacientes portadores de mutaciones en *GTPBP3* (Kopajtich *et al.*, 2014; Villarroya *et al.*, 2008). En esta Tesis, hemos encontrado que el silenciamiento estable de *GTPBP3* no causa cambios consistentes en la síntesis global de proteínas, aunque sí observamos una disminución significativa en el marcaje de las subunidades ND1 y ND3 del Complejo I (Figura 50). Puede ser que mecanismos compensatorios, como el aumento de otros

componentes traduccionales (mt-tRNAs, aminoacil-sintetasas, factores de elongación, etc), contribuya a mejorar la eficiencia de la síntesis mitocondrial de proteínas en las células shGTPBP3. No obstante, la mayor sensibilidad de estas células al cloranfenicol sugiere que la eficiencia de la traducción mitocondrial está afectada en cierto grado en estas células (Figura 51). La pregunta que se plantea es pues, ¿por qué la afectación aparentemente suave de la traducción mitocondrial en las células shGTPBP3 resulta en una disminución tan importante en los niveles y actividad del Complejo I y, sin embargo, no afecta ni a los niveles ni a la actividad del Complejo IV que también incluye subunidades codificadas por el genoma mitocondrial?

Es posible que la traducción de los mRNAs de ND1 y ND3 sea especialmente dependiente de la correcta modificación de los mt-tRNAs y, de esta manera, esté más afectada por el defecto de GTPBP3. Datos estructurales y datos de experimentos *in vivo* sobre las modificaciones del tipo xm⁵U (donde "m" se refiere al grupo metileno unido al carbono 5 y "x" simboliza cualquiera de los grupos carboximetilo, aminometilo, metilaminometilo y taurinometilo que pueden estar unidos al anterior) son importantes para modular la geometría del apareamiento codon:anticodon en la posición de tambaleo y para la eficiencia relativa del anticodon en la lectura del codon *cognate* o propio (Kruger *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2004; Westhof *et al.*, 2014). La falta de las modificaciones tipo xm⁵U causa un corrimiento de la pauta de lectura *in vivo* (Bregeon *et al.*, 2001; Urbonavicius *et al.*, 2001), lo que puede estar favorecido por la concurrencia de varios factores, como el enlentecimiento o *pausing* traduccional y la presencia de secuencias en el mRNA que predispongan al resbalón del ribosoma y que aún están pobremente definidas en los mt-mRNAs (Atkins *et al.*, 1979; Bregeon *et al.*, 2001; Jager *et al.*, 2013; O'Connor, 1998; Temperley *et al.*, 2010; Urbonavicius *et al.*, 2001). Por lo tanto, se puede especular que los mt-tRNAs hipomodificados (a causa de la baja expresión de GTPBP3) pueden afectar en cierto grado a la traducción de los mensajeros de ND1 y ND3 y, así, a la biogénesis del Complejo I. Esto alteraría la relación AMP/ATP y activaría las rutas de señalización retrógrada dependientes de AMPK, provocando la disminución de los factores de ensamblaje NDUFAF3 y NDUFAF4 y la sobre-expresión de UCP2, lo que al final agravaría la disfunción del Complejo I. Otra posibilidad (no

necesariamente alternativa) es que la hipomodificación de los mt-tRNAs promueva la incorporación errónea de aminoácidos durante la traducción, de tal forma que alteraciones cualitativas de las subunidades codificadas por el mtDNA (principalmente del Complejo I) tengan un rol patogénico en las células shGTPBP3. Datos estructurales indican que las modificaciones del tipo xm5U no son necesarias para prevenir el apareamiento U3•U34 (en la posición de tambaleo) cuando el anticodon es rico en pirimidinas (como ocurre con los tRNAs que decodifican Lys), pero podrían ser necesarias en otros caso (Murphy *et al.*, 2004). Según esta propuesta, la pérdida de la modificación en la U34 puede promover el apareamiento erróneo de ciertos tRNAs hipomodificados con codones impropios del tipo *near-cognate*. La incorporación errónea de aminoácidos puede estar también favorecida por competición entre tRNAs *cognate* y *near cognate*, ya que se han observado frecuencias de error más altas cuando los tRNAs *cognate* son poco abundantes (Kramer & Farabaugh, 2007). La abundancia relativa de mt-tRNAs podría estar modulada, por ejemplo, por la estabilidad de cada especie de mt-tRNA hipomodificado.

Otros mecanismos pueden contribuir también al fenotipo observado en las células shGTPBP3. Por ejemplo, los tRNAs hipomodificados podrían participar directamente y tener un papel señalizador en el diálogo mitocondria-núcleo. Esta hipótesis está basada en el hallazgo de que la pérdida de la modificación en la uridina de tambaleo de los tRNAs citosólicos de levadura afecta a la expresión génica, perturbando la señalización celular de manera independiente de la traducción (Zinshteyn & Gilbert, 2013). Además, algunos estudios describen como los mt-tRNAs pueden ser exportados al citoplasma y seguidamente asociarse con proteínas AGO, sugiriendo un papel de los mt-tRNAs en el silenciamiento génico (Burroughs *et al.*, 2011; Maniataki & Mourelatos, 2005). Si este proceso puede estar favorecido por la hipomodificación de los mt-tRNA es un tema que está todavía por explorar. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que GTPBP3 tenga un papel adicional a la modificación de los mt-tRNAs que pueda contribuir al estado funcional de la mitocondria, pues se ha visto que otras enzimas modificadoras de mt-tRNAs están implicadas en otras funciones celulares, incluyendo señalización celular, regulación de la transcripción nuclear, supresión de tumores y

biogénesis de mt-tRNAs (Armengod *et al.*, 2014). A este respecto, es particularmente interesante el hallazgo de que MTO1 interacciona con las proteínas mitorribosomales de una manera independiente de RNA, lo que sugiere un papel adicional de MTO1 en el ensamblaje o estabilidad de los ribosomas (Tischner *et al.*, 2015).

La secuenciación del exoma de 790 individuos sospechosos de miopatía mitocondrial, junto con la secuenciación de genes candidatos en 18 individuos adicionales y el análisis de segregación en familias permitió identificar 13 alelos diferentes de *GTPBP3* en 11 individuos de 9 familias, ligando mutaciones en *GTPBP3* a la deficiencia combinada del Complejo I y el Complejo IV (en 9 casos de 11, 9/11), cardiomiopatía (9/11), acidosis láctica (11/11) y encefalopatía (4/11). Es importante hacer notar que se han encontrado características fenotípicas similares en pacientes con defectos en MTO1, la proteína presuntamente compañera de *GTPBP3* en la función modificadora de mt-tRNAs (Baruffini *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2014). También conviene resaltar que la afectación en los complejos OXPHOS es dependiente del tipo celular, tanto en pacientes con mutaciones en MTO1 como en *GTPBP3* (Baruffini *et al.*, 2013; Ghezzi *et al.*, 2012; Tischner *et al.*, 2015), tal como ocurre en otras enfermedades OXPHOS causadas por factores nucleares relacionados con la traducción mitocondrial (Boczonadi & Horvath, 2014; Gaignard *et al.*, 2013; Kemp *et al.*, 2011; Zeharia *et al.*, 2009). Estudios recientes en un modelo de ratón han confirmado el efecto específico de tejido del defecto MTO1 sobre los niveles de varias proteínas OXPHOS (Tischner *et al.*, 2015). En las células sh*GTPBP3*, sólo hemos encontrado afectación consistente en el Complejo I. No obstante, es posible que una mayor inactivación de la función de *GTPBP3* pueda resultar en un fallo del Complejo IV, ya que ocasionalmente observamos una disminución en los niveles de estado estacionario de la subunidad COX IV (Figura 52). En cualquier caso, considerando que la señalización retrógrada mitocondrial contribuye al fallo de la biogénesis del Complejo I mediante la disminución de los factores de ensamblaje NDUFAF3 y NDUFAF4 (Figura 55), es razonable pensar que parte del fenotipo de un determinado tipo celular dependerá de su capacidad para responder a la señalización retrógrada, que básicamente está determinado por la intensidad de

tales señales y por el programa de expresión genético y epigenético de cada tipo celular.

La proteína AMPK se encuentra activada en las células shGTPBP3 (Figura 44), posiblemente como consecuencia de los bajos niveles de ATP (Figura 42). Se sabe que la activación de AMPK produce la inhibición de rutas biosintéticas que consumen energía, mientras que estimula la producción de ATP a través de rutas catabólicas como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos. Además, la activación de AMPK participa en la regulación de otras muchas funciones, incluyendo la biogénesis y eliminación de mitocondrias, la autofagia y el crecimiento celular (Canto & Auwerx, 2010; Hardie, 2011; Mihaylova & Shaw, 2011; Viollet *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Por lo tanto, la activación de AMPK puede ser responsable de la ralentización del crecimiento celular (Figura 46), la activación de la autofagia en condiciones de ayuno (Figura 47) y el mantenimiento del número de copias relativo de mtDNA (Figura 49D) que se observa en células shGTPBP3.

La activación de AMPK también parece estar relacionada con la inducción de los niveles de *UCP2* y la baja expresión de *NDUFAF3*, *NDUFAF4* y *MPC1* en las células shGTPBP3 (Figuras 58, 56 y 59, respectivamente). Datos recientes apoyan la idea de que *UCP2* actúa como un transportador de metabolitos, exportando compuestos C4 fuera de la mitocondria y produciendo un parón en la oxidación del piruvato, mientras promueve la oxidación de ácidos grasos y glutamina (Bouillaud, 2009; Kukat *et al.*, 2014; Pecqueur *et al.*, 2009; Pecqueur *et al.*, 2008; Vozza *et al.*, 2014). En esta Tesis, se detectó un aumento de los niveles de mRNA de *CPT1* y *LCAD* en las células shGTPBP3 (Figura 59), lo que apunta a un aumento de la oxidación de ácidos grasos en estas células para proporcionar FADH_2 a la cadena de transporte electrónico por medio de la oxidorreductasa-ubiquinona. Dado que *UCP2* promueve el transporte de metabolitos C4, incluyendo oxalacetato (OAA), fuera de la mitocondria, y la oxidación de ácidos grasos produce acetil CoA pero no OAA, es posible que alguna reacción anaplerótica actúe para reponer los intermediarios del TCAC que presumiblemente han sido exportados por *UCP2* en las células shGTPBP3. El aumento de la actividad del Complejo II en las células shGTPBP3 (Figura 43), nos hizo sospechar que el glutamato era un buen candidato. Sin embargo, se encontraron disminuidos los niveles de mensajero de la

glutaminasa, la enzima responsable de la transformación de la glutamina en glutamato (que se transformará en el intermediario α -cetoglutarato del TCAC). Estos resultados sugieren que la reposición de los intermediarios del TCAC a través de la ruta anaplerótica de la glutamina puede ser ineficiente y que la actividad estimulada del Complejo II puede estar dirigida a la máxima explotación de succinato existente para alimentar con FADH_2 el sistema OXPHOS. Es decir, la estimulación de la actividad del Complejo II puede ser una consecuencia de una respuesta global de las células shGTPBP3 para compensar la inactivación del Complejo I. Por ejemplo, es sabido que la sirtuina mitocondrial SIRT3 que se activa por elevadas concentraciones de NAD^+ , una condición promovida por estados de baja energía en la célula, puede deacetilar tanto LCAD (implicada en la oxidación de ácidos grasos) como la succinato deshidrogenasa A (SDHA), aumentando así sus actividades enzimáticas (Cimen *et al.*, 2010; Nogueiras *et al.*, 2012; Verdin *et al.*, 2010; Zhong & Mostoslavsky, 2011). SIRT3 está bajo el control de PGC-1 α (Kong *et al.*, 2010), que resulta activado por AMPK (Canto & Auwerx, 2010). Por ello, es posible que AMPK pueda también modular la actividad del Complejo II.

Como ya mencionamos, el traspaso de equivalentes de reducción al sistema OXPHOS como resultado de la oxidación de ácidos grasos promovida por UCP2 puede ser un mecanismo compensatorio para el defecto del Complejo I observado en las células shGTPBP3. El mejor mantenimiento del consumo de oxígeno (Figura 36) que muestran estas células en comparación con el observado en el silencimiento transitorio (Villarroya *et al.*, 2008) parece estar de acuerdo con esta hipótesis. La asociación física de proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos con supercomplejos OXPHOS puede facilitar un transporte eficaz de electrones y la oxidación de ácidos grasos (a pesar de ser una importante fuente de FADH_2) no resulta en una alta producción de ROS (Schonfeld *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). En este contexto, la disrupción del ensamblaje del Complejo I por medio de la infra-expresión de NDUFAF3 y NDUFAF4 puede ayudar a impedir la entrada de NADH en la ruta OXPHOS. Además, considerando que la inhibición de la actividad del transportador mitocondrial de piruvato (MPC) induce la reprogramación del metabolismo mitocondrial hacia el uso de lípidos y aminoácidos como sustratos para el catabolismo y anabolismo (Vacanti *et al.*,

2014; Yang *et al.*, 2014), creemos que la disminución de MPC1 en las células shGTPBP3 está también relacionada con el uso de ácidos grasos para producir equivalentes reducidos para la cadena respiratoria. Una consecuencia del cambio metabólico promovido por el aumento de UCP2 y la disminución de MPC1 puede ser que, a pesar de que la glucólisis (de glucosa a piruvato) puede estar aumentada en las células shGTPBP3 como sugieren nuestros datos (Figura 59), la mayoría del piruvato no sea utilizado por la mitocondria y sea convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa (Figura 60). Este paso es importante pues convierte NADH de vuelta a NAD⁺, que así está otra vez disponible para que la glucólisis continúe. El desacople entre la glucólisis y la oxidación fosforilativa aumenta la producción de protones y lactato, que pueden llegar a alcanzar niveles perjudiciales para el corazón (Fillmore & Lopaschuk, 2013). Así, es posible que un desacoplamiento entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa pueda contribuir a la cardiomiopatía hipertrófica y la acidosis láctica en los pacientes con defectos en GTPBP3 (y MTO1). Además, los niveles reducidos de ATP que se observan en las células shGTPBP3 indican que las respuestas compensatorias (promovidas por la inducción de AMPK, la sobre-expresión de UCP2 y la infra-expresión de MPC1) no contribuyen a su recuperación, lo que puede ser perjudicial para tejidos con gran demanda energética como el corazón (Fillmore & Lopaschuk, 2013).

Es importante mencionar que el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos se regulan mutuamente a través del llamado ciclo de Randle (Fillmore & Lopaschuk, 2013; Jaswal *et al.*, 2011). Si la reposición de los intermediarios del TCAC exportados de la mitocondria por UCP2 fuera insuficiente, la inhibición de PFK1 (y, por lo tanto, de la glucólisis) por el citrato, según el ciclo de Randle, podría estar disminuida (Figura 60). Este hecho (junto con la disminución de MPC y la esperable inhibición de la piruvato deshidrogenasa mediada por el acetil CoA y el NADH producidos por la oxidación de los ácidos grasos) podría contribuir al desacoplamiento mencionado entre glucólisis y oxidación del piruvato, conduciendo al incremento en la producción de lactato y protones que puede ser deletéreo para el corazón (Fillmore & Lopaschuk, 2013; Jaswal *et al.*, 2011). Investigaciones posteriores deberán clarificar más ampliamente el metabolismo mitocondrial de las células shGTPBP3.

En resumen, proponemos que la hipomodificación de los mt-tRNAs asociada al defecto de GTPBP3 promueve la activación de la señalización por AMPK, produciendo un giro metabólico desde la oxidación de la glucosa a la de los ácidos grasos mediante la sobre-expresión de *UCP2* y la infra-expresión de *MPC1* y los factores de ensamblaje del Complejo I *NDUFAF3* y *NDUDFAF4*. Esta respuesta contribuye a mantener los niveles de ROS, el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial de las células shGTPBP3 relativamente cercanos a los valores de las células control, aunque también puede contribuir a los niveles altos de lactato y al daño cardíaco exhibidos por pacientes con defectos en GTPBP3 y MTO1.

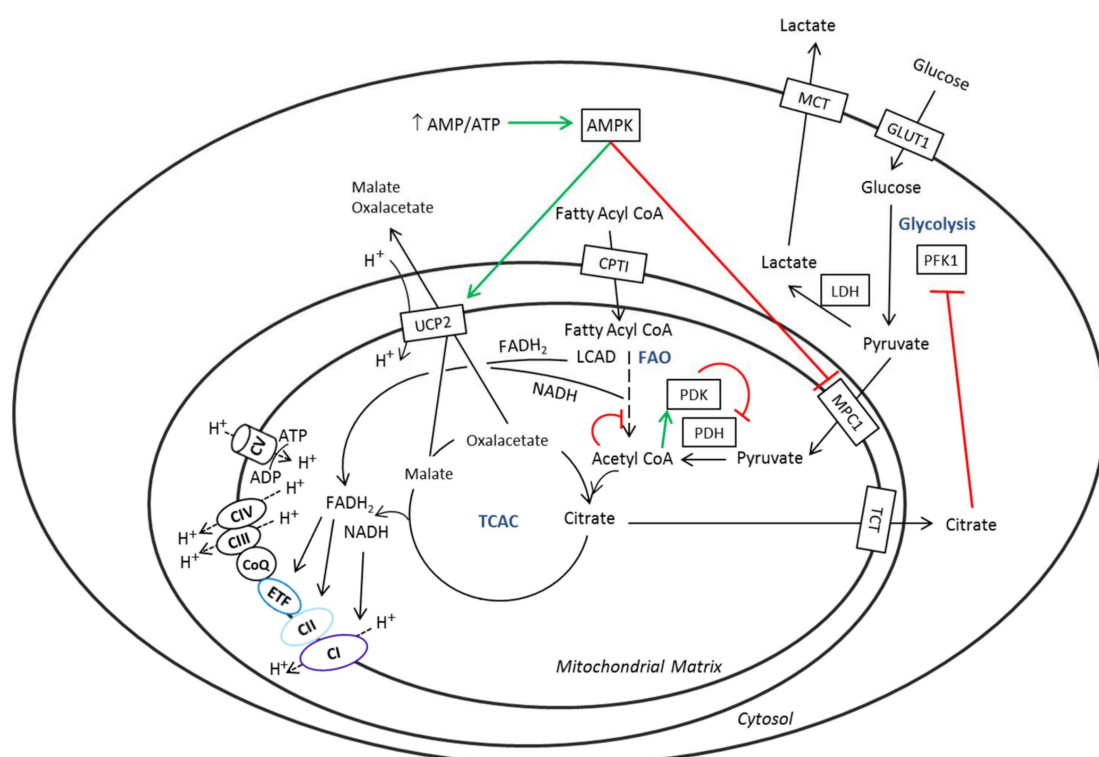


Figura 60. Rutas metabólicas de la glucosa y de los ácidos grasos en las células shGTPBP3.

La entrada de glucosa en la célula está regulada por la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana (como GLUT1). En la glucólisis, el primer paso regulado está controlado por la fosfofructoquinasa (PFK1), mientras que el último paso está catalizado por la piruvato quinasa y produce piruvato y ATP. El piruvato es oxidado en la mitocondria o convertido en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH). Cuando la glucólisis está acoplada a la oxidación de la glucosa, el piruvato entra en la mitocondria mediante el transportador de piruvato (MPC), es convertido a acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), que es regulado por la acción de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa. Finalmente, el acetil CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCAC). El NADH y el FADH₂ generados por las enzimas del TCAC son canalizadas en la cadena de transporte mitocondrial a través del Complejo I y Complejo II, respectivamente. Los ácidos grasos de cadena larga usan la

carnitina y la canitina palmitoil transferasa I (CPTI) para atravesar las membranas mitocondriales. La oxidación de ácidos grasos (FAO) produce acetil CoA, que se incorpora al TCAC, y NADH y FADH₂, que son utilizados en la cadena de transporte electrónico por el Complejo I y la ubiquinona oxidorreductasa ETF, respectivamente. El metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa puede regularse mutuamente por el ciclo Randle (Fillmore & Lopaschuk, 2013; Jaswal *et al.*, 2011). En las células shGTPBP3, donde el Complejo I está disminuido, la activación de AMPK resulta en la infra-expresión de MPC1 (una de las subunidades de MPC) y la sobre-expresión de UCP2. Los cambios en la expresión de estas dos proteínas afectan a la oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos. El aumento de UCP2 en las células shGTPBP3 puede favorecer la exportación del malato y el oxalacetato (OAA) fuera de la mitocondria y promover la FAO. Si el recambio en los intermediarios del TCAC extraídos por UCP2 es insuficiente, la acumulación de acetil CoA puede inhibir la acción de la PDH. Además, bajo ciertas circunstancias, la inhibición de PFK1 (y, por consiguiente, de la glucólisis) por el citrato puede disminuir. En la figura, las líneas rojas y verdes indican acciones regulatorias.

Conclusiones generales

En esta Tesis se ha desarrollado un modelo celular para estudiar las bases moleculares que subyacen en la enfermedad debida a defectos en la proteína GTPBP3. El modelo se basa en el silenciamiento estable de *GTPBP3* mediante shRNAs que reduce los niveles de la proteína hasta aproximadamente un 30% de los observados en las células control.

Los resultados obtenidos conducen a las siguientes conclusiones:

1. Hemos establecido una técnica que por primera vez permite determinar el estado de modificación de la U34 en mt-tRNAs de células deficientes en la proteína GTPBP3. El procedimiento puede ser válido para estudiar los efectos de mutaciones *MTO1* y quizá de mutaciones en otros genes que afecten a la modificación de los mt-tRNAs humanos.
2. La hipomodificación de los mt-tRNAs debida al silenciamiento estable de *GTPBP3* no tiene un efecto severo sobre la traducción mitocondrial aunque se observa una disminución significativa en los niveles de las subunidades ND1 y ND3 del Complejo I.
3. Las células shGTPBP3 exhiben un funcionamiento mitocondrial anómalo que se manifiesta por: *a)* la reducción del potencial de membrana y del consumo de oxígeno, *b)* una mayor capacidad antioxidante, *c)* una reducción severa de la actividad del Complejo I y de los niveles celulares de ATP, *d)* un enlentecimiento del crecimiento celular, *e)* una activación de la autofagia, y *f)* una reducción del tamaño de las mitocondrias y del volumen fraccional mitocondrial.
4. La alteración del estado funcional de las mitocondrias dispara una señalización retrógrada mitocondria-núcleo que altera la expresión de genes nucleares, reduciéndose la expresión de factores de ensamblaje del Complejo I (NDUFAF3 y NDUFAF4) y del transportador mitocondrial de piruvato (MPC1), mientras se incrementa la de la proteína antioxidante UCP2 y la de genes implicados en glucólisis y oxidación de ácidos grasos.

5. Nuestros datos son compatibles con un modelo en el que la hipomodificación produce un estrés traduccional inicial que afecta de manera especial a la expresión de subunidades del Complejo I codificadas por el mtDNA, reduciendo la producción de ATP y activando AMPK. Esta activación lleva a la inducción de mecanismos adaptativos y mal-adaptativos que explican el fenotipo de las células shGTPBP3.
6. La inducción de UCP2, junto a la disminución de los niveles del transportador del piruvato y de los factores de ensamblaje del Complejo I, promueve un cambio metabólico por el que la oxidación del piruvato es sustituida por la oxidación de los ácidos grasos como vía para proporcionar electrones al sistema OXPHOS, provocando un desacoplamiento entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Tal desacoplamiento probablemente explica el incremento de la producción de lactato y protones (acidosis láctica) que, junto a la incapacidad de los mecanismos inducidos para restaurar los niveles de ATP, resultaría especialmente perjudicial para el funcionamiento del corazón.

Bibliografía

Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enriquez JA (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular Cell* **13**: 805-815

Acin-Perez R, Enriquez JA (2014) The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochimica et biophysica acta* **1837**: 444-450

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzimology* **105**: 121-126

Angerer H, Zwicker K, Wumaier Z, Sokolova L, Heide H, Steger M, Kaiser S, Nubel E, Brutschy B, Radermacher M, Brandt U, Zickermann V (2011) A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *Biochemical Journal* **437**: 279-288

Armengod ME, Meseguer S, Villarroya M, Prado S, Moukadiri I, Ruiz-Partida R, Garzon MJ, Navarro-Gonzalez C, Martinez-Zamora A (2014) Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of 2-codon boxes. *RNA Biology* **11**: 1495-1507

Armengod ME, Moukadiri I, Prado S, Ruiz-Partida R, Benitez-Paez A, Villarroya M, Lomas R, Garzon MJ, Martinez-Zamora A, Meseguer S, Navarro-Gonzalez C (2012) Enzymology of tRNA modification in the bacterial MnmEG pathway. *Biochimie* **94**: 1510-1520

Atkins JF, Gesteland RF, Reid BR, Anderson CW (1979) Normal tRNAs promote ribosomal frameshifting. *Cell* **18**: 1119-1131

Barbour JA, Turner N (2014) Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations. *International Journal of Cell Biology* **2014**: 156020

Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, Fougelle F, Carling D, Hardie DG, Baldwin SA (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of cell science* **115**: 2433-2442

Baruffini E, Dallabona C, Invernizzi F, Yarham JW, Melchionda L, Blakely EL, Lamantea E, Donnini C, Santra S, Vijayaraghavan S, Roper HP, Burlina A, Kopajtich R, Walther A, Strom TM, Haack TB, Prokisch H, Taylor RW, Ferrero I, Zeviani M, Ghezzi D (2013) MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Human mutation* **34**: 1501-1509

Battersby BJ, Richter U (2013) Why translation counts for mitochondria - retrograde signalling links mitochondrial protein synthesis to mitochondrial biogenesis and cell proliferation. *Journal of cell science* **126**: 4331-4338

Baughman JM, Mootha VK (2006) Buffering mitochondrial DNA variation. *Nature Genetics* **38**: 1232-1233

Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* **120**: 838-848

Bjork GR, Ericson JU, Gustafsson CE, Hagervall TG, Jonsson YH, Wikstrom PM (1987) Transfer RNA modification. *Annual Review of Biochemistry* **56**: 263-287

Blanco S, Dietmann S, Flores JV, Hussain S, Kutter C, Humphreys P, Lukk M, Lombard P, Treps L, Popis M, Kellner S, Holter SM, Garrett L, Wurst W, Becker L, Klopstock T, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, Karadottir RT, Helm M, Ule J, Gleeson JG, Odom DT, Frye M (2014) Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neurodevelopmental disorders. *EMBO Journal* **33**: 2020-2039

Boczonadi V, Horvath R (2014) Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **48**: 77-84

Boczonadi V, Smith PM, Pyle A, Gomez-Duran A, Schara U, Tulinius M, Chinnery PF, Horvath R (2013) Altered 2-thiouridylation impairs mitochondrial translation in reversible infantile respiratory chain deficiency. *Human Molecular Genetics* **22**: 4602-4615

Bouillaud F (2009) UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 377-383

Bregeon D, Colot V, Radman M, Taddei F (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes & Development* **15**: 2295-2306

Burroughs AM, Ando Y, de Hoon MJ, Tomaru Y, Suzuki H, Hayashizaki Y, Daub CO (2011) Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biology* **8**: 158-177

Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine* **29**: 222-230

Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM, Boschero AC (2011) Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *The Journal of endocrinology* **208**: 257-264

- Calvo SE, Mootha VK (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **11**: 25-44
- Canto C, Auwerx J (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**: 3407-3423
- Capella MA, Capella LS, Valente RC, Gefe M, Lopes AG (2007) Vanadate-induced cell death is dissociated from H₂O₂ generation. *Cell Biology and Toxicology* **23**: 413-420
- Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 32724-32727
- Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* **49**: 304-311
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry / FEBS* **229**: 558-565
- Cotan D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodriguez-Hernandez A, Gomez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Jackson S, Navas P, Sanchez-Alcazar JA (2011) Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**: 2669-2687
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2010) Measuring the redox state of cellular peroxiredoxins by immunoblotting. *Methods in Enzymology* **474**: 51-66
- Chaban Y, Boekema EJ, Dudkina NV (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et biophysica acta* **1837**: 418-426
- Chae S, Ahn BY, Byun K, Cho YM, Yu MH, Lee B, Hwang D, Park KS (2013) A systems approach for decoding mitochondrial retrograde signaling pathways. *Science signaling* **6**: rs4
- Chang-An Yu LYaDX (2013) Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase. *Encyclopedia of Biophysics*
- Chinnery PF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *International journal of epidemiology* **41**: 177-187

- Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2010) Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. *Biochimica et biophysica acta* **1802**: 221-227
- Chomczynski P, Mackey K (1995) Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques* **19**: 942-945
- Chomyn A (1996) *In vivo* labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods in Enzymology* **264**: 197-211
- Del Hoyo PM, Garcia-Redondo AMP, de Bustos FB, Molina JAMP, Sayed YM, Alonso-Navarro HMP, Caballero LMP, Arenas JMP, Agundez JAMP, Jimenez-Jimenez FJMP (2010) Oxidative stress in skin fibroblasts cultures from patients with Parkinson's disease. *BMC Neurology* **10**: 95
- DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M (2013) The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nature reviews Neurology* **9**: 429-444
- Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J (2013) Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **63**: 207-221
- Dominy JE, Puigserver P (2013) Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**
- Elseviers D, Petruccio LA, Gallagher PJ (1984) Novel *E. coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Research* **12**: 3521-3534
- Ellerby LM, Bredesen DE (2000) Measurement of cellular oxidation, reactive oxygen species, and antioxidant enzymes during apoptosis. *Methods in Enzymology* **322**: 413-421
- Emelyanov VV (2001) Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Bioscience reports* **21**: 1-17
- Emilsson V, Kurland CG (1990) Growth rate dependence of transfer RNA abundance in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **9**: 4359-4366
- Enriquez JA, Lenaz G (2014) Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes. *Molecular syndromology* **5**: 119-140
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual Review of Biochemistry* **76**: 679-699

- Fillmore N, Lopaschuk GD (2013) Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 857-865
- Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B (2005) Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* **54**: 1331-1339
- Fridovich I (1974) Superoxide dismutases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **41**: 35-97
- Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2009) Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* **583**: 437-442
- Gaignard P, Gonzales E, Ackermann O, Labrune P, Correia I, Therond P, Jacquemin E, Slama A (2013) Mitochondrial Infantile Liver Disease due to TRMU Gene Mutations: Three New Cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease reports* **11**: 117-123
- Gao AW, Canto C, Houtkooper RH (2014) Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO molecular medicine* **6**: 580-589
- Gehrke CW, Kuo KC (1989) Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* **471**: 3-36
- Genova ML, Lenaz G (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et biophysica acta* **1837**: 427-443
- Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, Invernizzi F, Melchionda L, Dallabona C, Strom TM, Parini R, Burlina AB, Meitinger T, Prokisch H, Ferrero I, Zeviani M (2012) Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *The American Journal of Human Genetics* **90**: 1079-1087
- Ghezzi D, Zeviani M (2012) Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Advances in experimental medicine and biology* **748**: 65-106
- Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB (2014) Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**: 2577-2604
- Guha M, Avadhani NG (2013) Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion* **13**: 577-591
- Hallberg BM, Larsson NG (2014) Making Proteins in the Powerhouse. *Cell Metabolism* **20**: 226-240

- Hamalainen RH, Manninen T, Koivumaki H, Kislin M, Otonkoski T, Suomalainen A (2013) Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E3622-3630
- Hardie DG (2007) AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metabolism* **6**: 339-340
- Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development* **25**: 1895-1908
- Haynes CM, Fiorese CJ, Lin YF (2013) Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends in cell biology* **23**: 311-318
- Haynes CM, Ron D (2010) The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *Journal of cell science* **123**: 3849-3855
- Herrmann JM, Woellhaf MW, Bonnefoy N (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 286-294
- Hillen W, Egert E, Lindner HJ, Gassen HG (1978) Restriction or amplification of wobble recognition: the structure of 2-thio-5-methylaminomethyluridine and the interaction of odd uridines with the anticodon loop backbone. *FEBS Lett* **94**: 361-364
- Hock MB, Kralli A (2009) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual review of physiology* **71**: 177-203
- Hornig-Do HT, Tatsuta T, Buckermann A, Bust M, Kollberg G, Rotig A, Hellmich M, Nijtmans L, Wiesner RJ (2012) Nonsense mutations in the COX1 subunit impair the stability of respiratory chain complexes rather than their assembly. *Embo Journal* **31**: 1293-1307
- Jager G, Nilsson K, Bjork GR (2013) The phenotype of many independently isolated +1 frameshift suppressor mutants supports a pivotal role of the P-site in reading frame maintenance. *PLoS One* **8**: e60246
- Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD (2011) Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 1333-1350
- Jazwinski SM (2013) The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 400-409

Jezek P, Olejar T, Smolkova K, Jezek J, Dlaskova A, Plecita-Hlavata L, Zelenka J, Spacek T, Engstova H, Pajuelo Reguera D, Jaburek M (2014) Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **63 Suppl 1**: S73-91

Johns DR (1995) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *The New England Journal of Medicine* **333**: 638-644

Katiyar SK, Visvesvara GS, Edlind TD (1995) Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* **152**: 27-33

Kemp JP, Smith PM, Pyle A, Neeve VC, Tuppen HA, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Holinski-Feder E, Abicht A, Czermin B, Lochmuller H, McFarland R, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, Taylor RW, Horvath R (2011) Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain* **134**: 183-195

Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR (2012) Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1604-1616

Kirino Y, Suzuki T (2005) Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency. *RNA Biology* **2**: 41-44

Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, Suzuki T (2004) Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15070-15075

Koc EC, Spremulli LL (2003) RNA-binding proteins of mammalian mitochondria. *Mitochondrion* **2**: 277-291

Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y (2010) Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* **5**: e11707

Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH (2013) OXPHOS mutations and neurodegeneration. *Embo Journal* **32**: 9-29

Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH (2010) Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal* **12**: 1431-1470

Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carrozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayr T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, Ohtake A, Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinnery PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, Mousson de Camaret B, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Regal L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rotig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H (2014) Mutations in GTPBP3 Cause a Mitochondrial Translation Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy, Lactic Acidosis, and Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics* **95**: 708-720

Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD (2014) Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochimica et biophysica acta* **1840**: 1254-1265

Kramer EB, Farabaugh PJ (2007) The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA* **13**: 87-96

Kruger MK, Pedersen S, Hagervall TG, Sorensen MA (1998) The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons *in vivo*. *Journal of molecular biology* **284**: 621-631

Kukat A, Dogan SA, Edgar D, Mourier A, Jacoby C, Maiti P, Mauer J, Becker C, Senft K, Wibom R, Kudin AP, Hultenby K, Flogel U, Rosenkranz S, Ricquier D, Kunz WS, Trifunovic A (2014) Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity. *PLoS Genetics* **10**: e1004385

Kukat C, Larsson NG (2013) mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends in cell biology* **23**: 457-463

Lane N (2005) Power, Sex and Suicide. Mitochondria and the meaning of life. *Oxford University Press*

Lawrence RA, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications* **71**: 952-958

Lee HC, Wei YH (2005) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 822-834

Lenaz G, Genova ML (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *American journal of physiology Cell physiology* **292**: C1221-1239

- Li N, Stojanovski S, Maechler P (2012) Mitochondrial hormesis in pancreatic beta cells: does uncoupling protein 2 play a role? *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**: 740849
- Li S, Hu GF (2012) Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of cellular physiology* **227**: 2822-2826
- Li X, Guan MX (2002) A human mitochondrial GTP binding protein related to tRNA modification may modulate phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 7701-7711
- Li X, Guan MX (2003) Identification and characterization of mouse GTPBP3 gene encoding a mitochondrial GTP-binding protein involved in tRNA modification. *Biochemical and biophysical research communications* **312**: 747-754
- Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2012) Exploring our origins--the importance of OriL in mtDNA maintenance and replication. *EMBO Reports* **13**: 1038-1039
- Lopez-Armada MJ, Carames B, Martin MA, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, Arenas J, Blanco FJ (2006) Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* **14**: 1011-1022
- Lowes DA, Galley HF (2011) Mitochondrial protection by the thioredoxin-2 and glutathione systems in an *in vitro* endothelial model of sepsis. *Biochemical Journal* **436**: 123-132
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Maniataki E, Mourelatos Z (2005) Human mitochondrial tRNAMet is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA* **11**: 849-852
- Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology : CB* **10**: 1247-1255
- Martin D, Salinas M, Fujita N, Tsuruo T, Cuadrado A (2002) Ceramide and reactive oxygen species generated by H2O2 induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 42943-42952
- Martinez-Vicente M, Yim L, Villarroya M, Mellado M, Perez-Paya E, Bjork GR, Armengod ME (2005) Effects of mutagenesis in the switch I region and conserved arginines of

Escherichia coli MnmE protein, a GTPase involved in tRNA modification. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 30660-30670

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6049-6055

Meseguer S, Martinez-Zamora A, Garcia-Arumi E, Andreu AL, Armengod ME (2015) The ROS-sensitive microRNA-9/9* controls the expression of mitochondrial tRNA-modifying enzymes and is involved in the molecular mechanism of MELAS syndrome. *Human Molecular Genetics* **24**: 167-184

Metallo CM, Walther JL, Stephanopoulos G (2009) Evaluation of ¹³C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *Journal of Biotechnology* **144**: 167-174

Mick DU, Fox TD, Rehling P (2011) Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**: 14-20

Mihaylova MM, Shaw RJ (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology* **13**: 1016-1023

Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW, Nagley P (2003) Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Research* **31**: e61

Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT (2012) Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1817**: 851-862

Moran M, Rivera H, Sanchez-Arago M, Blazquez A, Merinero B, Ugalde C, Arenas J, Cuezva JM, Martin MA (2010) Mitochondrial bioenergetics and dynamics interplay in complex I-deficient fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* **1802**: 443-453

Moreno-Loshuertos R, Ferrin G, Acin-Perez R, Gallardo ME, Viscomi C, Perez-Martos A, Zeviani M, Fernandez-Silva P, Enriquez JA (2011) Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations. *PLoS Genetics* **7**: e1001379

Moruno F, Perez-Jimenez E, Knecht E (2012) Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells* **1**: 372-395

Moukadiri I, Garzon MJ, Bjork GR, Armengod ME (2014) The output of the tRNA modification pathways controlled by the Escherichia coli MnmEG and MnmC enzymes depends on the growth conditions and the tRNA species. *Nucleic Acids Research* **42**: 2602-2623

- Moukadiri I, Prado S, Piera J, Velazquez-Campoy A, Bjork GR, Armengod ME (2009) Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res* **37**: 7177-7193
- Murphy FVt, Ramakrishnan V, Malkiewicz A, Agris PF (2004) The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *Nature structural & molecular biology* **11**: 1186-1191
- Nagaike T, Suzuki T, Tomari Y, Takemoto-Hori C, Negayama F, Watanabe K, Ueda T (2001) Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 40041-40049
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschop MH (2012) Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological reviews* **92**: 1479-1514
- Ngo HB, Lovely GA, Phillips R, Chan DC (2014) Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nature communications* **5**: 3077
- Nouws J, Nijtmans LG, Smeitink JA, Vogel RO (2012) Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options. *Brain* **135**: 12-22
- Nunnari J, Suomalainen A (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**: 1145-1159
- O'Connor M (1998) tRNA imbalance promotes -1 frameshifting via near-cognate decoding. *Journal of molecular biology* **279**: 727-736
- Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**: 470-474
- Osawa T, Inanaga H, Numata T (2009) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the tRNA-modification enzyme GidA from *Aquifex aeolicus*. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications* **65**: 508-511
- Palmeira CM, Rolo AP (2012) Mitochondrial membrane potential (DeltaPsi) fluctuations associated with the metabolic states of mitochondria. *Methods in Molecular Biology* **810**: 89-101
- Pecqueur C, Alves-Guerra C, Ricquier D, Bouillaud F (2009) UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism? *IUBMB Life* **61**: 762-767

Pecqueur C, Bui T, Gelly C, Hauchard J, Barbot C, Bouillaud F, Ricquier D, Miroux B, Thompson CB (2008) Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**: 9-18

Prado S, Villarroya M, Medina M, Armengod ME (2013) The tRNA-modifying function of MnmE is controlled by post-hydrolysis steps of its GTPase cycle. *Nucleic Acids Research* **41**: 6190-6208

Reinecke F, Smeitink JA, van der Westhuizen FH (2009) OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochimica et biophysica acta* **1792**: 1113-1121

Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, Bratic A, Park CB, Camara Y, Milenkovic D, Zickermann V, Wibom R, Hultenby K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Brandt U, Stewart JB, Gustafsson CM, Larsson NG (2012) LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO Journal* **31**: 443-456

Saada A, Vogel RO, Hoefs SJ, van den Brand MA, Wessels HJ, Willems PH, Venselaar H, Shaag A, Barghuti F, Reish O, Shohat M, Huynen MA, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Nijtmans LG (2009) Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *The American Journal of Human Genetics* **84**: 718-727

Sasarman F, Antonicka H, Horvath R, Shoubridge EA (2011) The 2-thiouridylase function of the human MTU1 (TRMU) enzyme is dispensable for mitochondrial translation. *Human Molecular Genetics* **20**: 4634-4643

Saxena SK, Rybak SM, Davey RT, Jr., Youle RJ, Ackerman EJ (1992) Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 21982-21986

Sazanov LA (2015) A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*

Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM, Walker JE (2000) Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* **39**: 7229-7235

Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 1269-1278

- Scarpulla RC (2012) Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochimica et biophysica acta* **1819**: 1088-1097
- Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**: 459-466
- Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, Lyko F (2010) RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & Development* **24**: 1590-1595
- Schagger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 36349-36353
- Schara U, von Kleist-Retzow JC, Lainka E, Gerner P, Pyle A, Smith PM, Lochmuller H, Czermin B, Abicht A, Holinski-Feder E, Horvath R (2011) Acute liver failure with subsequent cirrhosis as the primary manifestation of TRMU mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **34**: 197-201
- Schenkel LC, Bakovic M (2014) Formation and Regulation of Mitochondrial Membranes. *International Journal of Cell Biology* **2014**: 709828
- Schonfeld P, Wieckowski MR, Lebieczinska M, Wojtczak L (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* **1797**: 929-938
- Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell* **48**: 158-167
- Shabalina IG, Nedergaard J (2011) Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochemical Society transactions* **39**: 1305-1309
- Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, Van Houten B, Mostoslavsky R, Bultman SJ, Baccarelli AA, Begley TJ, Sobol RW, Hirschey MD, Ideker T, Santos JH, Copeland WC, Tice RR, Balshaw DM, Tyson FL (2014) Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environmental health perspectives* **122**: 1271-1278
- Shi R, Villarroya M, Ruiz-Partida R, Li Y, Proteau A, Prado S, Moukadiri I, Benitez-Paez A, Lomas R, Wagner J, Matte A, Velazquez-Campoy A, Armengod ME, Cygler M (2009) Structure-function analysis of Escherichia coli MnmG (GidA), a highly conserved tRNA-modifying enzyme. *Journal of bacteriology* **191**: 7614-7619

Shutt TE, Gray MW (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends in genetics : TIG* **22**: 90-95

Sies H (2014) Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 8735-8741

Sissler M, Lorber B, Messmer M, Schaller A, Putz J, Florentz C (2008) Handling mammalian mitochondrial tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases for functional and structural characterization. *Methods* **44**: 176-189

Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT (2006) Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metabolism* **3**: 9-13

Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L (2010) Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**: 737385

Soper JW, Pedersen PL (1979) Isolation of an oligomycin-sensitive ATPase complex from rat liver mitochondria. *Methods in Enzymology* **55**: 328-333

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**: 1043-1057

Suthammarak W, Yang YY, Morgan PG, Sedensky MM (2009) Complex I function is defective in complex IV-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 6425-6435

Suzuki T, Nagao A, Suzuki T (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annual Review of Genetics* **45**: 299-329

Suzuki T, Suzuki T (2007) Chaplet column chromatography: isolation of a large set of individual RNAs in a single step. *Methods in Enzymology* **425**: 231-239

Suzuki T, Suzuki T (2014) A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic acids research* **42**: 7346-7357

Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K (2001) Novel taurine-containing uridine derivatives and mitochondrial human diseases. *Nucleic Acids Research Suppl*: 257-258

Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K (2002) Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *Embo Journal* **21**: 6581-6589

Szabadkai G, Duchon MR (2008) Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology* **23**: 84-94

Tait SW, Green DR (2012) Mitochondria and cell signalling. *Journal of cell science* **125**: 807-815

Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, Smertenko T, Alston CL, Neeve VC, Best A, Yarham JW, Kirschner J, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Baric I, Holinski-Feder E, Abicht A, Czermin B, Kleinle S, Morris AA, Vassallo G, Gorman GS, Ramesh V, Turnbull DM, Santibanez-Koref M, McFarland R, Horvath R, Chinnery PF (2014) Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *Jama* **312**: 68-77

Temperley R, Richter R, Dennerlein S, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2010) Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science* **327**: 301

Tischner C, Hofer A, Wulff V, Stepek J, Dumitru I, Becker L, Haack T, Kremer L, Datta AN, Sperl W, Floss T, Wurst W, Chrzanowska-Lightowlers Z, De Angelis MH, Klopstock T, Prokisch H, Wenz T (2015) MTO1 mediates tissue specificity of OXPHOS defects via tRNA modification and translation optimization, which can be bypassed by dietary intervention. *Human Molecular Genetics* **24**: 2247-2266

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo Journal* **27**: 433-446

Umeda N, Suzuki T, Yukawa M, Ohya Y, Shindo H, Watanabe K, Suzuki T (2005) Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 1613-1624

Urbonavicius J, Qian Q, Durand JM, Hagervall TG, Bjork GR (2001) Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO Journal* **20**: 4863-4873

Uusimaa J, Jungbluth H, Fratter C, Crisponi G, Feng L, Zeviani M, Hughes I, Treacy EP, Birks J, Brown GK, Sewry CA, McDermott M, Muntoni F, Poulton J (2011) Reversible infantile respiratory chain deficiency is a unique, genetically heterogenous mitochondrial disease. *Journal of medical genetics* **48**: 660-668

Vacanti NM, Divakaruni AS, Green CR, Parker SJ, Henry RR, Ciaraldi TP, Murphy AN, Metallo CM (2014) Regulation of substrate utilization by the mitochondrial pyruvate carrier. *Molecular Cell* **56**: 425-435

Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in biochemical sciences* **35**: 669-675

Villarroya M, Prado S, Esteve JM, Soriano MA, Aguado C, Perez-Martinez D, Martinez-Ferrandis JI, Yim L, Victor VM, Cebolla E, Montaner A, Knecht E, Armengod ME (2008) Characterization of human GTPBP3, a GTP-binding protein involved in mitochondrial tRNA modification. *Molecular Cell Biology* **28**: 7514-7531

Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, Giri S, Andreelli F (2010) AMPK inhibition in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **45**: 276-295

Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, Marmo R, Calcagnile VM, Palmieri L, Ricquier D, Paradies E, Scarcia P, Palmieri F, Bouillaud F, Fiermonte G (2014) UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 960-965

Wang X, Yan Q, Guan MX (2009) Mutation in MTO1 involved in tRNA modification impairs mitochondrial RNA metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* **9**: 180-185

Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES, Vockley J (2010) Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 29834-29841

Watanabe K, Yokobori S (2011) tRNA Modification and Genetic Code Variations in Animal Mitochondria. *Journal of nucleic acids* **2011**: 623095

Weber J (2010) Structural biology: Toward the ATP synthase mechanism. *Nature chemical biology* **6**: 794-795

Wenz T (2011) Mitochondria and PGC-1alpha in Aging and Age-Associated Diseases. *Journal of aging research* **2011**: 810619

Wenz T (2013) Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress. *Mitochondrion* **13**: 134-142

Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE, Lochmuller H, Chevrette M, Kaufman BA, Horvath R, Shoubridge EA (2009) Mutation in TACO1,

encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nature Genetics* **41**: 833-837

Westhof E, Yusupov M, Yusupova G (2014) Recognition of Watson-Crick base pairs: constraints and limits due to geometric selection and tautomerism. *F1000prime reports* **6**: 19

Whelan SP, Zuckerbraun BS (2013) Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2013**: 351613

Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, Shen CH, Wen J, Asara J, McGraw TE, Kahn BB, Cantley LC (2013) AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular Cell* **49**: 1167-1175

Wu SB, Wu YT, Wu TP, Wei YH (2014) Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* **1840**: 1331-1344

Xie Z, Zhang J, Wu J, Viollet B, Zou MH (2008) Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes* **57**: 3222-3230

Xu F, Ackerley C, Maj MC, Addis JB, Levandovskiy V, Lee J, Mackay N, Cameron JM, Robinson BH (2008) Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome b expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochemical Journal* **416**: 15-26

Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF, Anderson P (2009) Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *Journal of Cell Biology* **185**: 35-42

Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, Sudderth J, Calvaruso MA, Lumata L, Mitsche M, Rutter J, Merritt ME, DeBerardinis RJ (2014) Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular Cell* **56**: 414-424

Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ueda T, Ohta S, Watanabe K (2000a) Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA(Lys) with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* **467**: 175-178

Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K (2000b) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 4251-4257

Yim L, Moukadiri I, Bjork GR, Armengod ME (2006) Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **34**: 5892-5905

Zeharia A, Shaag A, Pappo O, Mager-Heckel AM, Saada A, Beinat M, Karicheva O, Mandel H, Ofek N, Segel R, Marom D, Rotig A, Tarassov I, Elpeleg O (2009) Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *The American Journal of Human Genetics* **85**: 401-407

Zhong L, Mostoslavsky R (2011) Fine tuning our cellular factories: sirtuins in mitochondrial biology. *Cell Metabolism* **13**: 621-626

Zickermann V, Wirth C, Nasiri H, Siegmund K, Schwalbe H, Hunte C, Brandt U (2015) Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* **347**: 44-49

Zinshteyn B, Gilbert WV (2013) Loss of a conserved tRNA anticodon modification perturbs cellular signaling. *PLoS Genetics* **9**: e1003675

Zurita Rendon O, Shoubbridge EA (2012) Early complex I assembly defects result in rapid turnover of the ND1 subunit. *Human Molecular Genetics* **21**: 3815-3824



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION