






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**Nuevos mecanismos de control en la homeostasis de dNTPs
mitocondriales: Papel de la proteína NDUFA10 en la disponibilidad de
dGTP**

David Molina Granada

Tesis Doctoral

Nuevos mecanismos de control en la homeostasis de dNTPs mitocondriales: Papel de la proteína NDUFA10 en la disponibilidad de dGTP

David Molina Granada

Tesis adscrita al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de investigación en Patología Neuromuscular y Mitocondrial del Vall d'Hebron Institut de Recerca.

Directores

Yolanda Cámara Navarro

Ramon Martí Seves

Tutora

Anna Meseguer Navarro

Universitat Autònoma de Barcelona

2021

RESUMEN

Para la mitocondria resulta esencial mantener un contenido en dNTPs en cantidad y proporción adecuadas para garantizar los procesos de replicación y reparación del DNA mitocondrial (mtDNA). A fin de asegurar la disponibilidad de estos dNTPs, las células eucariotas disponen de dos vías anabólicas diferenciadas: la síntesis *de novo* y la ruta de salvamento de dNTPs, las cuales se encuentran estrechamente reguladas. Las mutaciones en genes nucleares que se traducen en una perturbación de la homeostasis de dNTPs se asocian a defectos en el mantenimiento del mtDNA, dando lugar a alteraciones en su cantidad y calidad, en lo que se conoce como síndromes de depleción y deleciones del mtDNA.

Tradicionalmente se ha adoptado la idea de que todas las especies de dNTPs se encuentran en proporciones similares, y principalmente solubilizados de forma libre en la matriz mitocondrial, donde están disponibles para polimerasas y otras enzimas que participan en los procesos de replicación y reparación del mtDNA. Sin embargo, nosotros hemos observado que el dGTP está significativamente sobrerrepresentado frente al resto de dNTPs en mitocondrias de células humanas y tejidos de ratón. Además, el dGTP aparece mayoritariamente asociado a proteína, concretamente al complejo I de la cadena respiratoria, a través de su subunidad NDUFA10.

La NDUFA10 es una subunidad accesoria del complejo I para la que no se ha descrito una función específica dentro del mismo, pero que resulta esencial para el correcto ensamblaje de la holoenzima. Sin embargo, la NDUFA10 comparte el dominio funcional dNK (dominio dNK, pfam PF01712) con varias de las desoxirribonucleósido quinasas que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs, como son la TK2, dCK o dGK, con las que también comparte una alta identidad de secuencia. Todas estas enzimas catalizan la fosforilación de los desoxirribonucleósidos usando ATP como

donador de fosfato. Sin embargo, no se ha descrito ninguna actividad quinasa asociada a NDUFA10 o al complejo I.

A raíz de los resultados anteriormente expuestos generamos distintos modelos experimentales con la finalidad de confirmar la unión del dGTP al complejo I y profundizar en el estudio de dicha interacción. Mediante la introducción de mutaciones dirigidas en la NDUFA10 de líneas celulares humanas hemos localizado el sitio de unión del dGTP dentro del dominio dNK de la proteína. Además, hemos determinado que esta unión es altamente específica y estable, y se da en una proporción estequiométrica de 1:1. Por otro lado, hemos obtenido un modelo murino con las mismas mutaciones en el dominio dNK de NDUFA10 que habíamos introducido en células humanas (*Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A} o NDUFA10^{KI}). A diferencia de lo que ocurre con la proteína humana, las mutaciones introducidas afectan a la estabilidad de la proteína NDUFA10 murina, y con ello al ensamblaje y función del complejo I. Los animales NDUFA10^{KI} desarrollan una cardiomiopatía hipertrófica que causa su muerte entre las semanas 25-30 de vida, probablemente a causa de una alteración grave de la función oxidativa mitocondrial a consecuencia de la desestabilización de NDUFA10 en el corazón. Curiosamente, estas mutaciones parecen tener consecuencias distintas para la estabilidad de la proteína y el complejo I en función del tejido analizado, afectando de forma más leve al cerebro, por ejemplo. En cualquier caso, la interrupción de la interacción NDUFA10-dGTP en los animales NDUFA10^{KI} se traduce en una drástica reducción en el contenido mitocondrial de dGTP en todos los tejidos estudiados, mientras que no se observa ningún efecto sobre el resto de dNTPs, lo que nos permite confirmar *in vivo* que la interacción con el dGTP se produce a nivel del dominio dNK de la NDUFA10.

Al afectar a una proporción tan importante del dGTP mitocondrial, la interacción descrita con el complejo I a través de su subunidad NDUFA10 podría suponer un nuevo mecanismo de control de la disponibilidad de dNTPs, tratándose de la primera relación directa descrita entre metabolismo oxidativo y la síntesis de DNA.

Per als mitocondris resulta essencial mantenir un contingut en dNTPs que es trobi en la quantitat i proporció adequades per a garantir els processos de replicació i reparació del DNA mitocondrial (mtDNA). Per tal d'assegurar la disponibilitat d'aquests dNTPs, les cèl·lules eucariotes disposen de dues vies anabòliques diferenciades: la síntesi *de novo* i la ruta de salvament de dNTPs, les quals es troben estrictament regulades. Les mutacions en gens nuclears que comporten una pertorbació de l'homeòstasi de dNTPs s'associen a defectes en el manteniment del mtDNA, donant lloc a alteracions en la seva quantitat i qualitat, en el que es coneix com a síndromes de depleció i delecions del mtDNA.

Tradicionalment s'ha adoptat la idea que totes les espècies de dNTPs es troben en proporcions similars i principalment solubilitzades de forma lliure en la matriu mitocondrial, on són disponibles per a les polimerases i altres enzims que participen en els processos de replicació i reparació del mtDNA. No obstant això, nosaltres hem observat que el dGTP està significativament sobrerrepresentat en comparació amb la resta de dNTPs en els mitocondris de cèl·lules humanes i de teixits de ratolí. A més, el dGTP hi apareix majoritàriament associat a proteïna, concretament al complex I de la cadena respiratòria, a través de la seva subunitat NDUFA10.

NDUFA10 és una subunitat accessòria de complex I per a la qual no s'hi ha descrit una funció específica, però que resulta essencial per al correcte acoblament de l'holoenzim. No obstant això, la NDUFA10 comparteix el domini funcional dNK (domini dNK, PFAM PF01712) amb diverses les desoxirribonucleòsid quinases que participen a la ruta de salvament per a la síntesi de dNTPs, com ara la TK2, dCK o dGK, amb les quals també comparteix una alta identitat de seqüència. Tots aquests enzims catalitzen la fosforilació dels desoxirribonucleòsids utilitzant ATP com a donador de fosfat.

Tanmateix, no s'ha descrit cap activitat quinasa associada a la NDUFA10 o al complex I.

A partir dels resultats anteriorment esmentats, vam generar diferents models experimentals amb la finalitat de confirmar la unió del dGTP al complex I i aprofundir en l'estudi d'aquesta interacció. Mitjançant la introducció de mutacions dirigides a la NDUFA10 de línies cel·lulars humanes hem localitzat el lloc d'unió del dGTP dins el domini dNK de la proteïna. A més, hem determinat que aquesta unió és altament específica i estable i es dona en una proporció estequiomètrica 1: 1. D'altra banda, hem generat un model murí amb les mateixes mutacions en el domini dNK de NDUFA10 que havíem introduït en cèl·lules humanes (Ndufa^{10E160A; R161A / E160A; R161A} o NDUFA10^{KI}). A diferència del que passa amb la proteïna humana, les mutacions introduïdes afecten l'estabilitat de la proteïna NDUFA10 murina, i en conseqüència a l'acoblament i funció del complex I. Els animals NDUFA10^{KI} desenvolupen una cardiomiopatia hipertròfica que causa la seva mort entre les setmanes 25-30 de vida, probablement a causa d'una alteració greu de la funció oxidativa mitocondrial deguda a la desestabilització de NDUFA10 al cor. Curiosament, aquestes mutacions semblen tenir conseqüències diferents per a l'estabilitat de la proteïna i el complex I en funció de el teixit analitzat, afectant de forma més lleu al cervell, per exemple. En qualsevol cas, la disrupció de la interacció NDUFA10-dGTP en els animals NDUFA10^{KI} es tradueix en una dràstica reducció en el contingut mitocondrial de dGTP a tots els teixits estudiats, mentre que no s'observa cap efecte sobre la resta de dNTPs, la qual cosa ens permet confirmar *in vivo* que la interacció amb el dGTP es produeix a nivell del domini dNK de la NDUFA10.

Com que afecta una proporció molt important del dGTP mitocondrial, la interacció descrita amb el complex I a través de la seva subunitat NDUFA10 podria suposar un nou mecanisme de control de la disponibilitat de dNTPs, la qual cosa suposa la primera relació directa descrita entre metabolisme oxidatiu i la síntesi de DNA.

For the mitochondria it is essential to maintain a dNTP *pool* that is in an adequate quantity and proportion to guarantee mitochondrial DNA (mtDNA) replication and repair processes. In order to ensure the availability of these dNTPs, eukaryotic cells have two differentiated anabolic pathways: the *de novo* synthesis and the salvage pathway, both of which are tightly regulated. Mutations in nuclear genes that result in a disturbance of dNTPs homeostasis are associated with defects in mtDNA maintenance, leading to alterations in its quantity and quality, in what are known as mtDNA depletion and deletions syndromes.

Traditionally, dNTPs are thought to be present in similar proportions, and mainly free-solubilized in the mitochondrial matrix, where they are available for polymerases and other enzymes that participate in mtDNA replication and repair processes. However, we have observed that dGTP is significantly overrepresented against the rest of dNTPs in mitochondria of human cells and mouse tissues. Furthermore, dGTP appears mostly associated with protein, specifically with complex I of the respiratory chain, through its subunit NDUFA10.

NDUFA10 is an accessory subunit of complex I essential for the correct assembly of the holoenzyme with no other function so far described. However, NDUFA10 shares the functional dNK domain (pfam PF01712) with several of the deoxyribonucleoside kinases involved in the salvage pathway for the synthesis of dNTPs, such as TK2, dCK or dGK, with which it also shares a high sequence identity. All these enzymes catalyse the phosphorylation of deoxyribonucleosides using ATP as phosphate donor. However, no kinase activity has been found associated with NDUFA10 or complex I.

Following the above results, we generated different experimental models in order to confirm the binding of dGTP to complex I and to further study this interaction. By introducing targeted mutations in NDUFA10 of human cell lines we have localized the dGTP binding site within the dNK domain of the protein. Furthermore, we have determined that this binding is highly specific and stable, and occurs at a stoichiometric ratio of 1:1. In addition, we have obtained a murine model with the same mutations in the dNK domain of NDUFA10 that we had introduced in human cells (Ndufa10^{E160A;R161A/E160A;R161A} or NDUFA10^{KI}). In contrast to what occurs with the human protein, the introduced mutations affect the stability of the murine NDUFA10 protein, and thereby the assembly and function of complex I. NDUFA10^{KI} animals develop a fatal hypertrophic cardiomyopathy and die between 25-30 weeks of life, probably due to severe impairment of mitochondrial oxidative function as a consequence of NDUFA10 destabilization in the heart. Interestingly, these mutations appear to have different consequences for the stability of the protein and complex I depending on the analysed tissue, with the brain, for example, being less affected. In any case, disruption of the NDUFA10-dGTP interaction in NDUFA10^{KI} animals results in a drastic reduction in the mitochondrial dGTP content in all studied tissues, whereas no effect on the other dNTPs is observed. These observations confirm that the interaction with dGTP occurs at the level of the dNK domain of NDUFA10 in vivo.

Because it affects to such a large proportion of mitochondrial dGTP, the described interaction with complex I through its NDUFA10 subunit could represent a novel mechanism regulating dNTP availability and linking oxidative metabolism with DNA synthesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	4
1. Las mitocondrias.	5
1.1 Estructura y función.....	5
1.2 El genoma mitocondrial (mtDNA).....	8
2. Replicación del mtDNA.	12
3. Cadena transportadora de electrones mitocondrial y fosforilación oxidativa.	
Sistema OXPHOS.	15
3.1 Complejo I: NADH Ubiquinona Oxidorreductasa	18
3.1.1 Subunidades supernumerarias del complejo I.....	20
3.1.2 Biogénesis mitocondrial y citosólica del complejo I.....	23
3.1.3 Ensamblaje del complejo I.	25
3.1.4 Estados catalíticos del complejo I: Estado activo/inactivo.....	28
3.1.5 Patologías asociadas a defectos en el ensamblaje del complejo I.	30
3.1.6 NADH Ubiquinona Oxidorreductasa Subunidad A10: NDUFA10.....	31
3.2 Complejo II: Succinato Ubiquinona Oxidorreductasa	34
3.3 Complejo III: Ubiquinol Citocromo c Oxidorreductasa.	34
3.4 Complejo IV: citocromo c oxidasa.....	34
3.5 Transportadores móviles de la cadena de transporte de electrones.	35
3.6 Complejo V: ATP sintasa.	35
3.7 Adenina nucleótido translocasa.....	36
3.8 Transportador de fosfato.....	36
3.9 Organización supramolecular del sistema OXPHOS: supercomplejos.	37
3.10 Control de la fosforilación oxidativa.	40
3.11 Alteraciones en el rendimiento del sistema OXPHOS.....	42
3.11.1 Desacoplamiento y potencial de membrana mitocondrial.....	42
3.11.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).	45
4. Metabolismo de nucleótidos.	47
4.1 Compartimentalización de nucleótidos en la célula	47
4.2 Síntesis de dNTPs.	49
4.2.1 Ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs.....	50
4.2.1.1 Desoxirribonucleósido quinasas (dNKs) implicadas en el salvamento de dNTPs.	53
4.2.1.1.1 Estructura de las dNKs TK1-similar.	54
4.2.1.1.2 Estructura de las dNKs TK1-no-similar.....	55
4.2.1.2 Inhibición por retroalimentación negativa.....	57
4.2.2 Ruta <i>de novo</i> para la síntesis de dNTPs.....	57
4.2.2.1 Rutas de síntesis de ribonucleótidos.....	59
4.2.2.1.1 Ruta de salvamento.	59
4.2.2.1.2. Rutas de síntesis de novo.	60
4.2.2.1.3. Síntesis de purinas y pirimidinas.	61
4.3 Regulación del metabolismo de nucleótidos.....	65

4.4 Intercambio de nucleósidos y nucleótidos entre la mitocondria y el citosol.....	68
4.5 Efectos de las alteraciones en el <i>pool</i> mitocondrial y celular de dNTPs sobre la replicación del DNA mitocondrial y nuclear.	70
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	73
1. Hipótesis.	74
2. Objetivos.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
1. Cultivos celulares.....	77
1.1 Líneas celulares utilizadas.....	77
1.2 Cultivo y conservación de células.	79
1.3 Contaje de células.	80
2. Experimentación animal.	82
2.1 Modelo animal y condiciones de estabulación.	82
2.2 Genotipado de animales <i>knock-in</i>	83
2.2.1 Amplificación del exón 4 del gen <i>Ndufa10</i>	84
2.2.2 Digestión del exón 4 del gen <i>Ndufa10</i>	86
2.3 Estudio de la evolución de la curva de pesos.....	87
2.4 Estudio de supervivencia.	88
2.5 Eutanasia de animales y extracción de muestras.	89
2.6 Extracción de tejidos.....	89
3. Extracción de ácidos nucleicos.	91
3.1 Extracción de DNA.	91
3.1.1 Extracción de DNA de células humanas.	91
3.1.2 Extracción de DNA procedente de tejidos de ratón.....	91
3.1.2.1 Extracción orgánica con fines de genotipado animal.	92
3.1.2.2 Extracción de DNA de alta pureza.	93
3.2 Resolución de DNA por electroforesis en gel de agarosa.	93
3.3 Extracción de RNA total de tejidos de ratón.	93
3.3.1 Evaluación de la calidad del RNA obtenido mediante electroforesis capilar.....	95
3.3.2 Transcripción reversa del RNA obtenido.....	95
3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos.	96
4. Obtención de fracciones proteicas de cultivos y tejidos de ratón.	98
4.1 Homogenado total de proteína.	98
4.2 Aislamiento de la fracción mitocondrial.	99
4.2.1 Aislamiento de mitocondrias procedentes de células en cultivo.....	99
4.2.2 Aislamiento de mitocondrias procedentes de tejido de ratón.	101
4.3 Cuantificación de proteínas.	103
5. Métodos de clonaje.	105
5.1 Vectores plasmídicos utilizados y obtención del cDNA de interés.	105

5.1.1 pcDNA™ 3.1 (+).....	105
5.1.2 Obtención del cDNA humano de la NDUFA10-Flag a partir del pcDNA 3.1 (+).	106
5.1.3 Purificación del cDNA NDUFA10-flag en geles de agarosa.....	107
5.1.4 pLKO1.	108
5.1.5 Vectores <i>helper</i> de empaquetamiento pMISSIONgagpol y pMISSIONvsvg.	109
5.2 Clonaje del cDNA NDUFA10-Flag en el vector pLKO.1.	110
5.3 Transformación de células quimiocompetentes.....	112
5.4 Selección y amplificación de los clones de interés.	113
5.5 Extracción de DNA plasmídico por <i>Miniprep</i>	114
5.6 Comprobación del DNA plasmídico obtenido por <i>Miniprep</i>	114
5.7 Extracción de DNA plasmídico por <i>Maxiprep</i>	116
5.8 Producción de vectores lentivirales.....	116
5.9 Transducción de vectores lentivirales en células HeLa.....	118
5.10 Comprobación de los clones estables seleccionados.	119
6. Purificación de proteínas por afinidad.	120
6.1 <i>Pull-Down</i> con dNTPs inmovilizados en resina.	120
6.2 Inmunoprecipitación Anti-Flag.	122
6.3 Inmunoprecipitación del complejo I mitocondrial.....	124
6.4 Cuantificación de proteínas inmunoprecipitadas: Tinción de geles de poliacrilamida con <i>Coomassie</i> Coloidal.....	125
7. Inmunodetección de proteínas por <i>Western-Blot</i>.	127
7.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS (<i>SDS-PAGE</i>). .	127
7.2 Electroforesis azul nativa o BN-PAGE.....	129
7.3 Transferencia por <i>Western -blot</i>	131
7.4 Inmunodetección y revelado.	131
8. PCR cuantitativa en tiempo real.....	133
8.1 Cuantificación del número de copias de mtDNA por rt-qPCR.	133
8.1.1 Procesamiento del DNA.	134
8.1.2 Preparación de la placa de rt-qPCR.....	134
8.1.3 Cuantificación del número de copias de mtDNA en células humanas.	135
8.1.3.1 <i>Primers</i> , sondas y kit utilizado.	135
8.1.3.2 Preparación de la recta patrón.....	136
8.1.3.3 Mezcla de reacción.....	136
8.1.4 Cuantificación del número de copias de mtDNA en tejidos de ratón.	137
8.1.4.1 <i>Primers</i> , sondas y <i>kit</i> utilizado.	138
8.1.4.2 Preparación de la recta patrón.....	138
8.1.4.3 Mezcla de reacción.....	139
8.2 Cuantificación de los niveles de expresión génica (mRNA)	140
8.2.1 rt-qPCR para estudio de expresión.	140
9. Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.....	142
9.1 Subfraccionamiento de muestras mitocondriales en gradiente de densidad. ...	142
10. Ensayos bioquímicos.....	144

10.1	Extracción de dNTPs.....	144
10.1.1	Extracción ácida de dNTPs mitocondriales.....	144
10.1.2	Extracción metanólica de dNTPs mitocondriales.....	145
10.1.3	Extracción de la fracción de dNTPs mitocondriales libre y asociada a proteínas.....	147
10.1.5	Extracción de dNTPs celulares totales.....	148
10.2	Determinación enzimática de dNTPs.....	148
10.2.1	Oligonucleótidos.....	149
10.2.2	dNTPs radiactivos.....	150
10.2.3	Polimerasa: Thermo Sequenase DNA Polymerase.....	151
10.2.4	Determinación.....	152
10.3	Ensayo de fotoafinidad: <i>UV-Crosslink</i>	154
10.4	Actividad OXPHOS: Complejo I.....	156
10.5	Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	157
10.5.1	Determinación de superóxido mitocondrial (O ₂ ⁻) con <i>MitoSOXTM</i>	157
10.5.2	Determinación de ROS celular: H ₂ DCFDA.....	159
10.6	Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	160
	RESULTADOS.....	162
	1. El pool de dNTPs mitocondriales no está equilibrado.....	163
	2. La mayor parte del dGTP mitocondrial está unido a proteína.....	166
2.1	El método de extracción puede interferir con la determinación final de dNTPs.....	166
2.2	Los diferentes métodos de extracción de dNTPs afectan significativamente a la cuantificación final de dGTP en mitocondria.....	169
2.3	La mayor parte del dGTP mitocondrial está retenido en la fracción proteica....	171
	3. El dGTP mitocondrial interactúa con el complejo I de la cadena respiratoria a través de la subunidad NDUFA10.....	178
3.1	El complejo I de la cadena respiratoria retiene la mayor parte del dGTP mitocondrial.....	178
3.2	El dGTP co-migra con el complejo I mitocondrial en gradientes de densidad de sacarosa.....	182
3.3	El dGTP co-inmunoprecipita con el complejo I mitocondrial.....	187
	4. Generación de la línea celular humana NDUFA10^{Flag} e inmunopurificación de la proteína NDUFA10.....	192
4.1	Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10-Flag.....	192
4.2	Cuantificación de la proteína obtenida tras la inmunoprecipitación.....	193
	5. Estudio <i>in vitro</i> de la interacción NDUFA10-dGTP.....	195
5.1	Ensayo de fotoafinidad: <i>UV-Crosslink</i>	195
	6. Caracterización molecular de líneas celulares knockout para NDUFA10 o con mutaciones en su dominio dNK.....	200

6.1 La NDUFA10 comparte una alta homología de secuencia con algunas desoxirribonucleósido quinasas de la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs.	200
6.2 Obtención de líneas celulares HEK-293T <i>knock-out</i> (NDUFA10 ^{KO}) y <i>knock-in</i> (NDUFA10 ^{KI}) para la NDUFA10.....	202
6.3 Análisis de la expresión de la proteína NDUFA10 en las líneas celulares KO y KI.	203
6.4 Estudio del ensamble del complejo I mitocondrial en las líneas NDUFA10 ^{KO} y NDUFA10 ^{KI}	204
6.5 Determinación de la actividad del complejo I mitocondrial.	205
6.6 Análisis <i>in vitro</i> de la interacción NDUFA10 ^{KI} -dGTP.	207
6.6.1 Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10 ^{KI}	207
6.6.2 Análisis de la afinidad de la NDFUA10KI por el dGTP in-vitro.	208
6.7 Consecuencias de la disrupción del complejo NDUFA10-dGTP sobre el <i>pool</i> de dNTPs mitocondriales.	211
6.8 Consecuencias de la pérdida de la unión NDUFA10-dGTP sobre la estabilidad del mtDNA.	214
6.9 Consecuencias sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	215
6.10 Consecuencias sobre el potencial de membrana mitocondrial.	216
7. Generación y estudio en un modelo experimental <i>in vivo</i> de la interacción NDUFA10-dGTP (modelo murino <i>knock-in</i> E160A/R161A para la subunidad mitocondrial NDUFA10).	218
7.1 Generación de un modelo murino <i>knock-in</i> para la proteína NDUFA10.	218
7.2 Proporciones mendelianas: distribución por sexo y genotipo.....	221
7.3 Estudio de supervivencia.	222
7.4 Estudio de la evolución del peso.....	223
7.5 Análisis macroscópico de los órganos de interés.....	225
7.6 Análisis de la estabilidad del complejo I mitocondrial.	228
7.6.1 Estudio a nivel de expresión de mRNA en hígado.....	229
7.6.2 Estudio de la estabilidad de la NDUFA10 ^{KI} y el Complejo I.	230
7.7 Estudio del <i>pool</i> mitocondrial de dNTPs.	234
DISCUSIÓN	236
CONCLUSIONES.....	261
BIBLIOGRAFÍA.....	264

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CI	Complejo de la cadena respiratoria mitocondrial
CII	Complejo de la cadena respiratoria mitocondrial mitocondrial
CIII	Complejo de la cadena respiratoria mitocondrial III
CIV	Complejo de la cadena respiratoria mitocondrial IV
CTE	Cadena de transporte de electrones mitocondrial
dAdo	Desoxiadenosina
dADP	Desoxiadenosina difosfato
dAMP	Desoxiadenosina monofosfato
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCK	Desoxicitidina quinasa
dCtd	Desoxicitina
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DDM	n-Dodecil- b-D-maltopiranosido
dGDP	Desoxiguanosina difosfato
dGK	Desoxiguanosina quinasa
dGMP	Desoxiguanosina monofosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dGTP*	Desoxiguanosina trifosfato radiactiva ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$)
dGuo	Desoxiguanosina
dNDP	Desoxinucleósido difosfato
dNK	Desoxinucleósido quinasa
dNMP	Desoxinucleósido monofosfato
DNP	2,4-dinitrofenol
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfato
dThd	Timidina
DTT	Ditiotreitol

dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
GTP	Guanosina trifosfato
H2DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato
MetOH	Metanol
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MNGIE	Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nDNA	DNA nuclear
NDPKs	Nucleósidodifosfato quinasas
NMPKs	Nucleósidomonofosfato quinasas
OXPPOS	Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial
PCA	Ácido perclórico
rNDP	Ribonucleótido difosfato
RNR	Ribonucleótido reductasa
rNTP	Ribonucleótido trifosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TCA	Ácido tricloroacético
TK1	Timidina quinasa 1
TK2	Timidina quinasa 2
TMRE	Perclorato de tetrametilrodamina etil ester
TOA	Trioctilamina
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa

INTRODUCCIÓN

1. Las mitocondrias.

1.1 Estructura y función.

Las mitocondrias son orgánulos celulares presentes en el citoplasma de todas las células eucariotas excepto en los eritrocitos¹. Su principal función es la producción de energía, en forma de ATP, a partir de la oxidación de sustratos energéticos en la cadena respiratoria mitocondrial. Por tanto, cada tipo celular presenta un número variable de mitocondrias en función del requerimiento energético del tejido del que forma parte. Sin embargo, en las mitocondrias están implicadas en otros procesos de gran importancia fisiológica, como la biosíntesis del grupo hemo y hormonas esteroideas, la homeostasis del calcio, el metabolismo de lípidos y aminoácidos, el inicio de la vía intrínseca de apoptosis mediante la liberación del citocromo c (Figura 1(2)) o la generación y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{2,3}

No son orgánulos estáticos, que ocupen una posición definida en el citoplasma celular, sino que pueden desplazarse por este, dividirse o fusionarse en función de las necesidades o requerimientos energéticos de la célula en cada momento. Concretamente, las mitocondrias se encuentran formando redes tubulares dinámicas que se disponen con una amplia variedad de geometrías en función del tipo celular y las condiciones del entorno en el que se encuentren. Estas redes mitocondriales se establecen mediante una interacción constante y dinámica con el citoesqueleto celular, lo que asegura que las mitocondrias se encuentren en el lugar y el momento adecuado dentro de la célula para llevar a cabo las funciones metabólicas y de señalización esenciales que desarrollan.

Como hemos mencionado, las mitocondrias no son elementos discretos y completamente independientes, sino que sufren procesos de división (fisión) o adhesión a otras mitocondrias (fusión) de forma continuada⁴. Estos procesos son necesarios para permitir una adecuada distribución de los orgánulos en la célula y garantizar su correcta segregación durante la división celular⁵. Ambos procesos de dinámica mitocondrial están mediados por la actividad de diferentes proteínas con actividad GTPasa que controlan la correcta coordinación entre la membrana mitocondrial externa (MME) e interna (MMI). Los procesos de fusión y fisión son necesarios para el correcto funcionamiento del orgánulo, regulando la homeostasis del proteoma y genoma mitocondriales. Además, intervienen en procesos celulares de vital importancia como son el control de calidad, facilitando la eliminación de mitocondrias defectuosas (autofagia), o la apoptosis celular³.

Por otro lado, es importante recalcar que las mitocondrias son los únicos orgánulos celulares (a excepción de los plastos en las células vegetales) que poseen un sistema genético propio, el DNA mitocondrial (mtDNA). Debido a esto, la función mitocondrial está controlada por un doble sistema de regulación que debe funcionar de forma coordinada entre el propio mtDNA y del DNA nuclear (nDNA). Esta doble regulación es importante ya que más del 99% de las proteínas mitocondriales están codificadas por el nDNA, se sintetizan en el citoplasma y se importan a la mitocondria. Por ello, resulta esencial que exista un intercambio constante de metabolitos entre la mitocondria y el citosol⁶. Esta genética dual que controla el metabolismo mitocondrial hace que mutaciones que ocurran en cualquiera de los dos genomas puedan traducirse en alteraciones de la función mitocondrial y, que, por tanto, las patologías mitocondriales puedan ocurrir por patrones de herencia autosómica (dominante o recesiva), ligadas al sexo o como consecuencia de mutaciones directas en el mtDNA que se transmitirán únicamente por herencia materna⁷.

Morfológicamente, las mitocondrias presentan una estructura formada por una MME y una MMI que separan el orgánulo en dos compartimentos: la matriz y el espacio intermembrana (EIM)⁸. La MME es una bicapa lipídica lisa, similar a la membrana plasmática de la célula. Presenta una gran cantidad de proteínas porina o VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) (Figura 1), que son la principal vía de intercambio de metabolitos entre la mitocondria y el citosol. Además, la MME contiene el sistema de translocasas TOM/TOB, que participa en el reconocimiento inicial de las proteínas que se importarán a la mitocondria. Todo ello hace que la MME sea altamente permeable a iones y moléculas inferiores a 5kDa (Figura 1).

Por otro lado, la MMI presenta un mayor contenido en proteínas y fosfolípidos y es altamente selectiva e impermeable al paso de la mayoría de solutos. Por ello, para permitir el transporte de metabolitos requiere la presencia de numerosos transportadores específicos o translocasas de membrana, como el complejo TIM22/TIM23 o la translocasa OXA1, gracias a los cuales ocurre el transporte y procesamiento de proteínas con destino mitocondrial que han sido sintetizadas en el citoplasma (Figura 1). También presenta transportadores de grupos prostéticos, necesarios para la correcta biosíntesis y funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 1)⁹.

Finalmente, la MMI se encuentra altamente plegada hacia la matriz, formando invaginaciones llamadas crestas mitocondriales, las cuales incrementan considerablemente el área de superficie de la MMI permitiéndole albergar todos los complejos proteicos que forman el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), que es la maquinaria responsable de la síntesis de ATP. Por ello, el número y morfología de estas crestas dependerán de la demanda energética que presente el tejido del que forme parte la célula¹⁰.

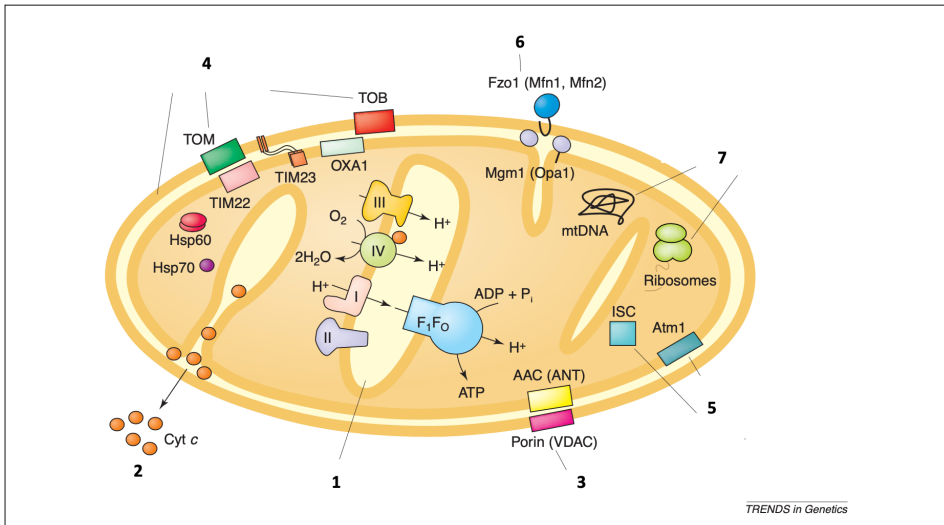


figura 1: Esquema de los principales procesos que tienen lugar en la mitocondria. (1) Fosforilación oxidativa (2) Apoptosis vía liberación de citocromo c (3) Intercambio de metabolitos y nucleótidos mediante proteínas transportadoras (4) Translocación de proteínas a través de las translocasas de membrana externa (TOM) e interna (TIM), plegamiento (Hsp70, Hsp60) y degradación de proteínas (5) Biosíntesis y exportación de grupos Fe/S (6) Proteínas implicadas en los procesos de dinámica mitocondrial (Fzo1, Mfn1, Mfn2, Mgm1 y Opa1) (7) Procesos de replicación, transcripción, procesamiento de RNAs y traducción de genes mitocondriales (Imagen adaptada de Reichert, A.S. y Neupter, W., 2004⁹).

1.2 El genoma mitocondrial (mtDNA).

Como se ha mencionado anteriormente, cada tipo celular puede contener un número variable de mitocondrias y, a su vez, cada mitocondria puede contener un número variable de copias de mtDNA. Por tanto, una célula humana podrá contener miles de copias de mtDNA (100-1.000 copias por célula en función del tejido)¹¹, que pueden estar distribuidas en un número variable de mitocondrias individuales o bien pueden estar formando una red intracelular de mitocondrias¹².

El DNA mitocondrial (mtDNA) humano es una molécula circular de doble cadena compuesta por 16.569 pares de bases (pb). El mtDNA contiene 37 genes que codifican la información necesaria para la síntesis de los 2 RNAs ribosómicos (rRNA 12S y 16S) y 22 RNAs de transferencia (tRNA) necesarios para su propia expresión. El resto de genes mitocondriales contiene la información necesaria para la síntesis de 13 proteínas que forman parte de los distintos complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) (introducción apartado 4) (Figura 2)¹².

Sin embargo, todos los factores transactivadores (polimerasas, factores reguladores de expresión...), así como el resto de proteínas que intervienen en el mantenimiento y expresión del genoma mitocondrial, están codificados por el nDNA¹³ y, aproximadamente los 1.500 genes restantes que conforman el proteoma mitocondrial también están codificados por el nDNA, son traducidos por ribosomas citoplasmáticos y transportados a la mitocondria a través de los diversos sistemas de importación de proteínas¹⁴. El genoma mitocondrial posee, por tanto, una capacidad codificante limitada y necesita coordinarse con el genoma nuclear para su correcta funcionalidad¹³.

En función de la densidad que presentan, dependiendo del contenido en nucleótidos de guanina y citosina, se distinguen dos cadenas que forman el mtDNA: la cadena pesada (H, *heavy*), con un mayor contenido en estos y, la cadena ligera (L, *light*) (Figura 2). Cada cadena presenta su propio origen de replicación (O_H y O_L respectivamente) (Figura 2)¹⁴.

La mayor parte de la molécula de mtDNA es codificante y contiene muy pocas zonas reguladoras (D-Loop, O_H y O_L) (Figura 2)

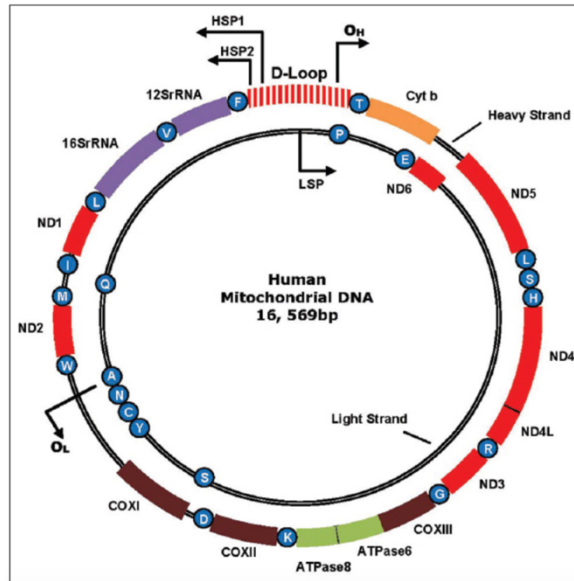


Figura 2: Genoma mitocondrial humano. El mtDNA es una molécula circular de 16.569 pb que codifica 2 rRNA (color morado), 22 tRNA (círculos azules) y 13 subunidades del sistema OXPHOS (ND1-ND6 y ND4L; complejo I – COXI-COXII; complejo IV- ATPasa 6-8; complejo V – Cyt b; complejo III). Además, contiene una región no codificante (D-Loop) que incluye los promotores para el inicio de la transcripción de la cadena ligera (LSP) y los de la cadena pesada (HSP1-2) así como el origen de replicación de la cadena pesada (O_H), y un origen de replicación para la cadena ligera (O_L) (Imagen obtenida de *Mohamed Yusoff A.A., 2015*¹²)

El mtDNA se encuentra organizado en una serie de complejos proteína-DNA que contienen una o varias copias de mtDNA y que reciben el nombre de nucleoides^{15,16}. Estos se encuentran anclados a la MMI de cara a la matriz y distribuidos de forma homogénea. Los nucleoides están involucrados en múltiples procesos mitocondriales y se ha postulado que alguna de las funciones que cumplen consiste en controlar que las diferentes copias del mtDNA se distribuyan a lo largo de toda la mitocondria, de manera que generan una serie de unidades de replicación autónoma del mtDNA que se pueden segregar de forma más eficiente e independiente^{17,18}.

Cabe recalcar que el contenido y el estado del mtDNA en el nucleoide está fuertemente influenciado por la presencia del factor A de transcripción mitocondrial (TFAM). Este fue identificado inicialmente como un factor de transcripción del mtDNA. De hecho, la transcripción en mitocondria se inicia cuando TFAM se une al mtDNA y solo después de la unión de la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT) al promotor¹⁹. Además de esta función principal, TFAM puede unirse de forma no específica a lo largo de toda la longitud del mtDNA. Esta interacción da como resultado la flexión y compactación de la molécula de mtDNA, regulando la accesibilidad de las enzimas que median la replicación. Además, se ha demostrado *in vitro* que un aumento en la concentración de TFAM aumenta drásticamente el número de moléculas de mtDNA supercompactadas, lo que se traduce en un aumento del número de copias finales de mtDNA²⁰. Por lo tanto, TFAM puede ser considerado como el principal regulador del estado del mtDNA en los nucleoides, pues la cantidad de este impacta directamente en el número de moléculas de DNA disponibles para expresión, replicación o reparación²¹.

2. Replicación del mtDNA.

El replisoma mitocondrial está constituido por una serie de enzimas necesarias para la síntesis del mtDNA durante la replicación. Todas ellas necesitan estar en concentraciones equilibradas para desarrollar su función de manera correcta y, es por lo que, el intercambio de sustratos entre mitocondrias a través de la fusión mitocondrial resulta esencial para mantener una correcta homeostasis del proceso en todas ellas. La composición del replisoma mínimo, es decir, la composición mínima de proteínas necesarias para que ocurra la replicación, se ha descrito *in vitro* y está constituido por: la polimerasa-gamma (POLG), la proteína de unión al DNA monocatenario mitocondrial (mtSSB), la helicasa TWINKLE y la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT)²².

La enzima encargada de la replicación del mtDNA es la polimerasa-gamma (POLG). Esta es una enzima heterotrimérica que contiene una subunidad catalítica (codificada por *POLG*) y dos subunidades accesorias (codificadas por *POLG2*), que estimulan la unión al DNA y regulan la actividad de la subunidad catalítica, confiriéndole procesividad a la síntesis de DNA. La subunidad catalítica (POLG) contiene tres dominios funcionales (exonucleasa, *linker* y polimerasa) y presenta tres actividades enzimáticas diferentes: 3'-5' exonucleasa, 5'-3' polimerasa y 5'-desoxiribosa liasa²³. La helicasa TWINKLE es la encargada de separar las dos cadenas del mtDNA para permitir el avance de la polimerasa²². Por otro lado, la proteína mtSSB se une al DNA de cadena simple, protegiéndolo de la acción de nucleasas y evitando la formación de estructuras secundarias y, además, aumenta la síntesis de DNA mediante la estimulación de la actividad helicasa de TWINKLE, lo que a su vez aumenta la procesividad de POLG²⁴. La RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT) participa en la transcripción y a su vez actúa como primasa para la replicación del mtDNA²⁴.

Por último, la topoisomerasa 1 mitocondrial (TOP1MT), desenrolla el mtDNA al frente de la horquilla de replicación para liberar tensión en la doble hélice y cataliza la posterior ligación del mtDNAD^{25,26}.

La replicación del mtDNA es un proceso lento y complejo que puede prolongarse durante un tiempo variable, en función de la situación celular. Es, además, un proceso continuo que ocurre independientemente de la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula. Actualmente, el modelo más aceptado para explicar la replicación del mtDNA es el conocido como modelo asimétrico y asincrónico de desplazamiento de hebra. En este modelo, existen dos orígenes de replicación independientes y unidireccionales (uno en cada cadena del mtDNA) que inducen al replisoma a iniciar de manera continua la síntesis del DNA²¹.

El proceso se inicia en el O_H de la cadena pesada, el cual está localizado en la zona D-Loop, que contiene las principales secuencias de regulación de transcripción y el inicio de la replicación (Figura 2)²⁷. A partir del promotor de la cadena L (LSP) (Figura 2) la POLRMT sintetiza un fragmento de RNA que actúa de *primer*, hasta que pocos nucleótidos después se produce una transición a DNA donde POLG reemplaza a POLRMT, coincidiendo con el O_H. Llegados a este punto, una parte de las moléculas mantienen una estructura de “triple cadena híbrida” o D-loop con un fragmento de DNA incipiente que se conoce como DNA 7s. Otra parte de las moléculas progresan en la replicación de la cadena H que va avanzando y, cuando se encuentra a dos tercios de completar el proceso alcanza el O_L, momento en el que se inicia la síntesis de la cadena L que avanzará en dirección contraria a la síntesis de la cadena H (Figura 3)²⁴.

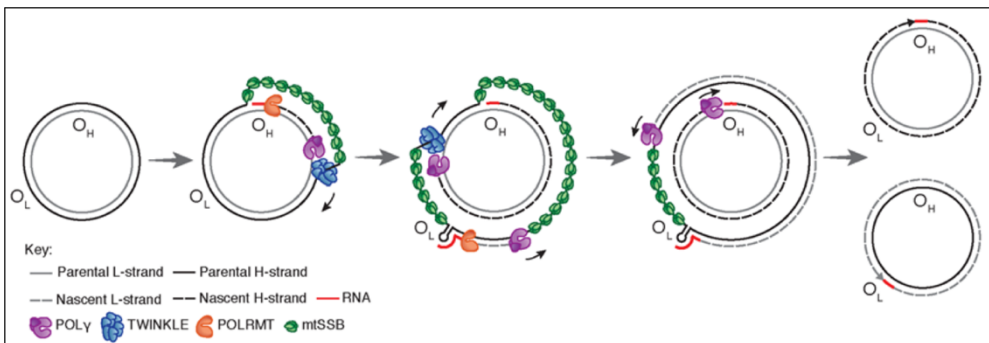


Figura 3: Modelo asincrónico para la replicación del mtDNA. La replicación se inicia en el O_H de manera unidireccional para sintetizar la cadena H. mtSSB se une y protege la otra cadena H parental que queda expuesta. La transición hacia la síntesis del DNA de la cadena L tiene lugar después de aproximadamente 25 nucleótidos, cuando POLG reemplaza a POLRMT en el extremo 3' del *primer*. La síntesis de las dos hebras se realiza de manera continua hasta que se han formado dos moléculas de ADN de doble cadena completas. (Imagen obtenida de *Falkenberg M., 2018*²⁴).

Cabe mencionar que aún hoy desconocemos muchos de los factores que regulan el proceso. Asimismo, se han propuesto modelos alternativos para explicar el proceso de replicación que implicarían la síntesis discontinua de las cadenas y la formación de pequeños fragmentos de RNA a lo largo de las mismas o la existencia de otro origen de replicación en la cadena ligera que permitiese la síntesis sincrónica de ambas cadenas²⁸.

3. Cadena transportadora de electrones mitocondrial y fosforilación oxidativa. Sistema OXPHOS.

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) es un proceso metabólico que tiene lugar en la mitocondria y que es responsable de proveer la mayor parte de la energía utilizable por las células. El sistema OXPHOS acopla dos conjuntos de reacciones metabólicas: la respiración celular y la síntesis de ATP.

La respiración celular consiste en la transferencia secuencial de electrones, desde el NADH y el FADH₂, producidos ambos durante el metabolismo de sustratos orgánicos en la matriz mitocondrial, a través de una cadena de reacciones *redox*, hasta el oxígeno molecular que actúa como último aceptor de electrones, reduciéndose para obtener agua. Estas reacciones *redox* tienen lugar en la cadena de transporte de electrones (CTE) que está formada por los diferentes complejos de la cadena respiratoria (Figura 4): complejo I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa, EC 1.6.5.3), complejo II (CII, succinato: ubiquinona oxidorreductasa, EC 1.3.5.1), complejo III (CIII, ubiquinol: ferrocitocromo c oxidorreductasa, EC 1.10.2.2) y complejo IV (CIV, citocromo c oxidorreductasa, COX, EC 1.9.3.1). También forman parte de la CTE dos elementos más simple que actúan como transportadores móviles de electrones: el coenzima Q10 o ubiquinona, y el citocromo c.

La energía que se libera durante la respiración impulsa la formación de un gradiente de protones (H⁺) a través de la MMI que se utiliza por la ATP sintasa o complejo V (CV, F1F0 ATPasa, EC 3.6.3.14) para catalizar la condensación de ADP y fosfato inorgánico (P_i) en ATP (Figura 4), siendo este la principal fuente de energía en la célula²⁹. Cada uno de los complejos del sistema OXPHOS está formado por varias subunidades, algunas de las cuales juegan un papel fundamental en la actividad catalítica del complejo.

Sin embargo, otras muchas no son esenciales para la actividad catalítica, pero son necesarias en la ensamblaje, estabilidad y control del funcionamiento del complejo en sí y se denominan subunidades supernumerarias o accesorias.

Además, como se ha mencionado anteriormente, desde un punto de vista genético el sistema OXPHOS presenta una particularidad en la célula, pues a excepción del complejo II cuyas subunidades están íntegramente codificadas por el nDNA, el resto de complejos que lo forman presentan subunidades codificadas tanto por el nDNA como por el mtDNA.

Las subunidades nucleares se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son exportadas a la mitocondria, donde se ensamblan con las subunidades codificadas por el mtDNA para formar los complejos correspondientes, con ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos^{30,31}.

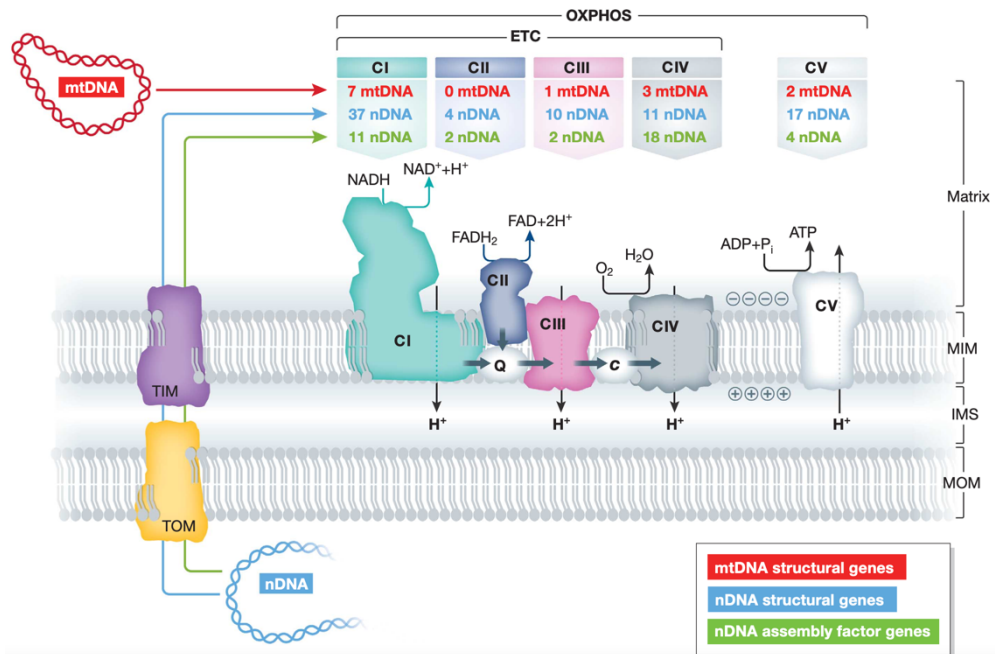


Figura 4: Origen genético e interacción funcional de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS consta de cinco complejos multiproteicos (CI-CV) alojados en la membrana mitocondrial interna (MIM). Las subunidades del CI, CIII, CIV y CV están codificadas por el mtDNA (rojo) y nDNA (azul), mientras que el CII consta exclusivamente de subunidades codificadas por el nDNA. La biogénesis del sistema OXPHOS está mediada por factores de ensamblaje codificados por el nDNA (verde). Las proteínas codificadas en el nDNA se importan a la matriz mitocondrial a través de los sistemas TOM (translocador de la membrana externa) y TIM (translocador de la membrana interna). En los CI y CII, el NADH y FADH₂ se oxidan, respectivamente, y los electrones liberados se transportan al CIII a través de la coenzima Q (Q). A partir de ahí, los electrones se transportan al CIV a través del citocromo-c (cyt-c; "c") y se donan al oxígeno molecular (O₂). Todos los complejos desde el CI al CIV constituyen la cadena de transporte de electrones (CTE). La energía derivada del transporte de electrones se utiliza para bombear protones (H⁺) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Esto establece una fuerza electroquímica protón-matriz, asociada a un potencial de membrana mitocondrial negativo. El flujo de retorno de H⁺ se utiliza por el CV para impulsar la producción de ATP (Koopman WJ., et al; 2012³²).

3.1 Complejo I: NADH Ubiquinona Oxidorreductasa.

El complejo I (CI) constituye, junto con el CII, el primer punto de entrada de electrones a la CTE. Es el más grande de todo el sistema OXPHOS, con un peso molecular en torno a 1 MDa. El CI bovino de mamífero está formado por 45 subunidades, de las cuales 7 están codificadas por los genes *ND* del mtDNA (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, y *ND6*) y las 38 subunidades restantes por genes nucleares^{33,34}. La composición en subunidades, así como la topología del CI se han investigado en profundidad mediante preparaciones de corazón bovino³⁵. El complejo bovino I es una enzima anclada a la MMI de 45 subunidades con un FMN unido de manera no covalente y ocho grupos hierro-azufre. Presenta forma en "L", con un brazo incrustado en la MMI y otro brazo periférico, en disposición ortogonal sobre este, que sobresale hacia la matriz mitocondrial (Figura 5)³⁶.

El complejo I constituye el principal punto de entrada de electrones a la CTE, ya que cataliza la transferencia de los dos electrones del NADH hasta la coenzima Q (CoQ) o ubiquinona. En condiciones metabólicas y fisiológicas normales, la transferencia de electrones se acopla al bombeo de 4 H⁺ hacia el espacio intermembrana (Figura 4).

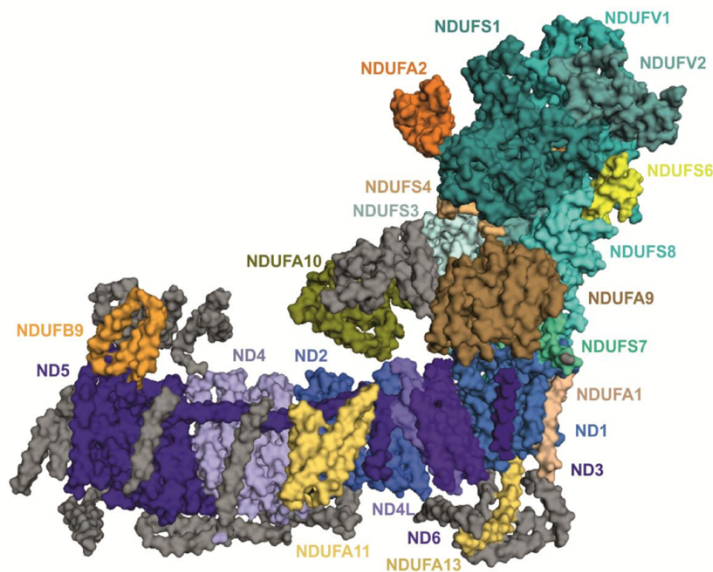


Figura 5: Subunidades del complejo I y su asociación con enfermedades humanas. Se representa la estructura de superficie del complejo I basada en los datos de estructura disponibles del complejo I bovino. Las subunidades para las que se han descrito mutaciones patológicas (en el momento de publicación) se muestran en diferentes colores. Las subunidades centrales en los módulos enzimáticos N y Q se representan en tonos verdes, y las subunidades centrales en el módulo P de bombeo de protones en tonos púrpura. La mayoría de las subunidades en las que aún no se han descrito mutaciones (mostradas en gris) son subunidades accesorias asociadas con el módulo P del complejo que se encuentra en la membrana mitocondrial interna (Richard JR., 2016³⁷).

La estructura conjunta del complejo I contiene tres módulos funcionales cuya composición ha sido parcialmente descrita: el módulo deshidrogenasa o módulo-N (incluye las subunidades NDUFV2, NDUFV1 y NDUFS1), localizado en el extremo del brazo periférico, es el responsable de la oxidación del NADH hasta NAD^+ ; el módulo hidrogenasa o módulo-Q (incluye las subunidades NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 y NDUFS8 y los grupos Fe-S), encargado de la transferencia de electrones hasta la ubiquinona; y el módulo de translocación de protones o módulo-P (incluye las siete subunidades ND

codificadas por el mtDNA), que constituye la mayor parte del brazo transmembrana del complejo³⁸.

A su vez, el complejo I puede disociarse en diferentes subcomplejos: α , β , γ , e λ . El subcomplejo α forma el brazo periférico hidrofílico del complejo junto con parte del brazo de membrana hidrofóbico, mientras que el subcomplejo β contiene la parte principal del brazo hidrofóbico de membrana. Ambos subcomplejos juntos forman el subcomplejo γ . Por último, la disociación del subcomplejo α libera el subcomplejo λ , que representa el brazo hidrofílico periférico. Este está formado por las subunidades NDUFA1-NDUFA4, NDUFA6-NDUFA10, NDUFAB1, NDUFB1-NDUFB10, NDUFC1 Y NDUFC2. Este subcomplejo contiene los centros hierro-azufre donadores de electrones a la ubiquinona y el sitio de unión al NADH (Figura 5)^{38,39}.

Catorce de las subunidades contenidas en el complejo I forman lo que se conoce como el núcleo catalítico del complejo y son las que proporcionando los motivos unión, participan de la actividad redox o en el bombeo de protones. El resto de subunidades que lo forman son subunidades supernumerarias³⁹. Su gigantesco tamaño, la gran cantidad de subunidades diferentes y los diversos grupos prostéticos que forman parte de la holoenzima hacen que el ensamblaje del complejo I sea un proceso muy complicado para el que aún no se conocen todos los detalles.

3.1.1 Subunidades supernumerarias del complejo I.

Como se ha mencionado anteriormente, de las 45 subunidades que forman el complejo I mitocondrial de mamífero, 31 reciben el nombre de subunidades supernumerarias o accesorias (Tabla 1) ya que no son indispensables para la actividad catalítica del complejo y no están presentes

en todos los organismos. Estas subunidades, a diferencia de las subunidades que forman el núcleo catalítico del complejo, varían entre especies y su presencia o ausencia resulta muy relevante para comprender la evolución filogenética del complejo I. Algunas subunidades supernumerarias se conservan en la mayoría de los organismos eucariotas mientras que otras son específicas de grupos más pequeños de organismos^{40,41}. La mayor parte de las subunidades accesorias juegan un papel esencial controlando la estabilidad y participando en el ensamblaje del complejo I⁴². Sin embargo, algunas de las subunidades supernumerarias del complejo I son homólogas, o idénticas, a proteínas de función conocida, por lo que se han sugerido funciones adicionales específicas para ellas. Un ejemplo son proteínas con función sulfurotransferasa identificadas en *Y. Lipolytica*⁴³, proteínas transportadoras de grupos acilo y, por tanto, implicadas en el metabolismo lipídico en la mitocondria⁴⁴ o proteínas implicadas en vías de señalización pro-apoptótica⁴⁵.

Nombre	UAC	PFAM
NDUFA2*	UACE	Proteína ribosomal mitocondrial L51/S25/CI-B8
NDUFA6*	UACE	Complejo I LYR
NDUFB8*	UACE	Complejo I LYR
NDUFA8*	UACE	CX9C
NDUFB7*	UACE	CX9C
NDUFS5*	UACE	CX9C
NDUFB10*	UACE	
NDUFA9	UACE	GDP-manosa 4,6 deshidratasa
NDUFA10*	Metazoos	Desoxinucleósido quinasa
NDUFAB1*	UACE	Sitio de unión a fosfotanteína (ACP)
NDUFS6*	α -Proteobacteria	Dedos de zinc (CHCC)
NDUFAF1*	UACE	Dominio de unión a carbohidratos
NDUFAF2*	UACE	NADH ubiquinona oxidorreductasa
NDUFAF3	Bacteria	DUF498
NDUFAF4*	UACE	Neugrina
NDUFAF5	Bacteria	Metiltransferasa SAM-dependiente (familia 23)
NDUFAF6*	Bacteria	Escualeno/Fitoeno Sintasa
NDUFAF7	Bacteria	Metiltransferasa SAM-dependiente (familia 23)
ACAD9	Metazoos	Acetil-CoA deshidrogenasa
ECSIT	Filozoos	Familia PPR
FOXRED1*	Metazoos	Oxidorreductasa FAD dependiente
NUBPL	Bacteria	P-loop NTPasa
TIMMDC1*	Metazoos	Tim17/Tim22/Tim23/Pmp24 Familias
TMEM126B*	Mamíferos	DUF1370

Tabla 1: Subunidades accesorias y factores de ensamblaje más representativos del complejo I mitocondrial. Se recogen las subunidades accesorias más representativas del complejo I mitocondrial humano, así como los dominios funcionales registrados en PFAM para cada una de ellas. UAC: Último ancestro común a partir del cual la proteína humana diverge en la evolución; UACE: Último ancestro común eucariota; PFAM: dominio funcional de la proteína registrado en la base de datos PFAM; *Proteína que se ha demostrado esencial para el ensamblaje del complejo según Stroud y colaboradores⁴⁶ (Tabla modificada de *Elurbe DM., et al; 2011*⁴⁷).

3.1.2 Biogénesis mitocondrial y citosólica del complejo I.

El proceso de biogénesis del complejo I es complicado y requiere una gran cantidad de maquinaria para su funcionamiento. En primer lugar, como hemos visto anteriormente, el mtDNA precisa de mecanismos dedicados a la replicación, transcripción y traducción para poder producir las siete subunidades del complejo I que codifica. Estas proteínas se traducen y se insertan de forma co-traducciona en la MMI a través de la proteína insertasa OXA1⁴⁸ (Figura 6).

Por otro lado, el resto de las subunidades, codificadas por el nDNA, son traducidas en los ribosomas citosólicos y se exportan a la mitocondria a través de la translocasa de membrana externa (TOM) (Figura 6). La mayoría de estas subunidades pasan al complejo TIM23 donde se clasifican para insertarse en la MMI o ser trasladadas a la matriz. Una vez en la matriz, estas subunidades sufren un proceso de maduración por el que se elimina la señal de importación mitocondrial. Sin embargo, las proteínas que se insertan en la MMI no interaccionan con la maquinaria TIM y su maduración consta de un plegamiento oxidativo catalizado por el complejo AIF/CHCHD4⁴⁹ (Figura 6).

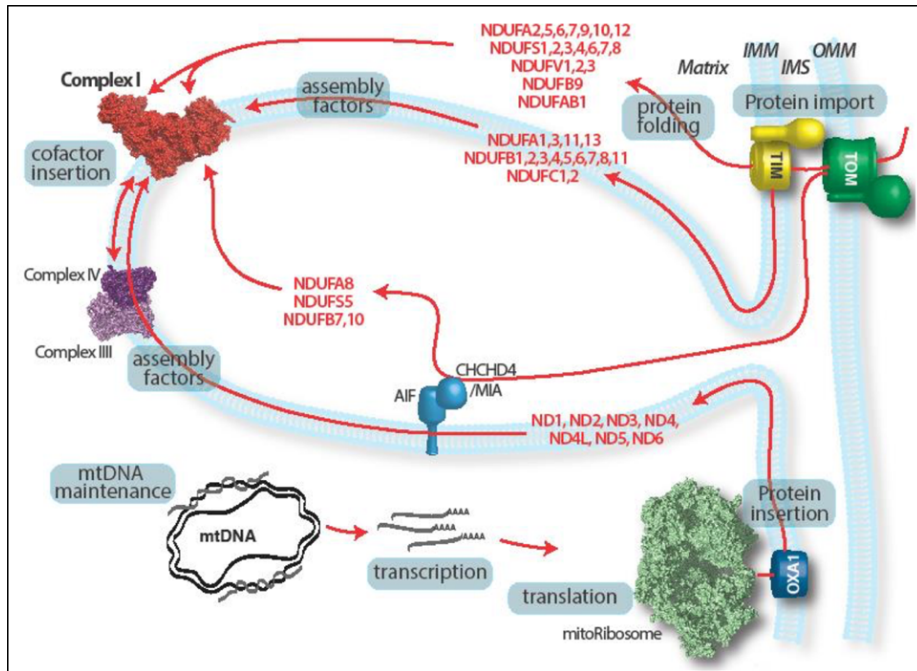


Figura 6: Ensamblaje del complejo I. Para construir el complejo I, el mtDNA debe replicarse y transcribirse. El RNA se traduce en el mitorribosoma y los productos de la traducción se insertan en la membrana mediante la insertasa OXA1. Las proteínas producidas por los ribosomas citosólicos se exportan a la mitocondria por el complejo TOM y se clasifican en varios subcompartimentos (matriz, MMI, espacio intermembrana o MME). Las proteínas de la matriz y las proteínas de la membrana interna utilizan el complejo TIM, mientras que las proteínas del espacio intermembrana que sufren un plegamiento oxidativo pasan por el complejo AIF/CHCHD4. Después de su maduración, las subunidades del complejo I se ensamblan en un proceso mediado por factores de ensamblaje. El complejo I también se asocia con los complejos respiratorios III y IV formando supercomplejos que juegan un papel relevante en la ruta de ensamblaje (Formosa L., et al; 2018⁵⁰).

Finalmente, tras la importación e inserción en la MMI de las proteínas de origen citosólico y de la inserción co-traduccional de las proteínas de codificación mitocondrial, se obtendrán un total de 6 módulos proteicos (Figura 7), que contienen cada una de las subunidades que forman el

complejo I, y que se ensamblarán de manera secuencial hasta formar un complejo I completo y funcional.

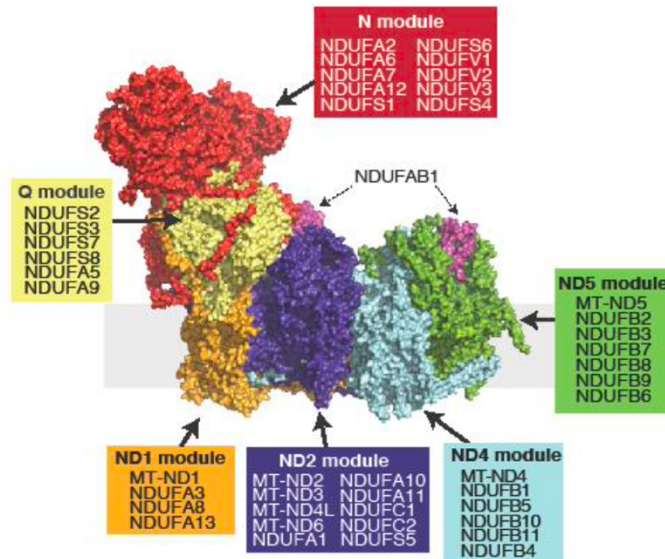


Figura 7: Composición modular del complejo I mitocondrial. Los diferentes módulos, así como su composición en subunidades, se representan en función de los datos disponibles a partir de la estructura del complejo I de origen bovino (*Imagen obtenida de*⁵⁰).

3.1.3 Ensamblaje del complejo I.

Caracterizar el ensamblaje del complejo I resulta complicado debido a su gran tamaño y a que se trata de un proceso sometido a un doble control genético, que debe coordinar la incorporación de subunidades codificadas por el mtDNA y por el nDNA. La mayor parte del conocimiento detallado de la vía de ensamblaje del complejo I ha derivado de estudios en sistemas modelo como *N. crassa* o del estudio de células de pacientes que presentan mutaciones que interfieren con proceso^{51,52}. Además, se sabe que los complejos III y IV juegan un papel importante en el ensamblaje y estabilidad

del complejo I y que, a su vez, los intermediarios que se forman durante el proceso de ensamblaje del complejo I juegan un papel importante en el ensamblaje de los complejos propios III y IV, así como en la formación de supercomplejos^{53,54}.

Tradicionalmente han existido dos vías para explicar el complicado proceso de ensamblaje del complejo I. El primer modelo que se desarrolló se basa en el conocimiento generado a partir de los estudios en el modelo fúngico de *N.Crassa*^{55,56}. En este modelo, denominado vía modular, el brazo transmembrana y el brazo de la matriz se ensamblan de forma independiente y se unen entre sí para finalmente formar el complejo I completo en la fase final de la vía de ensamblaje⁵⁷.

Sin embargo, el modelo actual para explicar la vía de ensamblaje del complejo I en mamíferos combina el conocimiento derivado de *N.Crassa* junto con el obtenido a partir de células humanas de pacientes con mutaciones que afectan al proceso, y que acumulan diferentes intermediarios de ensamblaje⁵⁸. En este modelo, igual que en el modelo anterior, los intermediarios que forman el brazo de matriz y el brazo de membrana se ensamblan de manera independiente para obtener finalmente un complejo I completo, pero a diferencia de *N.Crassa*, las subunidades que forman cada uno de los módulos se ensamblan entre sí de manera temprana en la vía de ensamblaje, de manera previa al ensamblaje de los módulos entre sí⁵⁸.

En dicho proceso, la formación del brazo de matriz comienza con la unión entre el módulo Q y el módulo ND1, proceso en el que participan hasta seis factores de ensamblaje diferentes (Figura8). A continuación, el módulo ND2 se asocia al complejo Q/ND1 en un proceso en el que intervienen hasta cuatro factores de ensamblaje diferentes. Al mismo tiempo, se inicia la

formación del brazo de membrana con la asociación de los módulos ND4 y ND5, mediada por tres factores de ensamblaje adicionales. En el siguiente paso, tiene lugar la asociación entre el complejo Q/ND1/ND2 y el complejo ND4/ND5, formándose un intermediario de etapa tardía que contiene el brazo de membrana completamente formado, para finalmente producirse la asociación del módulo N, que incluye las subunidades más adentradas en la matriz, y obtener el complejo I completamente ensamblado (Figura 8)⁵⁰.

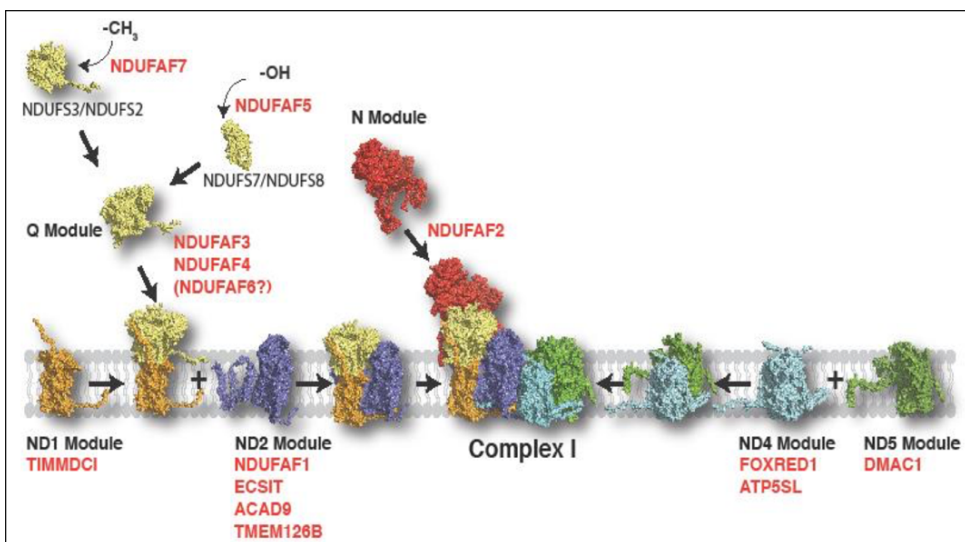


Figura 8: Vía de ensamblaje del complejo mitocondrial I. Las subunidades del complejo I se ensamblan en módulos discretos antes de unirse para formar el complejo funcional. El módulo Q se integra con el módulo ND1 y además se asocia con el módulo ND2. Los módulos ND4 y ND5 se asocian y luego se integran con los módulos Q/ND1/ND2 para formar un intermediario de etapa tardía compuesto por el módulo Q y el brazo de membrana completo del complejo I. El módulo N luego se asocia con este intermediario para formar el complejo I completamente ensamblado. En rojo, se indican los factores de ensamblaje asociados con la biogénesis de cada módulo (Imagen obtenida de⁵⁰).

Actualmente se han descrito hasta 14 factores de ensamblaje que participan en puntos conocidos de la ruta. Sin embargo, existen varias proteínas adicionales implicadas en la biogénesis del complejo I que han sido identificadas a partir de estudios en pacientes que presentaban mutaciones causantes de déficit de complejo I, o por su asociación con otros factores de ensamblaje conocidos, cuyo papel en el proceso de ensamblaje del complejo I no ha sido aún adecuadamente caracterizado, lo que indica que aún queda mucho por conocer en cuanto al proceso global de ensamblaje del complejo I mitocondrial^{58,59}.

3.1.4 Estados catalíticos del complejo I: Estado activo/inactivo.

El complejo I puede adoptar dos estructuras conformacionales diferentes con propiedades catalíticas distintas, lo que se conoce como el estado activo (A) o inactivo (D) del complejo I [68]. En mamíferos, la forma A está presente bajo condiciones fisiológicas de temperatura normal y disponibilidad de O₂, NADH y ubiquinona, y es la responsable de la catálisis de la reacción redox del NADH y la ubiquinona con un elevado *ratio* metabólico (Figura 9). Sin embargo, bajo condiciones que obstaculizan la catálisis (baja disponibilidad de oxígeno o hipoxia metabólica), el complejo I se convierte espontáneamente a la forma D, la cual presenta un *ratio* catalítico considerablemente más bajo (Figura 8)⁶⁰. Esta forma D puede ser potencialmente reactivada a la forma A cuando los sustratos vuelven a estar presentes en concentración suficiente⁶¹. En base a todo lo antes descrito, actualmente se cree que el papel fisiológico de la transición A/D es un mecanismo adaptativo de respuesta metabólica a las fluctuaciones del suministro de oxígeno en la célula.

El mecanismo molecular exacto que media en la transición A/D aún no ha sido totalmente descrito.

Sin embargo, actualmente se cree que el cambio más relevante en este proceso es la disposición de la subunidad ND3 en el complejo I. Dado que el dominio ND3 se encuentra en el lado hidrofílico del complejo I, entre los módulos Q y P, se cree que la falta de actividad catalítica en la forma D ocurre como consecuencia del bloqueo del sitio de unión de la ubiquinona⁶².

El residuo de cisteína 39 (Cys-39) de la subunidad ND3 ha sido identificado por Galkin y colaboradores como el único residuo expuesto únicamente cuando el complejo se encuentra en estado D (Figura 9)^{63,64}. Además, se han identificado mutaciones patogénicas en humanos en zonas próximas a la Cys-39, que evidencian la relevancia de esta zona para la correcta función del complejo I^{65,66}. Por tanto, se cree que la modificación covalente de la Cys-39 es la forma más común de inactivación del complejo I, incluso en situaciones de elevada disponibilidad de sustratos. Esta inhibición se produce a causa de la interacción de la Cys-39 con ROS, cuya producción se ve incrementada con la reentrada de oxígeno. Esta interacción conduce a una inhibición irreversible del complejo I, lo que provoca que este no pueda convertirse a la forma A durante la reperfusión y, por tanto, ocurra el daño en el tejido en cuestión.

En tejidos con elevada actividad metabólica a concentraciones elevadas de oxígeno se ha observado que una fracción del complejo I en torno al 5-15% se encuentra en la forma D⁶⁷, lo que parece indicar que una parte de la energía que se libera durante la oxidación del NADH en el estado A se está empleando en mantener dicha forma catalíticamente no competente, permitiendo una respuesta rápida a cambios en las condiciones de oxígeno y demanda celular de ATP⁶⁷. Por ejemplo, se ha encontrado que la transición hacia la forma D tras un evento como un paro cardíaco, que limita considerablemente el suministro de oxígeno, es mucho más rápida en el

cerebro que en el propio tejido cardíaco⁶⁷, lo que explica la mayor vulnerabilidad del cerebro frente a la falta de oxígeno.

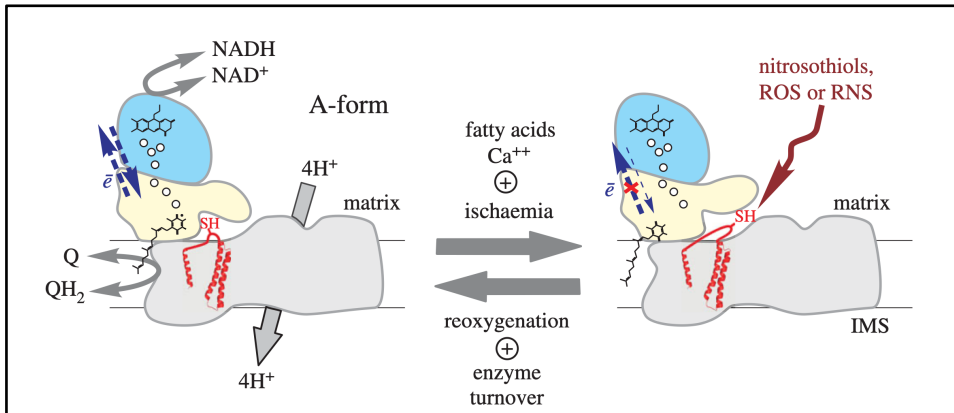


figura 9: Modelo de transición entre las formas A/D del complejo I mitocondrial. La forma activa de la enzima puede catalizar tanto el transporte normal de electrones como el RET (transporte reverso de electrones). Condiciones de privación de sustrato, como la isquemia, inducen la desactivación del complejo, cuya transferencia de electrones puede acelerarse en gran medida por los ácidos grasos libres y el calcio. La reactivación (D/A) ocurre después de la reperfusión, cuando vuelve a haber oxígeno y la enzima tiene un recambio lento. Los dominios azul, amarillo y gris representan módulos de NADH-deshidrogenasa, reducción de quinonas y translocación de protones, respectivamente. La Cys-39 crítica de la subunidad ND3 está expuesta solo en la forma D y puede ser modificada específicamente por nitro tioles, ROS y RNS. Las esferas pequeñas indican la posición de los grupos de Fe-S (Imagen obtenida de⁶⁸).

3.1.5 Patologías asociadas a defectos en el ensamblaje del complejo I.

Algunas mutaciones en determinadas subunidades del complejo I asociadas a enfermedad se han demostrado como mutaciones que afectan al proceso global de ensamblaje de este. Este es el caso, por ejemplo, se ha observado que mutaciones estructurales en las subunidades ND4, ND5 o ND6 provocan alteraciones en el proceso de ensamblaje del complejo I.

Además, se han descrito mutaciones patogénicas en ND4 que bloquean totalmente el proceso de ensamblaje y que se traducen en una pérdida total de complejo I, siendo causantes de la neuropatía óptica hereditaria de Leber^{69,70}. También se han descrito mutaciones en ND5 y ND6 que bloquean el ensamblaje y provocan la pérdida del complejo I, causando patologías como el síndrome de Leber o alteraciones de la fosforilación oxidativa⁷¹. Sin embargo, mutaciones ocurridas en ND1 no causan una deficiencia completa del complejo I, pero sí que alteran su funcionalidad y se relacionan con algunas formas del síndrome de Leber o el síndrome MELAS⁷².

Por otro lado, existe una gran variedad de patologías asociadas a mutaciones en subunidades del complejo I codificadas por el nDNA, ya que, en definitiva, cuando se compromete la estabilidad de la subunidad en cuestión, esto acaba comportando un déficit del holoenzima final⁷³.

3.1.6 NADH Ubiquinona Oxidorreductasa Subunidad A10: NDUFA10.

La subunidad A10 del complejo I mitocondrial (NDUFA10) (UniProtKB-O95299 (NDUAA_HUMAN)) es una proteína de 42 kDa formada por 355 aminoácidos y codificada por el gen *NDUFA10*, que se localiza en el brazo q del cromosoma 2 humano⁷⁴. Se trata de una proteína globular compacta con 4 láminas beta paralelas rodeadas por múltiples hélices alfa. Se encuentra en el lado de la matriz del dominio de membrana del complejo, e interacciona principalmente con las subunidades ND2 y NDUFS2 del core. Se ha encontrado que el dominio hidrofóbico N-terminal tiene capacidad para doblarse en α -hélice, abarcando la membrana mitocondrial interna con un dominio hidrofílico C-terminal que puede interactuar con subunidades globulares del propio complejo I⁷⁵. Esta estructura está altamente conservada, lo que sugiere que es crítica para la proteína y que el dominio hidrofóbico actúa como un ancla para el complejo I en la membrana

mitocondrial interna. Los estudios evolutivos muestran que la NDUFA10 pudo originarse en un estadio muy temprano de la evolución de los metazoos, pues presenta un ortólogo en uno de los metazoos más simples que se conocen, el *Trichoplaxadhaerens* (uniprot ID B3RQT8_TRIAD).

Por otro lado, la NDUFA10 presenta un alto porcentaje de identidad de secuencia con algunas desoxirribonucleósido quinzasas (dNKs) que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs (familia dNK TK1-no similar, ver introducción apartado 4.2.3), como la desoxicitidina quinasa (dCK), la timidina quinasa 2 (TK2) o la desoxiguanosina quinasa (dGK). Con estas enzimas comparte el dominio dNK según se registra en la base de datos PFAM (PF01712).

La comparación de la secuencia de la NDUFA10 con la de la dCK revela que la mayoría de los aminoácidos que forman el dominio de unión al nucleósido y al ATP en la dCK están altamente conservados en la NDUFA10. Estos aminoácidos conservados incluyen los residuos E88, Y118, Q132, R161, D166 y E226 en la NDUFA10, que en la dCK humana forman el sitio de unión al nucleósido y el residuo E160 que en la dCK se ha inferido como el sitio activo aceptor de protones (Figura 10)⁷⁶. Sin embargo, a nivel general la identidad entre ambas proteínas es solamente del 27%.

TK2	125	QVSSVRLMERSIHSARYIFVENLYRSCKMPEVDYVVLSEWFDWILRN--MDVSVD
dCK	119	AEKPVLFERSVYSDRYIFASNLYESECNTEWTTIYQDWHDMNNOFGQSLIED
dGK	133	ARKPVQIFERSVYSDRYIFAKNLFENGSLSTIEWHIYQDWHSFLLWEFASRITLH
NDUFA10	153	TGQ-GVVLERSIFSD-FVFLEAMYNQGFIRKQCVDHYNEVKSVTIC---DYLPPH
DmdNK	96	TNKKLKIMERSIFSARYCFVENMRRNGSLEQGMYNLTLEEWYKFIEES--IHVQAD
DrTK2	92	MTAPLRMMERSIYSAKYIFVENLYKSGKMPFVDFAVLSEWFEWIKN--ISLPVD
DrdGK	125	RGGAVRVYERSVYSDRYIFALNMFALGCINSTEWAVYQDWHSFLEIQFGHRVQLE

Figura 10: Detalle del alineamiento de secuencias entre NDUFA10 y proteínas desoxirribonucleósido quinasa representativas. NDUFA10 comparte un alto porcentaje de identidad de secuencia con algunas quinasas de la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs, con quienes comparte aminoácidos altamente conservados esenciales para la actividad catalítica de la proteína (resultados Figura 58).

Por último, uno de los residuos fosforilados en la proteína es la serina 250 (S250). La fosforilación de este aminoácido resulta esencial para catalizar la reducción de la ubiquinona por parte del complejo I y se encuentra altamente conservada. Esta fosforilación depende (no está claro si directamente) de la serina/treonina quinasa mitocondrial PINK1. Se ha comprobado que mutaciones en PINK1 asociadas a Parkinson hereditario evitan la fosforilación de la S250 de NDUFA10, lo que se traduce en una reducción de la actividad del complejo I mitocondrial, que se ha asociado a la enfermedad⁷⁷.

Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha ninguna función adicional o catalítica para la subunidad NDUFA10 en el complejo I. Si bien se sabe que esta es una subunidad supernumeraria, cuya presencia es absolutamente esencial para el ensamblaje del complejo I y cuya pérdida conduce por tanto a una deficiencia global de complejo I mitocondrial⁴⁶.

3.2 Complejo II: Succinato Ubiquinona Oxidorreductasa

El complejo II (CII) o succinato ubiquinona oxidorreductasa (SDH) es un heterotetrámero que se localiza en la cara interna de la MMI. Es una enzima que forma parte del ciclo de Krebs y, por tanto, de la respiración aerobia. Cataliza la oxidación del succinato a fumarato acoplada a la reducción del FADH_2 a FAD, cuyos electrones son transferidos hasta la ubiquinona. El complejo II presenta dos particularidades respecto al resto de complejos: se encuentra íntegramente codificado por el nDNA y es el único complejo que no acopla la transferencia de electrones al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana⁷⁸.

3.3 Complejo III: Ubiquinol Citocromo c Oxidorreductasa.

El complejo III (CIII) es el encargado de catalizar la transferencia de electrones desde la ubiquinona reducida (ubiquinol) al citocromo c. El proceso se acopla a la translocación de cuatro protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana. Está anclado a la MMI y es un homodímero donde cada monómero está constituido por 11 subunidades, todas ellas codificadas por el nDNA excepto la subunidad MTCYB o citocromo b que está codificada en el mtDNA⁷⁹.

3.4 Complejo IV: citocromo c oxidasa.

El complejo IV (CIV) es el encargado de catalizar la oxidación del citocromo c, mediante la transferencia de 4 electrones, hasta el oxígeno molecular, para reducirlo y obtener agua. El proceso redox se acopla al bombeo de dos protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana⁷⁹.

3.5 Transportadores móviles de la cadena de transporte de electrones.

Existen dos transportadores móviles en la CTE: la ubiquinona y el citocromo c, que son los encargados de transferir los electrones que se liberan en cada complejo mitocondrial mediante cambios en su estado redox, lo que les permite desplazarse a través de la membrana lipídica.

La ubiquinona es la encargada de transportar los electrones liberados en los complejos I y II. Presenta tres estados redox definidos: oxidado (ubiquinona), parcialmente reducido (semiquinona) y reducido (ubiquinol)⁸⁰.

El citocromo c presenta la particularidad de ser una proteína multifuncional, implicada tanto en procesos de supervivencia como de muerte celular. Por un lado, lleva a cabo la transferencia de electrones desde el CIII al CIV y, por otro lado, interviene en el proceso apoptótico formando parte del apoptosoma (la liberación del citocromo c al citosol desencadena la activación de la vía intrínseca de apoptosis). También presenta capacidad antioxidante neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS)⁸¹.

3.6 Complejo V: ATP sintasa.

El complejo V o ATP sintasa se encarga de catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i aprovechando la energía que se libera del gradiente de protones que se ha ido generando durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Consta de dos dominios: Un dominio F_0 , que se encuentra anclado a la MMI y actúa como un canal de protones que se encarga de dirigir hacia la subunidad F_1 la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico de protones. Por su parte, la subunidad F_1 se localiza en la matriz mitocondrial y forma el centro catalítico del complejo V, en el que tiene lugar la fosforilación oxidativa propiamente dicha con la formación de ATP.

El complejo V presenta la particularidad de que puede actuar en sentido inverso, es decir, cuando el gradiente de protones a través de la membrana disminuye puede hidrolizar ATP para bombear protones al espacio intermembrana, contribuyendo así a mantener un potencial de membrana estable⁸⁰.

3.7 Adenina nucleótido translocasa.

La adenina nucleótido translocasa (ANT) es una proteína mitocondrial encargada de catalizar el intercambio de ADP por ATP a través de la MMI. Se encuentra acoplada a la actividad del complejo V, de manera que bombea ADP hacia el interior de la matriz y expulsa ATP generado por la ATP sintasa⁸².

3.8 Transportador de fosfato.

El transportador de fosfato participa en la importación de P_i desde el citoplasma celular hacia la matriz mitocondrial. Actúa de forma conjunta a la ANT, de modo que entre ambas permiten el intercambio de ADP y P_i desde el citoplasma, por el ATP desde la matriz mitocondrial. La ATP sintasa junto con la ANT y el transportador de fosfato forman lo que se conoce como el ATP sintasoma que hace mucho más eficiente la síntesis de ATP (Figura 11)⁸².

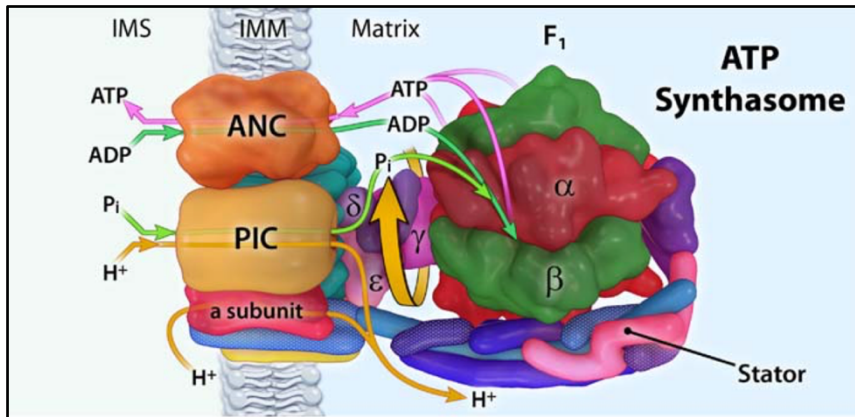


Figura 11: Estructura y función del ATP sintasoma mitocondrial (ATP sintasa / Transportador de P_i / ANT) y síntesis de ATP. PIC: Transportador de P_i; ANC: Adenina nucleótido translocasa. Los sitios catalíticos en el ATP sintasoma se encuentran en el dominio F₁ de la ATP sintasa, entre las subunidades α y β. Los sitios catalíticos están compuestos principalmente por residuos de aminoácidos en las subunidades β con una contribución menor de las subunidades α (Imagen obtenida de⁸²).

3.9 Organización supramolecular del sistema OXPHOS: supercomplejos.

La organización física que los complejos mitocondriales pueden adoptar en la CTE ha sido objeto de debate durante varios años, en los que se han ido postulando diferentes teorías que han tratado de dar respuesta a esta pregunta. En 1955, Chance y Williams propusieron el llamado “modelo de estado sólido”^{83,84}. En dicho modelo se postula que los complejos mitocondriales de la CTE adoptan una disposición de empaquetamiento ordenado y próximo entre sí, para garantizar la accesibilidad y la eficiencia en el transporte de electrones. Con el paso de los años este modelo fue desplazado por el denominado “modelo de estado fluido o de colisiones randomizadas”⁸⁵.

En este se asume que los diferentes complejos mitocondriales se encuentran flotando como elementos independientes en la MMI y, la transferencia de electrones se produciría mediante colisiones al azar y la acción de transportadores móviles. Sin embargo, este modelo ha sido altamente cuestionado durante las últimas décadas hasta que, en el año 2000, Schägger y colaboradores demostraron, mediante aproximaciones en *Blue Native Electrophoresis* (BN-PAGE), la organización supramolecular de los complejos respiratorios en los denominados “supercomplejos”⁸⁶, lo que demostraba la existencia de una asociación estable de los complejos mitocondriales que condujo a la reformulación del “modelo sólido”. Dicha asociación permite un transporte de electrones mucho más eficiente y, por tanto, una minimización de la producción de ROS.

Sin embargo, existe un modelo intermedio, propuesto por Acín-Perez y colaboradores, que es el modelo más aceptado actualmente, denominado “modelo de plasticidad”⁸⁷. Dicho modelo es una combinación de los dos modelos propuestos anteriormente. Según este, los complejos mitocondriales pueden encontrarse ensamblados en estructuras supramoleculares formando los supercomplejos o pueden encontrarse en forma libre e independiente, pudiendo alternar entre una organización y otra en función de los requerimientos metabólicos de la célula en cada momento y, generando con ello un rendimiento óptimo de la CTE en cada condición (Figura 12).

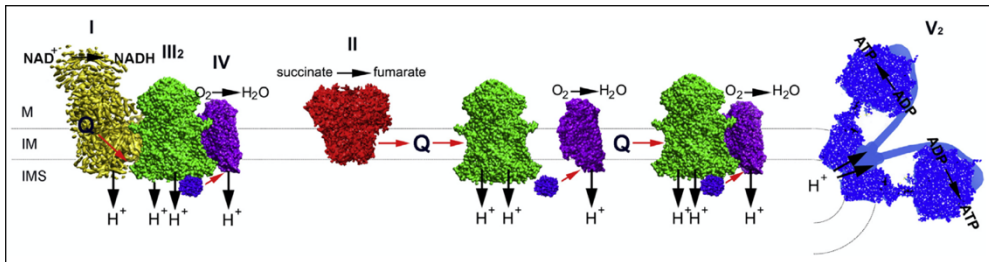


Figura 12: Modelo de plasticidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los complejos I-IV se organizan parcialmente en supercomplejos, excepto el complejo II. Las flechas rojas muestran las vías seguidas por los electrones. En amarillo, el complejo I (I); en rojo el complejo II (II); en verde el complejo III₂ (III₂); en púrpura el complejo IV (IV); en azul la ATP sintasa dimérica (V₂); en violeta el citocromo c; ubiquinol (Q). Se indican las posiciones de la matriz (M), el espacio intermembrana (IMS) y membrana interna (MI) (*Imagen obtenida de*⁸⁸).

Según su composición, todos los supercomplejos se pueden dividir en tres grandes grupos, formados en proporciones variables por los complejos I, III y IV: I + III₂; III₂ + IV₁₋₂; I + III₂ + IV₁₋₄. Es importante destacar que el complejo II es el único de los complejos que no se asocia en estructura supramolecular con otros complejos mitocondriales. A diferencia del resto de complejos mitocondriales, el complejo II no solo está implicado en la transferencia de electrones, sino que también forma parte directa del ciclo de Krebs, lo que podría explicar que este no se encuentre formando ningún supercomplejo. La asociación de una copia del complejo I con el complejo III en estado dimérico (III₂) (I + III₂) (Figura 12) es la combinación más abundante en plantas, donde entre el 90-100% del complejo IV se encuentra en forma monomérica independiente⁸⁹. La asociación del complejo III₂ con una o dos copias del complejo IV (IV₁₋₂) (III₂ + IV₁₋₂) (Figura 12) es la combinación más abundante en hongos, donde no se han encontrado formas monoméricas o diméricas libres de complejo IV, indicando que todo este se encuentra formando parte de supercomplejos⁹⁰.

Por último, el supercomplejo de mayor tamaño de la CTE es el formado por la asociación de una copia de complejo I con el complejo III₂ y de una a cuatro copias del complejo IV (IV₁₋₄) (I + III₂ + IV₁₋₄) (Figura 12)⁸⁶. Este supercomplejo recibe el nombre de respirasoma y es la forma más abundante en mamíferos. Se denomina respirasoma porque es el encargado de generar la mayor fuerza protón-motriz en presencia de una sola copia de citocromo c o ubiquinona. Mediante aproximaciones por *cryo-electron-microscopy* (cryo-EM) se ha demostrado que el complejo III₂ se asocia al arco del brazo de membrana del complejo I y que las copias variables de complejo IV se asocian a la punta del dominio NADH deshidrogenasa del complejo I⁹¹. Es destacable que en células humanas la práctica totalidad del CI se encuentra en forma de supercomplejo⁹², mientras que en tejidos de mamífero existe una proporción variable de CI libre⁹³.

Sin embargo, el papel fisiológico de estos supercomplejos en condiciones metabólicas normales o, incluso, su papel en ciertas patologías continúa siendo poco claro más allá de su papel como optimizadores de la función metabólica. Se ha postulado que la organización en supercomplejos puede prevenir la agregación aleatoria de las proteínas que forman cada complejo en la MMI⁹⁴. Además, los supercomplejos intervienen en el ensamblaje de los propios complejos mitocondriales, así como en el mantenimiento de la estabilidad de la CTE⁹⁵ y reducen la formación de ROS⁹⁶.

3.10 Control de la fosforilación oxidativa.

Existen muchas teorías que tratan de explicar los mecanismos que controlan la actividad OXPHOS en la mitocondria. Tradicionalmente se ha considerado que todas las reacciones de transferencia de electrones que tienen lugar en la CTE se encuentran en un estado próximo al equilibrio termodinámico, a

excepción de la actividad del complejo IV, sobre el cual recaería el control del flujo de respiración⁹⁷.

Por otro lado, también se ha propuesto que la proteína ANT puede funcionar en un estado lejano al equilibrio, de manera que esta estaría controlando la tasa final de consumo de oxígeno⁹⁸. Además, los cambios en el volumen mitocondrial podrían afectar a la CTE estimulando su actividad⁹⁹.

Finalmente, debido a las dificultades para establecer de forma clara qué factores son los encargados del control de la fosforilación oxidativa, Tager y colaboradores introdujeron el concepto del análisis del control metabólico en mitocondrias aisladas, mediante el empleo de inhibidores específicos del sistema OXPHOS y, establecieron que el control de la fosforilación oxidativa se puede repartir en varias etapas y que estas variarían en función de las necesidades metabólicas de la célula y, por tanto, de la velocidad de consumo de ATP¹⁰⁰. Según esto, en ausencia de consumo de ATP y, por tanto, de trabajo mitocondrial, la respiración estaría controlada por la entrada pasiva de protones a través de la MMI (*Proton Leak*) (estado 4 mitocondrial). Bajo estas condiciones la velocidad de respiración se adecua a la velocidad de pérdida del gradiente de protones por este *leak*, para mantener la fuerza protón-motriz necesaria para el funcionamiento de procesos biológicos básicos.

Cuando las condiciones metabólicas requieren el consumo de ATP y, por tanto, se demanda trabajo mitocondrial (estado 3 mitocondrial), se produce tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial, un aumento de la utilización de sustratos energéticos que conduce a un aumento del consumo de oxígeno por parte de la CTE y a un aumento en la síntesis de ATP. El transporte de ATP necesario a través de la membrana mitocondrial está mediado por la ANT, cuya actividad depende del cociente ATP/ADP y del potencial de membrana.

De esta forma, cuando la célula está hidrolizando ATP, el cociente ATP/ADP disminuye, lo que favorece el intercambio del ATP mitocondrial por ADP y P_i citoplasmáticos por parte de la ANT.

Esto provoca un aumento de la actividad de la ATP sintasa, lo que provoca la disminución de la fuerza protón-motriz, a consecuencia del aumento de la síntesis de ATP. Esta disminución estimula la actividad de la CTE para mantener el potencial de membrana mitocondrial, lo que a su vez estimula la oxidación del NADH mitocondrial.

Por lo tanto, en una célula que se encuentre en un estado mitocondrial intermedio entre la situación 3 y 4, la fosforilación oxidativa dependerá de la velocidad de hidrólisis de ATP, de la actividad de la ANT, de la disponibilidad de sustratos reducidos en la CTE y del *leak* en la MMI.

3.11 Alteraciones en el rendimiento del sistema OXPHOS

3.11.1 Desacoplamiento y potencial de membrana mitocondrial.

La transferencia de electrones en la CTE se acopla al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, lo que genera un gradiente protón-motriz a través de la membrana que es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis de ATP. En esta situación, se dice que existe un acoplamiento entre la CTE y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, cuando toda esta fuerza protón-motriz no se transforma en ATP por parte de la ATP sintasa, se dice que existe un cierto grado de desacoplamiento mitocondrial. En esta situación de desacoplamiento, la CTE se acelerará para compensar la pérdida de la fuerza protón-motriz y, por consiguiente, del potencial de membrana mitocondrial, pero este incremento de velocidad de la CTE no estará asociado a la síntesis de ATP¹⁰¹.

De manera fisiológica el desacoplamiento mitocondrial puede ocurrir por tres vías diferentes: *proton leak*, *electron leak* o *electron slip*. En el *proton leak*, los protones que se han bombeado hacia el espacio intermembrana, durante el transporte de electrones, difunden de forma pasiva a través de la MMI. Esto provoca una pérdida de la fuerza protón-motriz y obliga a la CTE a acelerarse para compensarla. Este proceso depende fundamentalmente de la composición de la MMI y puede representar entre un 30-50% de la tasa metabólica celular en reposo (Figura 13 izquierda)¹⁰². En segundo lugar, el *electron leak* hace referencia al filtrado o escape de electrones desde la CTE. En consecuencia, el oxígeno molecular se reduce de forma incompleta y se generan radicales como el O_2^- o el radical hidroxilo (HO_2^-) (Figura 114 derecha). Por último, el *proton slip* hace referencia al transporte de electrones a través de los complejos de la CTE sin el bombeo de protones acoplado a este¹⁰². Todas estas circunstancias provocan alteraciones en la fuerza protón-motriz y, con ello, de la fosforilación oxidativa.

Por otro lado, el desacoplamiento mitocondrial puede ocurrir por medio de la acción de desacoplantes químicos o por la acción de proteínas específicas. En cuanto a los desacoplantes químicos, a diferencia de los inhibidores de los complejos mitocondriales, provocan un descenso de la fuerza protón-motriz que se compensa con un aumento de la tasa de respiración y, por tanto, de la velocidad de transporte de electrones en la CTE. Los desacoplantes químicos más utilizados son el dinitrofenol (DNP) o la carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP). Ambos son agentes protonóforos que atraviesan la MMI y forman un “poro” que permite el escape de los protones y, por tanto, disipan el potencial de membrana mitocondrial, de tal forma que fuerzan a que la CTE se acelere hasta su máxima capacidad para compensar la abrupta pérdida del potencial. Además, un exceso de estos agentes puede conllevar finalmente la inhibición de la CTE debido a su capacidad para insertarse en la MMI¹⁰³.

En lo relativo a proteínas desacoplates, conocemos la labor esencial que con su actividad disipadora del gradiente de protones juega UCP1 (proteína desacoplante 1) en la regulación de la termogénesis adaptativa en mitocondrias de tejido adiposo marrón de mamíferos¹⁰⁴.

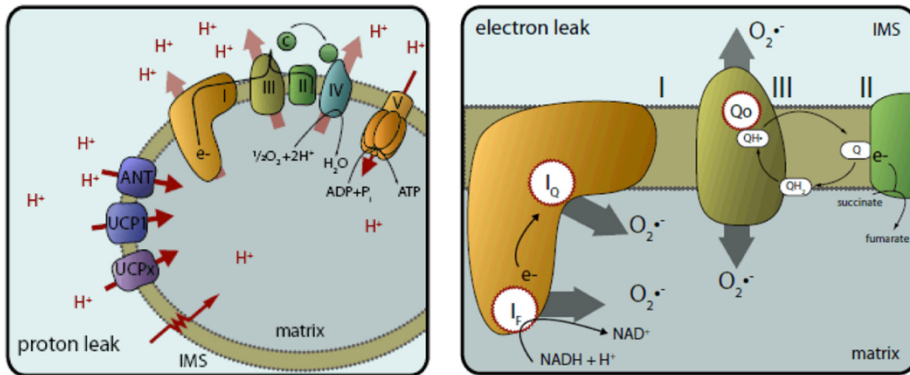


Figura 13: Representación esquemática del *proton leak* (izquierda) y *electron leak* (derecha). Los protones (H^+) se bombean hacia el espacio intermembrana estableciendo una fuerza protón-motriz, que se acopla a la reentrada de los H^+ hacia la matriz para generar la energía que se acopla a la síntesis de ATP. Todos los demás medios de reentrada constituyen una fuga de H^+ , ya que el potencial de membrana mitocondrial derivado de la oxidación de sustratos se agota sin catalizar la síntesis de ATP. Los mecanismos de fuga de H^+ incluyen el paso directo a través de la membrana de fosfolípidos, la difusión a través o alrededor de proteínas integrales de la membrana, o el transporte inducible a través de la ANT o las proteínas de desacoplamiento (como UCP1). En el caso del *electron leak*, los electrones transportados por el NADH se transfieren al sitio del mononucleótido de flavina (I_F) en el complejo I, donde normalmente pasan por una cadena de centros de Fe-S hasta llegar a la ubiquinona (I_Q). Tanto en el sitio I_F como en el I_Q , estos electrones pueden “fugarse” y reaccionar con O_2 , reduciéndolo parcialmente hasta O_2^- dentro de la matriz. En el complejo III, el sitio QH_2 se une al sitio Q_0 , donde los electrones pueden evitar su transferencia normal hacia el ciclo Q y reaccionar directamente con el O_2 para formar O_2^- que se libera a ambos lados de la MMI (Imagen obtenida de¹⁰²).

3.11.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La mitocondria constituye la principal fuente de ROS celular. Se estima que, en condiciones fisiológicas, el 0,2-2% de los electrones que se liberan durante la oxidación de los sustratos energéticos en la CTE no siguen el orden de transferencia normal, sino que “escapan” (*electron leak*) de la CTE e interactúan con el oxígeno molecular para reducirlo parcialmente hasta anión superóxido (O_2^-) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 14)¹⁰⁵. Se han identificado un total de 11 sitios asociados a la CTE que pueden producir ROS en las mitocondrias¹⁰⁶. El complejo I y, en menor medida, el complejo III se consideran los principales puntos de producción de ROS en mitocondria.

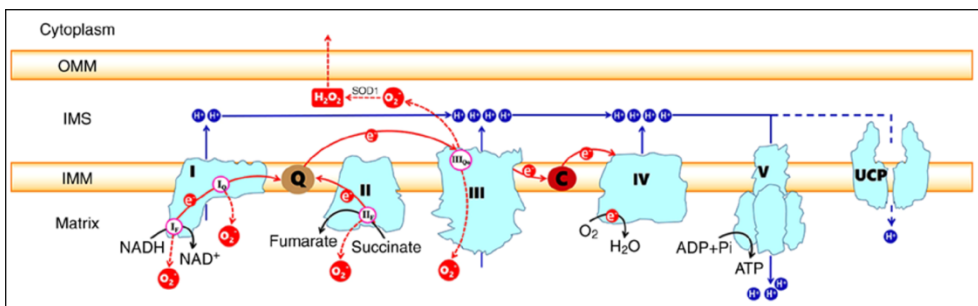


Figura 14: Generación de fugas de electrones y fugas de protones en la cadena de transporte de electrones. Se indican los sitios de producción de superóxido en cada complejo, incluidos los sitios I_F y I_Q en el CI y el sitio III_{O_o} en el CIII. La formación de superóxido en los sitios II_F del CII resulta prácticamente marginal. El O₂ que se libera al IMS por el sitio III_{O_o} puede convertirse en H₂O₂ en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa 1 y difundir hacia el citoplasma. Las flechas rojas indican las rutas de los electrones. Las flechas negras representan reacciones del sustrato. Las flechas azules muestran el circuito de protones a través del IMM. En cian, los complejos I-V están marcados como I, II, III, IV, V, respectivamente. Q: ubiquinona; c: citocromo c; IMM: membrana mitocondrial interna; IMS: espacio intermembrana; OMM: membrana mitocondrial externa; UCP: proteína desacoplante (*Imagen obtenida de*¹⁰⁷).

En el complejo I, la producción de ROS tiene lugar en la matriz mitocondrial en los sitios I_F (sitio del FMN) y en el sitio I_Q (lugar de unión a ubiquinona) durante el proceso de transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona (Figura 14). La rotenona actúa como un inhibidor del complejo I por su capacidad de unirse al sitio I_Q y bloquear la transferencia de electrones hasta la ubiquinona, con el consiguiente incremento de ROS¹⁰⁷.

El complejo III es responsable de producir una pequeña cantidad de las ROS mitocondriales en comparación con el complejo I. El complejo III se encarga de transferir electrones a través del ciclo Q. Este es un proceso en el cual, la ubisemiquinona (QH⁻) del sitio Q_O, que transporta un único electrón, puede moverse libremente en el complejo III y filtrar el electrón que transporta hasta el oxígeno molecular produciendo O₂⁻, que luego puede convertirse en H₂O₂. En este caso, las ROS que se forman se pueden liberar tanto a la matriz mitocondrial como al espacio intermembrana (Figura 14)¹⁰⁸. La antimicina A es un inhibidor del complejo III que puede bloquear de forma específica el sitio Q_i del complejo, lo que resulta en el bloqueo de los electrones del QH⁻ en el sitio Q_O, haciéndolos propensos a reaccionar con el oxígeno molecular y estimulando, por tanto, la producción de ROS¹⁰⁹.

4. Metabolismo de nucleótidos.

4.1 Compartimentalización de nucleótidos en la célula.

Los nucleótidos constituyen la unidad estructural básica del DNA y el RNA, siendo los monómeros a partir de los cuales se construye la información genética en la célula. Como tal, resultan esenciales para la replicación, transcripción y reparación del genoma, tanto nuclear como mitocondrial.

Los nucleósidos están formados por una base nitrogenada y una pentosa. La base nitrogenada puede ser una purina ((adenina (A) o guanina (G)) o una pirimidina (citosina (C), timina (T) o uracilo (U)). La pentosa puede ser una ribosa, en el caso del RNA (b-D-ribofuranosa) o una desoxirribosa en el caso del DNA (b-D-desoxirribofuranosa). La unión entre ambas se establece mediante un enlace N-glicosídico entre el carbono 1' de la ribosa y uno de los nitrógenos presentes en la base nitrogenada (el N1 en las pirimidinas o el N9 en las purinas) con la consiguiente pérdida de una molécula de agua (Figura 15). Los ribo- o desoxi-ribonucleótidos resultantes están formados por la unión de un nucleósido con un ácido fosfórico mediante enlace fosfodiéster con el grupo hidroxilo en posición 5' de la pentosa (Figura 15). En función del grado de fosforilación se obtendrán nucleósidos mono-, di- o trifosfato. De todos ellos, son los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) los que actúan como sustratos para la síntesis de DNA.

La célula presenta dos *pools* de dNTPs compartimentados e interconectados entre sí: el *pool* citosólico y el mitocondrial. Para la célula resulta esencial mantener un *pool* de dNTPs en ambos compartimentos para asegurar el correcto mantenimiento y replicación de ambos genomas. Por tanto, la composición de estos *pools* se encuentra estrictamente regulada. En base a esto, la tasa de síntesis de dNTPs dependerá de las necesidades celulares de replicación del DNA, que a diferencia de lo que sucede con el mtDNA, está

limitada a la fase S del ciclo celular. Durante esta fase el *pool* de dNTPs celulares aumenta unas 10 veces respecto al contenido fuera de la fase de división¹¹⁰.

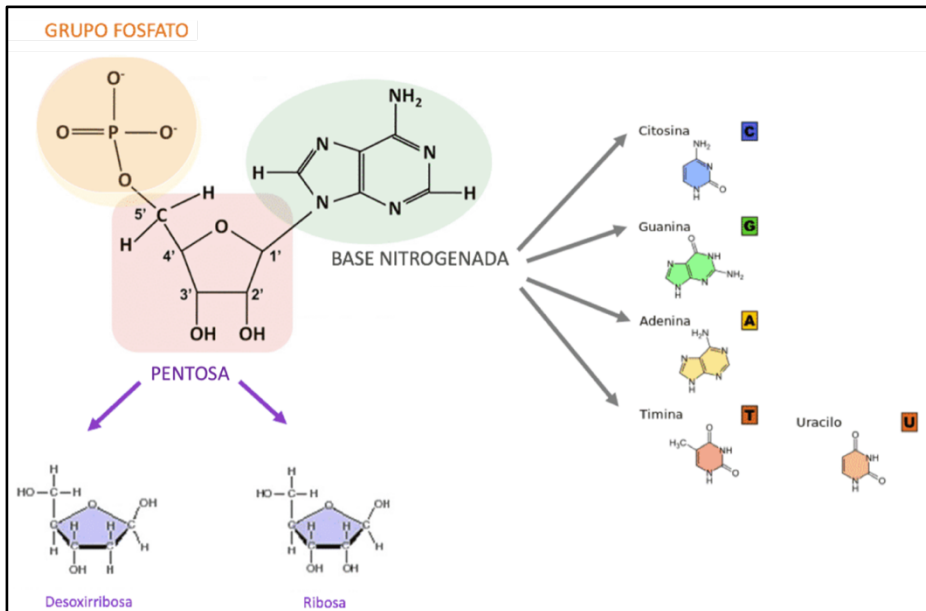


Figura 15: Composición de un nucleótido. El nucleótido se compone de una base nitrogenada, una pentosa y, como mínimo, un grupo fosfato. En función del grado de fosforilación se obtienen los nucleósidos mono-, di-, o trifosfato. En el caso del RNA la pentosa es la ribosa, mientras que en el caso del DNA es la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas pueden ser purinas (Adenina (A) y Guanina (G)) o pirimidinas (Citosina (C), Timina (T) y Uracilo (U)). El U forma parte exclusivamente del RNA y la T solo se encuentra en el DNA.

4.2 Síntesis de dNTPs.

La célula dispone de dos vías diferentes para la obtención de dNTPs: la vía de salvamento o la vía de síntesis *de novo*. La ruta *de novo* tiene lugar exclusivamente en el citoplasma y se encuentra regulada por el ciclo celular, operando principalmente durante la fase S del ciclo y, disminuyendo drásticamente en células quiescentes. En esta vía, la síntesis de dNTPs se produce a partir de moléculas orgánicas simples (CO₂, bicarbonato, aminoácidos...) y con consumo de ATP. En cambio, la ruta de salvamento tiene lugar tanto en el citosol como en la mitocondria y se mantiene activa (aunque con matices) en células quiescentes. En esta, se aprovechan los productos orgánicos obtenidos de la dieta y la degradación de ácidos nucleicos para obtener dNTPs¹¹¹.

Para mantener la tasa de replicación del mtDNA la mitocondria necesita mantener su propio *pool* de dNTPs. Como se mencionó anteriormente, dentro de la mitocondria no tiene lugar la ruta *de novo*. Para mantener su propio *pool*, la mitocondria depende de la síntesis a través de la ruta de salvamento mitocondrial (Figura 16) que incorpora desoxirribonucleósidos a partir de transportadores especializados como ENT1, que se ha encontrado en la membrana mitocondrial. Además, la mitocondria puede importar nucleótidos del citosol, a través de transportadores específicos, hacia la matriz mitocondrial (Figura 16)^{112,113}. Aunque existen evidencias experimentales de dicho transporte no está clara la identidad de los transportadores específicos responsables¹¹⁴⁻¹¹⁶.

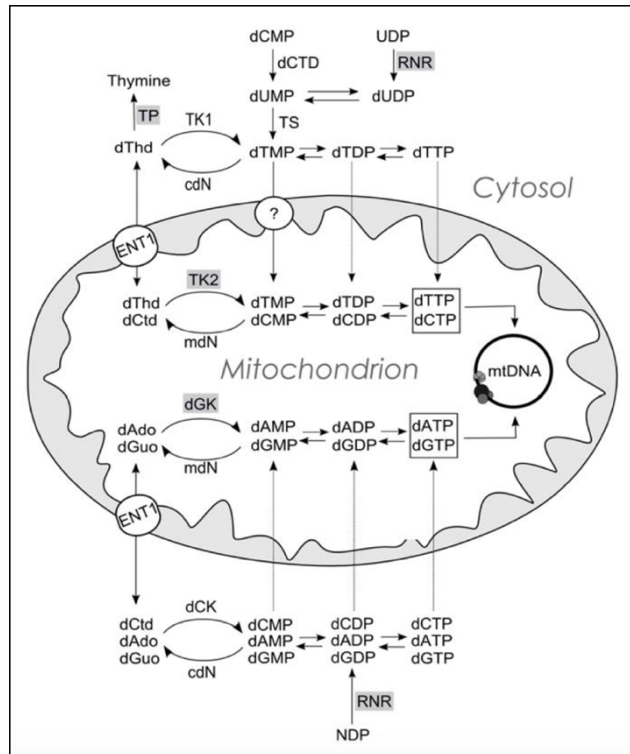


Figura 16: Representación esquemática de las vías metabólicas que suministran dNTPs para la replicación del mtDNA. dThd: timidina; dCtd: desoxicitidina; dAdo: desoxiadenosina; dGuo: desoxiguanosina; TP: timidina fosforilasa; Timidina quinasa TK1 (citosólica) y TK2 (mitocondrial); dGK: desoxiguanosina quinasa; dCK: desoxicitidina quinasa; cdN y mdN: desoxirribonucleotidasas citosólicas y mitocondriales; dCTD: dCMP desaminasa; TS timidilato sintasa; RNR: ribonucleótido reductasa. ENT1: transportador equilibrativo de nucleósidos 1. El círculo con un signo de interrogación indica transportadores no caracterizados en el momento de la publicación, pero de cuya existencia había evidencias experimentales^{115,116} (Imagen obtenida de¹¹⁷).

4.2.1 Ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs.

La ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs se basa en el reciclaje de desoxirribonucleósidos (dNs), preexistentes para sintetizar los correspondientes dNTPs.

Para el salvamento de los dNs se llevan a cabo reacciones secuenciales de fosforilación del dN hasta obtener el correspondiente trifosfato (dNTP). El paso limitante de esta vía es la primera reacción de fosforilación que está regulada por los ciclos de sustrato que dependen de la actividad de las enzimas desoxirribonucleósido quinasas (dNKs) y 5'-nucleotidasas (5'-N). Las dNKs catalizan la transferencia de un grupo fosfato procedente del ATP u otro ribonucleótido trifosfato (rNTP), hasta sintetizar el correspondiente dNTP, mientras que las 5'-N catalizan la escisión mediante hidrólisis del grupo fosfato en posición 5' del correspondiente dNMP. En humanos existen 4 dNKs con diferente localización subcelular: dos enzimas con localización citoplasmática, la desoxicitidina quinasa (dCK) y la timidina quinasa 1 (TK1) y, dos enzimas con localización en la matriz mitocondrial, la desoxiguanosina quinasa (dGK) y la timidina quinasa 2 (TK2). La acción combinada de ambas enzimas, en cada uno de los compartimentos, cataliza la primera fosforilación de cada uno de los cuatro dNs para obtener el correspondiente dNMP (Figura 17)¹¹⁸. Esta primera fosforilación controla el flujo de la ruta y sus fosforilaciones sucesivas.

La segunda fosforilación está catalizada por las enzimas nucleósido monofosfato quinasas (NMPKs) (Figura 17). En el citosol la UMP/CMP quinasa cataliza la fosforilación de los nucleótidos de pirimidina y, la guanilato quinasa y adenilato quinasa, catalizan la fosforilación de los nucleótidos de purina. Las tres catalizan la fosforilación del dNMP al correspondiente dNDP¹¹⁹. En la matriz mitocondrial esta segunda fosforilación está mediada por la UMP/CMP quinasa 2 que cataliza la fosforilación del dUMP y dCMP a dUDP y dCDP respectivamente y, por las adenilato quinasa 2/3/4 (AK2/3/4), que catalizan la fosforilación del dGMP y dAMP a dGDP y dADP respectivamente. No se ha identificado, a día de hoy, la proteína responsable de la fosforilación del dTMP a dTDP en mitocondria¹²⁰.

La tercera y última reacción de fosforilación está catalizada por las nucleósido difosfato quinatas (NDPKs) citoplasmáticas y mitocondriales. En el caso de la NDPK mitocondrial, esta forma un complejo con la succinil-CoA ligasa (SUCL) y la gamma-aminobutirato transferasa (GABAT) (Figura 17)^{121,122}.

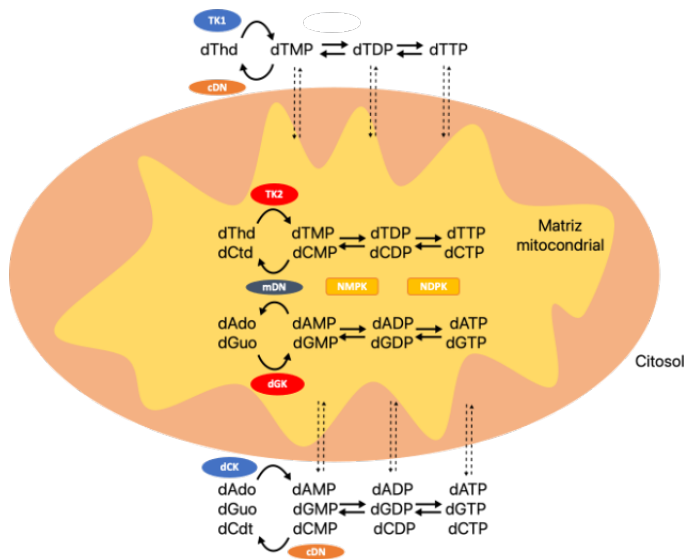


Figura 17: Representación de las vías metabólicas de salvamento de desoxirribonucleósidos (dNs) citoplasmática y mitocondrial y sus principales enzimas. dThd: timidina; dCtd: desoxicitidina; dAdo: desoxiadenosina; dGuo: desoxiguanosina; TK1: timidina quinasa 1; TK2: timidina quinasa 2; dGK: desoxiguanosina quinasa; dCK: desoxicitidina quinasa; NMPK: nucleósido monofosfato quinasa; NDPK: nucleósido difosfato quinasa; cDN: nucleotidasa citosólica; mDN: nucleotidasa mitocondrial; Las flechas de puntos representan transportadores de nucleótidos que permiten el intercambio mitocondria/citosol.

4.2.1.1 Desoxirribonucleósido quinasas (dNKs) implicadas en el salvamento de dNTPs.

Las dNKs pueden dividirse en dos grupos diferentes basándose en sus secuencias de aminoácidos y homología estructural: TK1-similar y TK1-no-similar¹²³. Como se ha mencionado anteriormente, los mamíferos poseen cuatro dNKs con diferente localización celular y especificidad de sustrato. A nivel mitocondrial, la ruta de salvamento de dNs está mediada por la actividad de la TK2 y la dGK. La TK2 es un homodímero formado por dos subunidades de 29 kDa que participa en la recuperación de los nucleótidos de pirimidina. En concreto, cataliza la primera fosforilación de la timidina (dThd) y la desoxicitidina (dCtd) para obtener dTMP y dCMP respectivamente¹²⁴. Por otro lado, la dGK participa en la recuperación de las purinas, catalizando el primer paso de fosforilación de la desoxiguanosina (dGuo) y la desoxiadenosina (dAdo) para obtener dGMP y dAMP respectivamente (Figura 18). La dGK también es un homodímero formado por dos subunidades de 30 kDa¹²⁵.

A nivel citosólico, la primera fosforilación de la ruta de salvamento de purinas y pirimidinas está mediada por dos proteínas homólogas a las dNKs mitocondriales: la TK1 y la dCK. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con la TK2 mitocondrial, la TK1 citoplasmática únicamente cataliza la fosforilación de la dThd y la desoxiuridina (dUrd) a dTMP y dUMP respectivamente. Esta preferencia de sustrato la convierte en la dNK con mayor especificidad. Se trata de un homodímero u homotetrámero formado por subunidades de 24 kDa¹²⁶. La otra dNK citoplasmática es la dCK. Esta tiene como sustrato preferente la dCtd, pero también cataliza la primera fosforilación de nucleósidos de purina (dAdo y dGuo) para obtener dAMP, dGMP y dCMP respectivamente. Se trata de un homodímero formado por dos subunidades de 261 aminoácidos (Figura 17)¹²⁷.

Mientras que la dCK, TK2 y dGK se expresan de manera constitutiva durante todo el ciclo celular, la expresión de la TK1 se encuentra fuertemente regulada. Su expresión se incrementa coincidiendo con el incremento de síntesis de DNA durante la fase G1/S y se degrada durante la fase G2/M por el complejo APC/C mediante marcaje en su extremo C-terminal¹²⁸. Además, la TK1 tiene un origen evolutivo distinto a TK2, dCK y dGK que se engloban en la familia TK2, TK1-no-similar¹²⁹.

Las dNKs de la familia TK1-similar presentan mayor similitud estructural con la familia RecA-F₁ ATPasas que con otras dNKs y, debido al estrecho sitio de unión al sustrato, únicamente pueden fosforilar la dThd y dUrd^{123,130}. Cabe recalcar que la dNK presente en *D. Melanogaster* se engloba dentro de la familia TK1-no-similar y presenta capacidad para fosforilar todos los dNs. Sin embargo, las dNKs TK1-no-similar tienen especificidades de sustrato más amplias y son más similares a la timidilato sintasa (TS), que en el caso de las TK1-similar¹³¹. Todo ello ha llevado a la hipótesis de que, evolutivamente, el primer eucariota presentaba una enzima de la familia TK1-similar y una enzima TK1-no-similar, siendo esta última la progenitora de las quinasas presentes en los mamíferos modernos y responsable de la especialización que habría ocurrido a través de eventos de duplicación durante la evolución¹²³.

4.2.1.1.1 Estructura de las dNKs TK1-similar.

Presentan estructura en forma de tetrámeros consistente en dos dímeros con dos interfaces proteína-proteína diferentes. Cada monómero está formado por dos dominios que encierran entre ellos el sitio activo. Presentan un gran dominio α/β formado por una lamina β paralela de seis hebras entre una larga α ($\alpha 1$), junto con un *loop* flexible a un lado y tres hélices más cortas al otro lado. Presentan un sitio de unión a fosfato altamente conservado

denominado *P-loop* (secuencia consenso GX4GKS/T), localizado en la unión entre α 1/ β 1. Este está también presente en las dNKs TK1-no-similares. Sin embargo, pese a presentar este *P-loop* de unión a fosfato, el dominio α / β que presentan es más similar al dominio de unión al ATP en las proteínas de la familia RecA-F₁ ATPasas. También presentan un pequeño dominio, denominado *lasso loop*, rodeando el *P-loop*. El sustrato se une con la base hacia un sitio profundo de unión hidrofóbico localizado entre el dominio α / β y el *lasso loop*. Todos los grupos polares de la base de timina forman puentes de hidrógeno con los átomos de la cadena principal, lo que, junto con un sitio de unión muy estrecho, es responsable de la elevada especificidad de sustrato en las dNKs TK1-similar. Por último, el sitio donador de fosfato se encuentra expuesto y asociado al *P-loop* y a un ion magnesio¹²⁹.

4.2.1.1.2 Estructura de las dNKs TK1-no-similar.

Se trata de proteínas diméricas en las que cada monómero está formado por una lámina β central de cinco hebras rodeada por 8-10 α hélices (Figura 19). El dominio *P-loop*, se encuentra ubicado en el giro tras β -1. Este, junto con el motivo ERS (glutámico-arginina-serina) y la región LID (región rica en arginina que presenta la secuencia consenso RXXRXRXE, localizada entre α -7 u α -8) es el responsable de la unión e interacción con el donador de fosfato. El sitio de unión al sustrato contiene una serie de residuos muy conservados que interaccionan a través de puentes de hidrógeno con el sustrato en cuestión. En concreto, un residuo de glutamina interacciona con la base del sustrato, una pareja glutamato-tirosina se une al 3'-OH de la desoxirribosa y una pareja glutamato-arginina se une al 5'-OH¹²⁹.

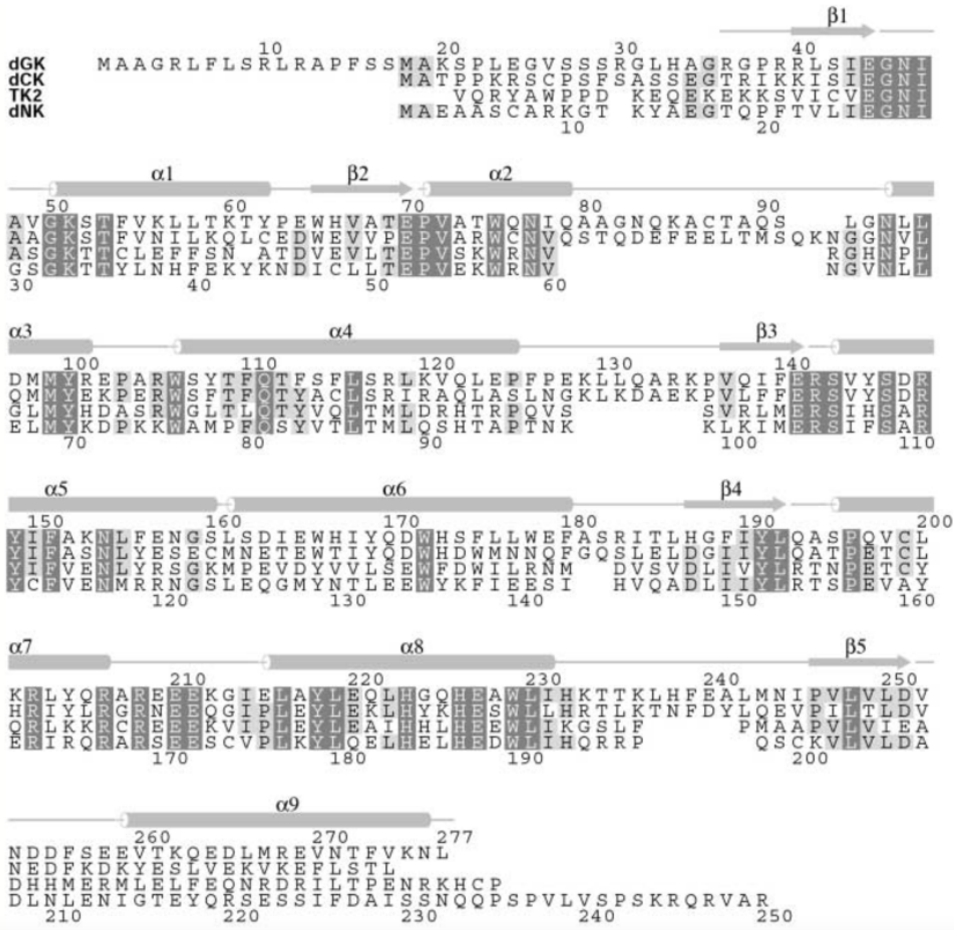


Figura 18: Alineamiento de secuencias de las proteínas dNK TK1-no similar(dCK-dGK-TK2). Se muestran las secuencias de las proteínas humanas para dGK, dCK y TK2, y la secuencia de la dNK de *D. melanogaster* (DmdNK). Los números situados en la parte superior se refieren a las secuencias de dGK y los de la parte inferior a la secuencia de dNK (DmdNK). La correspondencia con la estructura secundaria se indica en la parte superior. Los campos negros representan residuos idénticos en las cuatro secuencias y los campos sombreados representan residuos idénticos en tres de ellas (Imagen obtenida de¹¹⁸)

4.2.1.2 Inhibición por retroalimentación negativa.

La gran mayoría de las dNKs se encuentran reguladas mediante retroalimentación negativa por el producto final de síntesis y, generalmente, el inhibidor más potente es la forma trifosfato del sustrato de preferencia (dNTP)¹³². Por ejemplo, en el caso de la dCK, el producto inmediato es el dCMP que se fosforila secuencialmente hasta el producto final, el dCTP, que actúa como un análogo del sustrato. De esta forma el grupo trifosfato se dispone en el sitio donador de fosfato de la enzima y la base de dCtd solapa sobre el sitio de unión al dN de manera altamente específica inhibiendo de forma competitiva al enzima. Algo similar sucede con la dGK con el dGTP y con el resto de dNKs de la familia TK1-no-similar¹¹⁸.

4.2.2 Ruta *de novo* para la síntesis de dNTPs.

La síntesis *de novo* de dNTPs tiene lugar gracias a la acción de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), que cataliza la reducción de los ribonucleósidos difosfato (rNDP), tanto de purina como de pirimidina, para obtener la correspondiente forma desoxi- (dNDP)¹³³. La RNR es un heterotetrámero constituido por dos dímeros de la subunidad larga (R1) y dos dímeros de la subunidad pequeña, que presenta dos isoformas (R2 o p53R2). La subunidad R1 presenta una vida media larga y su expresión es constante durante todo el ciclo celular. Sin embargo, la subunidad R2 contiene en su secuencia de aminoácidos una señal que la marca para degradación dependiente del proteasoma durante la fase final de la mitosis. En consecuencia, sus niveles máximos de expresión se alcanzan al final de la fase S, por lo que es la subunidad limitante para la actividad de la proteína¹³³. Hasta el descubrimiento de la subunidad p53R2, se creía que la síntesis *de novo* de dNTPs ocurría de forma exclusiva en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de p53R2 está

desprovista de la señal de degradación dependiente del proteasoma y puede ser detectada durante todas las fases del ciclo celular, de tal forma que la asociación R1/p53R2 genera una RNR activa que puede mediar la síntesis de dNTPs en células quiescentes. No obstante, el nivel absoluto de esta síntesis es extremadamente bajo en comparación con la síntesis que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular¹¹⁰. Pese a ello, esta síntesis resulta esencial, pues se ha demostrado que mutaciones en p53R2 causan depleción del mtDNA, lo que evidencia que la síntesis de mtDNA en células quiescentes depende en cierta medida de la síntesis de dNTPs citosólica *de novo*¹³⁴.

El dTMP se obtiene a través de la metilación de dUMP, generado a partir de la reducción de UDP por la RNR, mediante una reacción catalizada por la timidilato sintasa (TS). Finalmente, el dTMP es fosforilado por la acción secuencial de la timidina monofosfato quinasa (TMPK) y NDPK hasta obtener dTTP¹³⁵ (Figura 21).

Tradicionalmente se ha descrito la síntesis *de novo* de dNTPs como una ruta exclusivamente citosólica. Sin embargo, existen varios estudios que describen la existencia de una ruta de síntesis *de novo* mitocondrial. Se ha descrito la existencia de actividad RNR asociada a mitocondrias aisladas en células HeLa y en hígado de rata, ratón y cerdo. Concretamente se ha purificado la subunidad R1 asociada a mitocondrias aisladas¹³⁶. También se ha descrito la síntesis *de novo* de dTMP asociada a mitocondria, por una vía que involucraría la actividad timidilato sintasa (TYMS), dihidrofolato reductasa (DHFR1) y serinahidroximetil transferasa (SHMT2)¹³⁷. Sin embargo, otros autores no han corroborado la existencia de estas enzimas en mitocondria^{111,138} y esta hipótesis continúa siendo controvertida.

4.2.2.1 Rutas de síntesis de ribonucleótidos

Como hemos visto, los ribonucleótidos son una fuente de generación de dNTPs gracias a la acción de la RNR, sobre todo durante la división celular. Tal y como sucede en el caso de los dNTPs, los ribonucleótidos pueden obtenerse a través de rutas de salvamento y *de novo* que podemos distinguir según sean fuente de ribonucleótidos de purina o pirimidina.

4.2.2.1.1 Ruta de salvamento.

La ruta de salvamento de nucleobases consiste en la generación del nucleósido monofosfato mediante la transferencia de un grupo fosforribosil pirofosfato (PRPP). Existen dos enzimas implicadas en estas reacciones de transferencia: la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), que utiliza como sustratos la guanina y la hipoxantina para sintetizar GMP e IMP respectivamente, y la adenina fosforribosil transferasa (APRT), que utiliza como sustrato la adenina para catalizar la síntesis de AMP (Figura 19). Dado que la ruta de salvamento de purinas depende más de reacciones de fosforilación que la de las pirimidinas, este tipo de reacciones de transferencia de un PRPP son mucho más relevantes en la ruta de salvamento de las purinas¹³⁹.

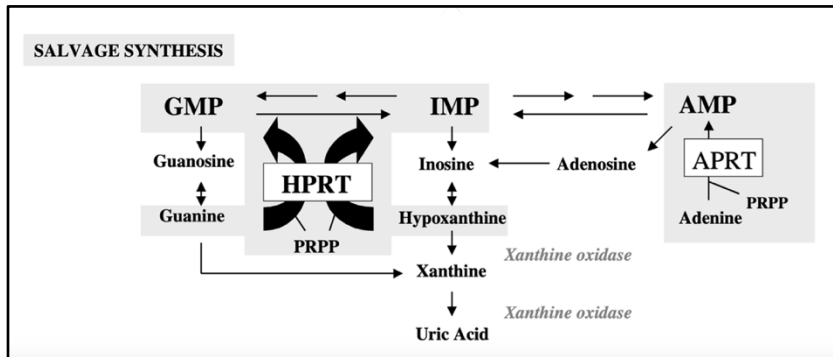


Figura 19: Ruta metabólica de salvamento de purinas mediada por hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) y adenina fosforribosil transferasa (APRT). HPRT cataliza el rescate de la inosina monofosfato (IMP) y la guanosina monofosfato (GMP) a partir de las nucleobases hipoxantina y guanina respectivamente, utilizando PRPP como sustrato. El defecto de HPRT resulta en la acumulación de sus sustratos, hipoxantina y guanina, que se convierten en ácido úrico como producto final por medio de la xantina oxidasa. La actividad elevada de APRT también puede contribuir a la sobreproducción de purinas (*Imagen obtenida de*¹³⁹).

4.2.2.1.2. Rutas de síntesis de novo.

En la ruta *de novo* la síntesis tiene lugar a partir de moléculas orgánicas sencillas procedentes del metabolismo celular. Es una ruta más costosa a nivel energético que la ruta de salvamento y tiene lugar principalmente durante la fase S del ciclo celular. La síntesis de las bases de purina se lleva a cabo de forma secuencial sobre una molécula de fosforribosil pirofosfato (PRPP), mientras que en la ruta de síntesis de las pirimidinas se sintetiza primero la base y después se incorpora el anillo de ribosa. En el caso de la síntesis de purinas se obtiene como producto final IMP y, en el caso de las pirimidinas se obtiene UMP, que luego sufren diversas reacciones para obtener el resto de nucleótidos¹⁴⁰.

4.2.2.1.3. Síntesis de purinas y pirimidinas.

En condiciones fisiológicas normales, la mayor parte de las reservas celulares de purinas se obtienen mediante el reciclado de bases degradadas a través de la ruta de salvamento. Sin embargo, cuando las necesidades celulares de purinas aumentan (fase S del ciclo celular) se produce una regulación al alza de la ruta *de novo* para satisfacer estos requerimientos celulares¹⁴¹. Esta síntesis *de novo* tiene lugar íntegramente en el citoplasma celular. Se lleva a cabo mediante diez reacciones enzimáticas catalizadas por seis enzimas diferentes y el anillo de la purina se genera directamente sobre el PRPP, obteniéndose IMP como producto final de la vía y sobre el cual se generan los demás nucleótidos.

La primera reacción en la ruta *de novo* de purina es la conversión del PRPP en 5-fosforribosilamina (PRA) por la enzima PRPP amidotransferasa (PPAT) y, se cree que esta es la reacción limitante para la velocidad de la vía. A continuación se concatenan una serie de reacciones en las que intervienen varias enzimas (fosforribosilglicinamida sintetasa (GART), formilglicinamida sintasa (PFAS), formilglicinamida ribonucleótido ciclasa (FGAMS) fosforribosil aminoimidazol carboxilasa bifuncional (CAIRS), fosforribosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa (SAICARS), adenilosuccinato liasa (ADSL), AICAR formiltransferasa (AICART) e IMP ciclohidrolasa (ATIC)) hasta la conversión del aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR) a IMP. Finalmente, el IMP generado se convierte en el resto de los nucleótidos de purina a través de dos reacciones catalizadas por las enzimas inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) y guanosina monofosfato sintetasa (GMPS) en el caso del GMP y, por la acción de la adenosilsuccinato sintetasa (ADSS) y adenilosuccinato liasa (ADSL) para obtener AMP.

Una gran cantidad de las enzimas que forman parte de las rutas *de novo* se disponen en estructuras supramoleculares más complejas que son determinantes para su actividad (GART forma dímeros, PAICS octámeros, etc)¹⁴². Además, las enzimas implicadas en el proceso de síntesis se agrupan formando un complejo multiproteico de organización transitoria conocido como purinosoma (Figura 20). El principal objetivo para la formación de este complejo es aumentar el flujo metabólico, ya que se estimula la canalización de los sustratos, así como de los intermediarios de la vía, estabilizándolos y protegiéndolos de la degradación. Además, se ha demostrado la relación del purinosoma con la mitocondria a través de mTORC1¹⁴³ y, a su vez, mTORC1 puede estimular la síntesis de purinas a través del aumento de la expresión de la enzima MTHFD2, la cual participa en la síntesis de folatos dentro de la mitocondria¹⁴⁴.

Por otro lado, la síntesis *de novo* de pirimidinas tiene lugar en el citoplasma celular y en la matriz mitocondrial y se lleva a cabo a partir de ATP, glutamina y bicarbonato. El producto final de la vía es el UMP. A partir del UMP generado se obtienen el resto de los nucleótidos de pirimidina.

Los primeros tres pasos de la vía metabólica tienen lugar en el citoplasma celular y están catalizados por la enzima trifuncional CAD (carbamoil fosfato sintetasa/aspartato transcarbamilasa/dihidroorotasa) para obtener el primer producto de la vía, el dihidroorotato. Este difunde hacia el interior de la mitocondria, donde se convierte en orotato por la acción de la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa (DHODEHSA).

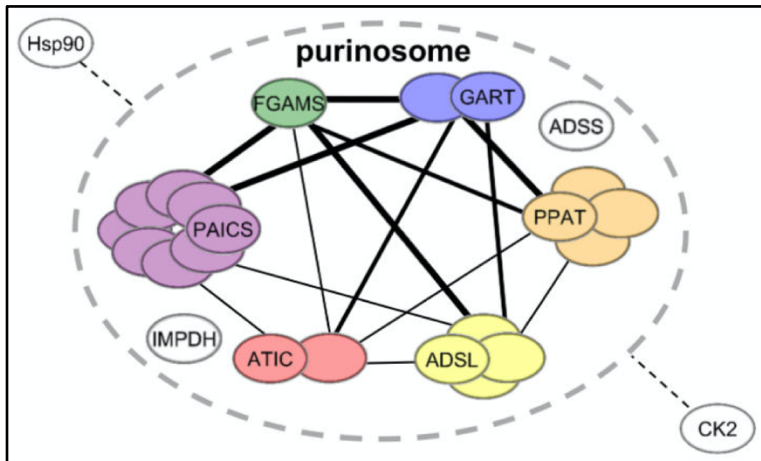


Figura 20: Estructura del purinosoma ensamblado en la vía de síntesis *de novo* de purinas. Se muestra el estado oligomérico de la forma activa de cada enzima implicada en la vía y las interacciones proteína-proteína formadas entre ellas donde la fuerza de interacción (grosor del borde) corresponde al número de estudios que hacen referencia a la interacción. También se ha demostrado que las enzimas IMPDH y ADSS forman parte del purinosoma. Sin embargo, no se han descrito interacciones proteína-proteína entre estas enzimas y las enzimas implicadas directamente en la síntesis *de novo*. Asimismo, se ha demostrado que Hsp90 y CK2 influyen en la formación de purinosomas en las células por mecanismos desconocidos (*Imagen obtenida de*¹⁴⁵).

Esta enzima, que se localiza en la MMI, acopla la oxidación del dihidroorotato a orotato con la reducción de la ubiquinona a ubiquinol, lo que enlaza la biosíntesis de pirimidinas con la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, generando mecanismos adicionales de regulación¹⁴⁰. Los dos últimos pasos de la vía ocurren en el citoplasma y están catalizados por la enzima bifuncional orotato fosforibosiltransferasa/orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (UMP sintetasa) que llevan a cabo la síntesis de UMP. Las correspondientes formas di y trifosforiladas del UMP (UDP y UTP) se forman por la acción de UMP / CMP quinasa y nucleósido difosfato quinasa (Figura 21). CAD y UMPS se disponen próximas a la mitocondria, donde se encuentra la enzima DHODhasa, lo que podría incrementar la eficiencia metabólica¹⁴⁶.

A partir del UTP se pueden obtener el resto de los nucleótidos de pirimidina. La síntesis de CTP se lleva a cabo a partir del UTP por la acción de la CTP sintasa, mientras que la síntesis de los nucleótidos de timina se lleva a cabo directamente sobre la forma desoxi- del nucleótido, lo que hace que únicamente forme parte del DNA y no del RNA (ver introducción apartado 4.2.2).

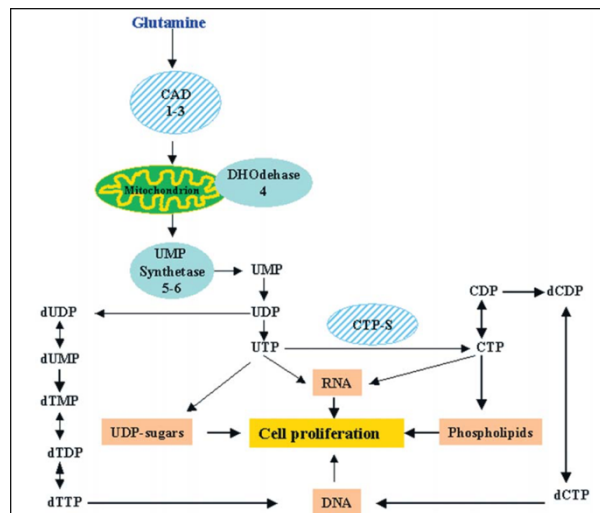


Figura 21. Síntesis *de novo* de pirimidinas. La síntesis de novo de nucleótidos de pirimidina requiere seis enzimas. Las primeras tres (1-3) están catalizadas por una enzima citoplasmática trifuncional CAD (carbamoil fosfato sintetasa/aspartato transcarbamilasa/dihidrorotasa) La cuarta enzima (4) dihidrorotato deshidrogenasa (DHODEHASE) se localiza en la mitocondria. Los dos últimos pasos (5-6) son citoplasmáticos y están catalizados por la UMP sintetasa y la enzima bifuncional orotato fosforribosiltransferasa/orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa. La CTP sintetasa (CTP-S) cataliza el paso de limitación de velocidad que convierte UTP en CTP. CAD y CTP-S son las enzimas limitantes de la velocidad para la síntesis de nucleótidos de uridina y citidina, respectivamente (*Imagen obtenida de*¹⁴⁷).

La enzima CAD se organiza en hexámeros formados por dos trímeros. Estos parecen mejorar la eficiencia metabólica de la enzima mediante la formación de un “canal” a través del cual pueden desplazarse los diferentes intermediarios metabólicos entre las diferentes actividades de la enzima¹⁴⁸.

4.3 Regulación del metabolismo de nucleótidos.

Para la célula resulta absolutamente esencial mantener controlado el *pool* de nucleótidos y, por ello, el metabolismo de estos se encuentra altamente regulado en función de las necesidades celulares en cada momento. La regulación se da a varios niveles implicando al transporte de nucleósidos, las propias vías de síntesis *de novo* y salvamento, así como a las vías de degradación de las enzimas implicadas en la vía de síntesis. Cuando la célula se encuentra en proliferación (fase S), la demanda de nucleótidos aumenta exponencialmente para cubrir las necesidades de replicación del DNA y síntesis de RNA, por lo que la actividad de las vías de síntesis *de novo* aumenta considerablemente dado que el suministro de nucleótidos por parte de las rutas de salvamento no es suficiente en este caso.

Un mecanismo común para regular la actividad en todas estas vías es la formación de complejos supramoleculares entre las enzimas que participan en cada ruta, aumentando con ello el flujo metabólico. Además, la regulación de la actividad enzimática también puede tener lugar a nivel alostérico o a nivel de mRNA, como ocurre en el caso de las quinasas que participan en las vías de salvamento¹¹⁸ o las que participan en la síntesis *de novo*¹⁴⁹.

Además, también existe una regulación de las rutas de salvamento en función del ciclo celular a través del control de la entrada de nucleósidos a la célula mediante los transportadores CNT1 y ENT1¹⁵⁰ (ver introducción apartado 4.4).

En cuanto a la regulación por catabolismo proteico, es destacable el caso de TK1, TMPK, RNR o TS. Estas enzimas incrementan su presencia durante la fase S del ciclo celular, mediante inducción de la expresión génica, aumentando con ello la disponibilidad de dNTPs para la replicación del DNA y, disminuyen significativamente su presencia celular después de la mitosis mediante proteólisis dependiente e independiente de ubiquitina, lo que se traduce en una drástica disminución del *pool* de dNTPs¹⁵⁰⁻¹⁵².

Como se ha mencionado anteriormente, la RNR es la enzima encargada de la síntesis *de novo* de dNTPs que se utilizarán finalmente para replicar el DNA. Una vez que el DNA se ha replicado, no es necesario mantener el *pool* de dNTPs tan elevado y, en esta situación, los niveles de RNR se reducen considerablemente por degradación proteolítica de la subunidad R2 y, además, la enzima SAMHD1 se encarga disminuir directamente los niveles de dNTPs evitando que estos se acumulen y alcancen niveles elevados que puedan resultar perjudiciales para la célula. Debido a esto, los niveles de SAMHD1 se incrementan cuando la célula entra en fase G1¹⁵³. Por tanto, la RNR y SAMHD1 se regulan de forma coordinada y antagónica para proveer a la célula de los niveles adecuados de dNTPs en cada condición fisiológica. Además, ambas enzimas presentan regulación también a nivel alostérico (Figura 23). Ambas presentan dos lugares de control alostérico: un primer lugar que controla la activación de la enzima, mediante el control de la oligomerización de las subunidades que la forman, activado por ATP en la RNR y, por GTP o dGTP en SAMHD1 y, otro lugar al que se unen con diferentes afinidades los dNTPs y que se encarga de mantener un equilibrio entre todos los dNTPs (Figura 23)¹⁵⁴.

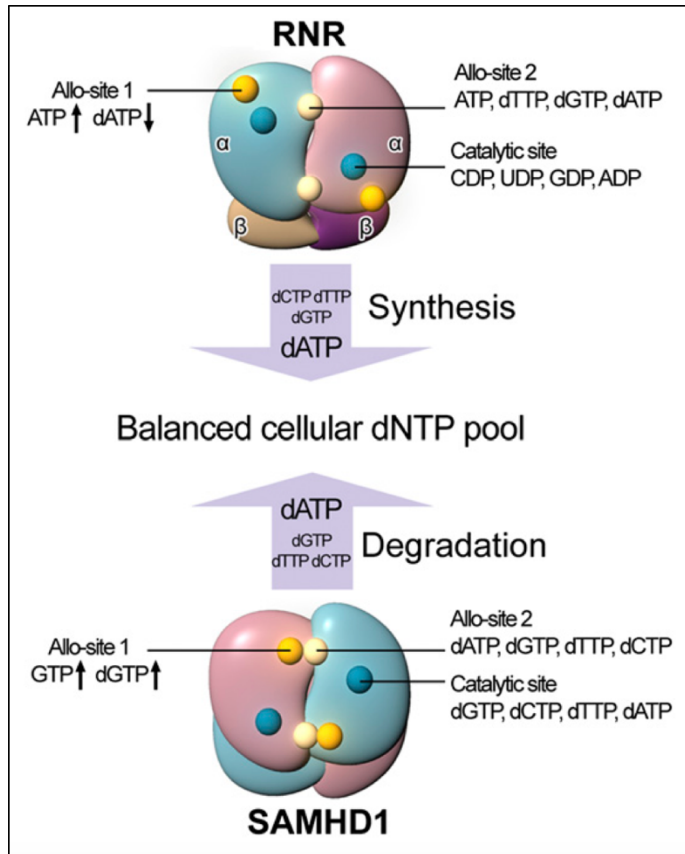


Figura 23: SAMHD1 y RNR regulan el *pool* celular de dNTPs de forma coordinada. RNR y SAMHD1 son responsables de sintetizar y degradar dNTPs respectivamente. Ambos tienen tres sitios de unión nucleótidos según se indica (*Imagen obtenida de*¹⁵⁵).

Por otro lado, la regulación de las enzimas implicadas en la síntesis de dNTPs también puede tener lugar a través de señales extracelulares. Estas pueden desencadenar respuestas rápidas, mediante la regulación de vías de señalización concretas, o más lentas, que impliquen cambios a nivel transcripcional. Por ejemplo, la regulación por fosforilación CAD¹⁵⁶, la regulación a nivel de transcripción dependiente de c-myc de TS, IMPDH2 o PRPS2^{157,158}. También se ha descrito el papel de p53 en el control de la homeostásis de dNTPs a través de su forma mutada mtp53.

En concreto, la disminución de esta provoca un descenso de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos, que se traduce en un descenso de la actividad de proteínas GTPasa, a consecuencia de la disminución de los niveles de GTP, provocando, por tanto, una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales¹⁵⁹.

Finalmente, a nivel de catabolismo, encontramos las enzimas nucleosidasas que controlan la expansión del *pool* de dNTPs por degradación fosforolítica. Estas compiten con las dNKs por la degradación o activación de los dNs. Algunos ejemplos son la timidina fosforilasa (TP), que cataliza la degradación de la dThd y dUrd, o la purina nucleósido fosforilasas (PNP), que degrada dGuo y desoxiinosina (dIno). En este punto también encontramos las enzimas desaminasas, que catalizan la eliminación del grupo amino de los dNs. Algunos ejemplos son la citidina desaminasa (CDA), que degrada la dCtd a dUrd y la adenosina desaminasa (ADA) que convierte la dAdo en dIno¹⁶⁰.

4.4 Intercambio de nucleósidos y nucleótidos entre la mitocondria y el citosol.

El *pool* de dNTPs celular está compartimentalizado y dividido entre el citoplasma y la matriz mitocondrial, debido a la existencia de la doble membrana mitocondrial. Aunque existen evidencias experimentales de una conexión e intercambio de sustratos entre ambos compartimentos a diferentes niveles y a través de transportadores específicos, en la mayoría de casos estos no han sido identificados o caracterizados¹⁶¹.

En lo relativo al transporte de nucleótidos, existen 53 genes que codifican proteínas bien caracterizadas de la familia de transportadores de soluto (SLC), que incluyen transportadores y proteínas *carrier* mitocondriales que transportan aniones, aminoácidos, nucleótidos y coenzimas a través de la

MMI¹⁶². Los primeros transportadores mitocondriales de nucleótidos caracterizados fueron las translocasas ADP/ATP. Estas están codificadas por los genes *SLC25A4*, *SLC25A5*, *SLC25A6* y *SLC25A31*. Estas proteínas son las responsables de importar ADP desde el citosol hasta la matriz mitocondrial y exportar el ATP sintetizado en la mitocondria¹⁵⁶. Además, recientemente se ha descrito que los genes *SLC25A33* (*PNC1*) y *SLC25A36* (*PNC2*) codifican dos proteínas transportadoras de nucleótidos de pirimidina en la mitocondria¹⁵². En concreto, se ha observado que *SLC25A33* es capaz de transportar tanto los ribo como los desoxirribonucleósidos di- y trifosfato de citidina, uridina y timidina mediante un mecanismo de antiporte (transporte de dos solutos en contra de su gradiente de concentración). Por otro lado, *SCL25A36* es capaz de transportar los ribo y desoxirribonucleósidos mono-, di- y trifosfato de citidina y uridina tanto por un mecanismo de antiporte como de uniporte (transporte de un soluto a favor de su gradiente de concentración). Además, se ha descrito que ambos transportadores pueden aceptar también nucleótidos de guanina, pero no de adenina¹¹⁴.

En cuanto al transporte de nucleósidos, resultan fisiológicamente relevantes principalmente por su papel en la ruta de salvamento de dNTPs, pues permiten el intercambio de los sustratos que posteriormente se incorporarán a la vía de salvamento mitocondrial¹¹³. Estos están también codificados por genes que pertenecen a la familia SLC, concretamente los *SCL28* y *SCL29*. La familia *SCL28* incluye los tres tipos de transportadores concentrativos de nucleósidos (CNT1, 2 y 3), mientras que la familia *SCL29* incluye los cuatro tipos de transportadores equilibrativos (ENT1, 2, 3 y 4).

En cuanto a los transportadores concentrativos, estos se localizan principalmente en el lado apical de la membrana plasmática de epitelios polarizados como riñón e intestino. No obstante, su distribución es más amplia y su expresión suele depender del grado de diferenciación del tejido,

siendo mayor en epitelios diferenciados [178,180]. Concretamente, CNT1 transporta pirimidinas, CNT2 transporta purinas y CNT3 puede transportar ambos. El transporte se encuentra acoplado a iones Na^+ y, además, a H^+ en el caso de CNT3, en una relación 1:1¹¹³.

En el caso de los transportadores equilibrativos, estos se localizan en el lado basolateral de las membranas, lo que permite el transporte vectorial de los dNs^{163,164}. ENT1 y 2 se localizan en la membrana plasmática, de forma que regulan los niveles de nucleósidos intra- y extracelulares. De ambos, ENT1 es el único que ha sido identificado en la membrana mitocondrial¹⁶⁵ y ENT3 se localiza en la membrana lisosomal¹⁶⁴, aunque también un trabajo describe su presencia en la membrana mitocondrial¹⁶⁶. A excepción de ENT4, todos median el transporte facilitado de purinas y pirimidinas de manera indistinta. El caso de ENT4 es particular, pues difiere evolutivamente de los ENT1-3¹¹³. Originalmente se identificó como un transportador de cationes orgánicos¹⁶⁷, aunque es capaz de transportar adenosina en condiciones ácidas extracelulares¹⁶³.

4.5 Efectos de las alteraciones en el *pool* mitocondrial y celular de dNTPs sobre la replicación del DNA mitocondrial y nuclear.

Como hemos mencionado anteriormente, el *pool* de dNTPs en la célula se encuentra altamente controlado y regulado por diferentes mecanismos con el objetivo de proveer en cada situación celular de una cantidad suficiente y adecuada, de dNTPs para los procesos de replicación y reparación del material genético. Esta distribución asimétrica del *pool* de dNTPs en función del momento del ciclo celular, es importante para mantener la fidelidad de la replicación de DNA y prevenir rupturas de las cadenas de DNA o mutaciones puntuales y, en consecuencia, la muerte celular¹⁶⁸.

Se ha demostrado que el bloqueo de la síntesis *de novo* de dNTPs a través de la inhibición de la actividad de la RNR se traduce en el bloqueo de la síntesis de DNA y, por tanto, la interrupción del ciclo celular¹⁶⁹, mientras que las expansiones descontroladas del *pool* de dNTPs aceleran la síntesis de DNA, lo que se traduce en infidelidades de la replicación de ambas cadenas del DNA. Se ha comprobado que situaciones celulares que generan un estrés en la replicación se traducen en un aumento del *pool* de dNTPs debido a la estimulación de la actividad RNR, lo que causa un descenso de la actividad correctora de errores de la polimerasa, provocando una mayor tasa de mutación¹⁶⁸. Además, recientemente se ha demostrado que incrementos en los niveles de dTTP y dCTP, debido a mutaciones en el promotor del gen *RNR*, provocan alteraciones en la fidelidad de la replicación que conducen a la activación del sistema de reparación de errores y, en último extremo, causan rotura de la doble cadena del DNA¹⁶⁸.

Por último, se ha observado que descensos en el *pool* de dNTPs resultan en un acortamiento de la longitud de los telómeros celulares, mientras que los incrementos del *pool* no se traducen en ningún efecto sobre los telómeros. Igualmente, desbalances del *pool* de dNTPs provocan acortamiento de los telómeros y, específicamente cambios en los niveles de dGTP, que parecen afectar directamente a la actividad telomerasa¹⁷⁰.

De igual forma que ocurre con el nDNA, la replicación, reparación y mantenimiento del mtDNA son altamente dependientes de las fluctuaciones que ocurren en el *pool* de dNTPs. De hecho, los desbalances en el *pool* de dNTPs mitocondriales originados por defectos en genes implicados en la regulación de la homeostasis de dNTPs (por ejemplo, mutaciones en TK2, TYMP, DGUOK), interfieren con la replicación del mtDNA causando defectos en forma de mutaciones puntuales, deleciones múltiples o un descenso en el número de copias de mtDNA (depleción)¹⁷¹.

Como ejemplo, las deficiencias en las quinasas implicadas en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs mitocondriales TK2 o dGK, se traducen en un descenso del *pool* mitocondrial de dNTPs de pirimidinas y purinas respectivamente. Esta reducción en la disponibilidad de sustrato interfiere directamente con la replicación del mtDNA en los tejidos afectados (depleción y acumulación de deleciones múltiples) dando lugar a enfermedades frecuentemente graves y de inicio durante la infancia¹⁷². De igual forma, la disfunción de la actividad TP (por mutaciones en el gen *TYMP*) se traduce en un aumento de los niveles plasmáticos de dThd y dUrd, lo que a su vez provoca un aumento de los niveles mitocondriales de dTTP y una disminución secundaria de los niveles de dCTP, debido a la competencia de sustrato por la TK2¹⁷³. Este desbalance en el *pool* de dNTPs mitocondrial conlleva la acumulación de mutaciones y deleciones múltiples en el mtDNA además de su depleción en los tejidos afectados dando lugar a la encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE). Por último, se ha comprobado que la síntesis mitocondrial de dTTP mediada por la actividad TK2 tiene implicaciones en la estabilidad y mantenimiento del nDNA. Concretamente, se ha asociado la actividad TK2 a la reparación de la doble cadena de DNA en el genoma nuclear tras sufrir un daño por radiación UV en células quiescentes¹⁷⁴.

En su conjunto, todas estas evidencias sugieren que el *pool* celular y mitocondrial de dNTPs no son compartimentos estancos, sino que ambos están interrelacionados y contribuyen al mantenimiento, integridad y síntesis del otro, demostrándose así la importancia de la mitocondria en el metabolismo de dNTPs celulares y viceversa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis.

Para la mitocondria es esencial mantener un *pool* de desoxirribonucleótidos que permita asegurar el mantenimiento de su genoma. La correcta homeostasis de este *pool* resulta imprescindible para asegurar una tasa y fidelidad adecuadas en la replicación del mtDNA, como evidencia el hecho de que alteraciones en el metabolismo de nucleótidos den lugar a aberraciones en el mtDNA, en lo que se conoce como síndromes de depleción y deleciones múltiples del mtDNA (MDDS). Los cuatro dNTPs necesarios para la replicación del DNA deben encontrarse en cantidad suficiente y en las proporciones adecuadas, ya que modificaciones de este equilibrio entre los distintos dNTPs se han relacionado directamente con un aumento de la mutagénesis. En esta línea, se han reportado múltiples trabajos dónde las cantidades de los cuatro dNTPs mitocondriales son similares^{115,175}. Por el contrario, resultados previos a este trabajo generados en nuestro grupo y en otros grupos de investigación sugerían la existencia de importantes asimetrías en el *pool* mitocondrial de tejidos de mamífero y células en cultivo, con el dGTP ampliamente sobrerrepresentado respecto al resto de dNTPs en condiciones fisiológicas¹⁷⁶.

La hipótesis principal de este trabajo es que las discrepancias publicadas en cuanto a la cuantificación del dGTP mitocondrial se deben a diferencias metodológicas en la obtención de los extractos de dNTPs, ya que en muchos casos estas técnicas implican la pérdida de la fracción de los nucleótidos asociados a proteína. Tradicionalmente se ha descrito que los dNTPs se encuentran principalmente solubles en la matriz mitocondrial, donde están disponibles para polimerasas y otras enzimas que participan en los procesos de replicación y reparación del mtDNA. Sin embargo, nuestra hipótesis es que el dGTP se halla mayoritariamente asociado a proteína en la mitocondria y en una cantidad que excede de forma importante al resto de dNTPs

2. Objetivos.

Para comprobar la hipótesis anteriormente enunciada nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Profundizar en la caracterización del *pool* mitocondrial de dNTPs en tejidos de ratón y células humanas comparando diversos métodos de extracción
2. Estudiar la posible asociación del dGTP con la fracción proteica mitocondrial
3. Identificar la proteína o proteínas responsables de la interacción con el dGTP mitochondrial
4. Caracterizar la interacción dGTP-proteína en mitocondria, generando los modelos celulares y animales necesarios para su estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Líneas celulares utilizadas

Durante este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares humanas:

- HeLa.

La línea celular HeLa se obtuvo a partir de un carcinoma cervical humano. Se trata de células epiteliales con una elevada capacidad proliferativa debido a su origen tumoral [189]. Para el cultivo se mantuvieron en medio DMEM High Glucose (*Dulbecco's Modified Eagle's Media, Gibco*) (4,5 g/L de glucosa) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL (0,1 mg/mL) de mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (P/S) y 2 mM de L-Glutamina (Q). El procedimiento para realizar los subcultivos y plaqueo de las células se detalla en el siguiente apartado.

- HeLa^{Flag}.

La línea celular HeLa^{Flag} procede de la transformación estable de las células HeLa con vectores lentivirales para que expresen la proteína NDUFA10 conjugada a un Flag *tag* (DYKDDDDK) en su extremo C-terminal. Estas células han sido generadas según se describe en el apartado 5 de esta sección. Las condiciones de cultivo y mantenimiento son las mismas que para las células HeLa normales.

- NDUFA10^{WT}.

Cómo células que presentasen la forma WT de la proteína NDFUA10 utilizamos la línea celular HEK-293T es también de origen humano y proviene de células embrionarias de riñón. Se trata de una modificación de las HEK-293, las cuales han sido transformadas para expresar la región E1 de adenovirus Ad 5. Esto les permite mediar la encapsidación de viriones y, por ello, han sido utilizadas para la obtención, amplificación y titulaciones de vectores virales defectivos en E1.

Las HEK-293T además han sido modificadas para expresar el antígeno T de la proteína SV40, confiriéndoles también resistencia a Neomicina, sensibilidad a temperatura y, además, fuerza a la célula a entrar en un mayor número de divisiones celulares, aumentando así la eficiencia de la transfección y la producción de vectores¹⁷⁷. Sin embargo, este tipo de células son más delicadas que otras líneas celulares (la adhesión a la placa es más débil, son más sensibles a cambios en el pH...) por lo que se ha extremado el cuidado en su manipulación (evitando centrifugarlas durante los subcultivos o descongelación, extremando el cuidado al mover las placas...). El cultivo se mantuvo en *DMEM High Glucose (Gibco)* suplementado con 10% FBS, 100 U/mL P/S y 2 mM Q.

- NDUFA10^{KO}.

Se trata de células HEK-293T *knock-out* (KO) para la proteína NDUFA10. Estas células han sido cedidas por el Dr. Michael T. Ryan (*Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Melbourne, Australia*) y han sido generadas según describen Stroud y colaboradores [88] mediante edición genética con CRISPR-Cas9. Para el cultivo y mantenimiento de esta línea se tomaron las mismas precauciones que para la línea HEK-293T y el medio empleado fue *DMEM High Glucose, GlutaMAXTM, Supplement Pyruvate (piruvato 1mM) (Gibco, 10569010)* suplementado con 10% FBS, 100 U/mL P/S y 50 µg/mL de uridina.

- NDUFA10^{FLAG}.

Se trata de células HEK-293T con fondo genético KO para la proteína NDUFA10 y que posteriormente han sido transformadas para expresar la proteína NDUFA10 conjugada a un Flag *tag en su extremo C-terminal* (mediante recombinación también mediada por CRISPR-Cas9). Estas células han sido cedidas por el Dr. Michael T. Ryan (*Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Melbourne, Australia*) y las condiciones de cultivo y mantenimiento son las mismas que para la línea HEK-293T^{KO}.

- NDUFA10^{KI}.

Se trata de células HEK-293T con fondo genético KO para la proteína NDUFA10 y que posteriormente han sido transformadas para expresar la proteína NDUFA10 *knock-in* (KI). En este caso se han introducido dos mutaciones en un dominio concreto de la proteína NDUFA10 (dominio homólogo al dominio dNK de las proteínas desoxirribonucleósido quinasa que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs). La mutación introducida es la E160A/R161A. Estas células han sido cedidas por el Dr. Michael T. Ryan (*Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Melbourne, Australia*) y las condiciones de cultivo y mantenimiento son las mismas que para la línea KO.

1.2 Cultivo y conservación de células.

En este trabajo se han utilizado diferentes líneas celulares para la realización de los diferentes ensayos y estudios moleculares. En todos los casos, los cultivos se han mantenido en unas condiciones estables de temperatura a 37°C, de humedad relativa al 90% y de presión de CO₂ al 5%. La manipulación de estos se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar y en condiciones que garantizan la seguridad del cultivo y el experimentador. Para el subcultivo y división de las células se llevó a cabo el siguiente procedimiento estándar:

- Lavar las células con tampón fosfato 1X (*Phosphate buffered saline, PBS, Gibco*).
- Añadir un volumen de Trispsina-EDTA 1X (*Biowest, X0930-100*) para cubrir la placa completa e incubar las células unos 5 minutos en incubador a 37°C hasta que se hayan levantado de la placa.
- Recoger las células y centrifugar a 500 x g durante 5 minutos.

- Resuspender las células en el volumen deseado de medio de cultivo y sembrarlas.

La conservación de las células se realiza por congelación de estas en criotubos de congelación a -80°C . El protocolo de congelación consiste en recoger 1 millón de células, resuspenderlas en 1 mL de medio de congelación (90% FBS (v/v); 10% DMSO (v/v)) y pasarlas a un criotubo de congelación. La congelación se lleva a cabo en un tanque de isopropanol que se deposita en el congelador a -80°C para favorecer un descenso gradual de la temperatura. Se mantienen a -80°C si se van a mantener durante un corto periodo de tiempo, o trasladan a un tanque de nitrógeno líquido si se espera mantenerlas durante un tiempo indefinido.

1.3 Contaje de células.

Para determinar el número de células en cultivo se utiliza una cámara de *Neubauer* y el colorante vital *trypan blue*. Para ello, se recogen las células siguiendo el procedimiento estándar descrito y se resuspenden en un volumen de medio conocido. A continuación, se mezclan 10 μL de suspensión de células con 10 μL de *trypan blue* y se deposita la mezcla sobre la cámara de *Neubauer*.

La cuadrícula de la cámara de *Neubauer* es de 3 x 3 mm y se encuentra dividida en 9 cuadrantes de 1 x 1 mm cada uno, los cuales a su vez están divididos en 16 cuadrantes más pequeños (Figura 22). El espacio que existe entre el cubreobjetos y la cámara tiene un grosor de 0,1 mm, por lo que en 16 cuadrantes habrá un volumen de $0,1\text{ mm}^3$.

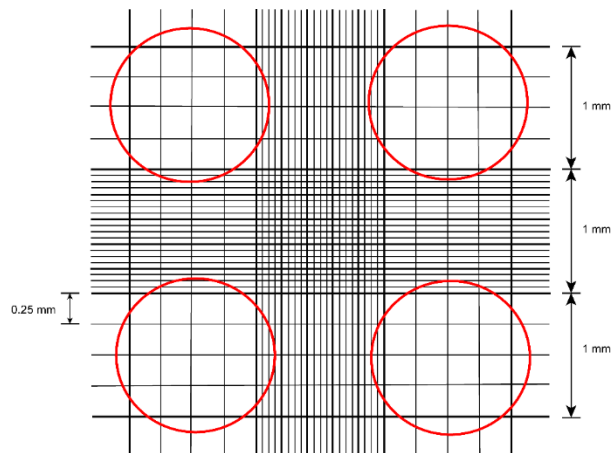


Figura 23: Cámara de Neubauer.

Para el conteo, se cuentan las células que hay dentro de cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara (Figura 23) y se hace una media de todos. Para el cálculo de el número de células por mL se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{N \cdot D \cdot 10000}{L}$$

Donde **N** es el número de células contadas en cada cuadrante, **D** es el factor de dilución aplicado, **10.000** es el factor de conversión que se aplica entre 0,1 μL y 1 mL y **L** es el número de cuadrantes que se han contado.

2. Experimentación animal.

2.1 Modelo animal y condiciones de estabulación.

El modelo animal utilizado es un ratón constitutivo *knock-in* para la proteína NDUFA10 (NDUFA10 KI) con un fondo genético C57BL/6^{NTaq} generado en el transcurso de esta tesis. El animal ha sido generado mediante edición génica con el sistema CRISPR/Cas-9 para que las mutaciones introducidas provoquen el cambio del ácido glutámico de la posición 160 por una alanina y de la arginina 161 por otra alanina (NDUFA10^{E160A/R161A}). En este caso seleccionamos las mismas mutaciones que se habían introducido previamente en la línea celular KI.

Además, se ha introducido una mutación silente próxima a la zona de interés para facilitar el genotipado de los animales (Figura 24). La generación del modelo se encargó a *Taconic Biosciences*. La cría y el mantenimiento de los animales se ha llevado a cabo en el área SPF (libre de gérmenes patógenos específicos) del estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron. Las salas presentan temperatura y humedad controlada en torno a los 22 °C, racks ventilados, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y los animales han estado sometidos en todo momento a un régimen alimentario *ad libitum* según la dieta *Teklad Global 18% Protein Rodent Diet 2018, Harlan*.

En todo momento los animales han sido manipulados siguiendo las directrices europeas y de acuerdo con las normas establecidas por la Generalitat de Catalunya para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Todos los procedimientos realizados han sido previamente aprobados por el comité ético de experimentación animal del Institut de Recerca Vall d'Hebron (CEEA 73/19).

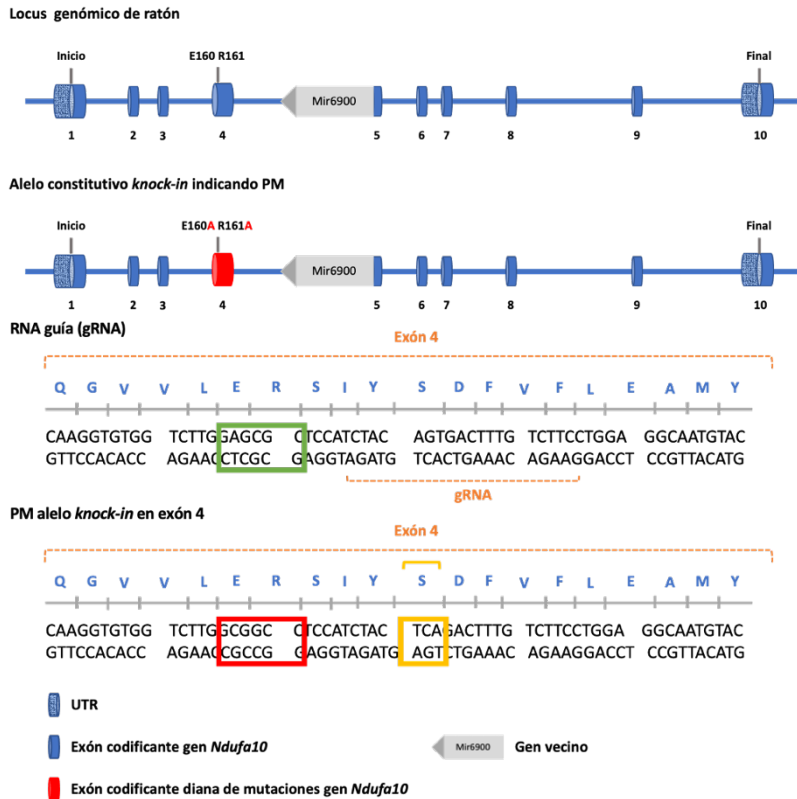


Figura 24: Esquema general de la estrategia de edición génica seguida para general el modelo animal. El recuadro verde muestra la secuencia del alelo *wild type* para el exón 4 del gen *Ndufa10*; En el recuadro rojo, la secuencia *knock-in* (KI) modificada del exón 4; El amarillo los puntos de mutación silente que facilitarán el genotipado de animal en el alelo KI.

2.2 Genotipado de animales *knock-in*.

El genotipado de animales se realiza a partir de DNA que ha sido extraído de un fragmento de oreja (obtenido en el momento de su identificación) o cola del animal (obtenido en el momento de su eutanasia). Se realiza una PCR inicial para amplificar un fragmento genómico conteniendo el exón 4 del gen *Ndufa10* (exón en el que se encuentran las dos mutaciones introducidas) y

posteriormente se realiza una restricción de los fragmentos amplificados para diferenciar el alelo *wild-type* (WT) del alelo *knock-in* (KI), gracias a la secuencia de restricción específica introducida en este último.

2.2.1 Amplificación del exón 4 del gen *Ndufa10*.

El gen *Ndufa10* (NCBI Gene ID: 67273; Ensembl Gene ID: ENSMUSG00000026260) se encuentra en el cromosoma 1. Tiene un tamaño de 2020 pb (pares de bases) y presenta 10 exones. En esta PCR se amplifica una región de 486 pb que contiene el exón 4 del gen, tanto en el alelo WT como en el KI (Figura 25). Los *primers* empleados en esta amplificación presentan las siguientes secuencias:

- *Primer Forward (Fw)*: TTGGAGAGGTCCCAGTGATC
- *Primer Reverse (Rv)*: GGAATATGGTACACCACAG

La amplificación del exón 4 por PCR se realiza con el kit comercial *TaKaRa TaqTM HS PCR Kit, UNG Plus (R013A, TaKaRa)*. El kit utiliza dUTP en lugar de dTTP en la mezcla de reacción, y la enzima Uracil-DNA glicosilasa (UNG) que elimina productos de PCR anteriores que pudiesen contaminar la reacción.

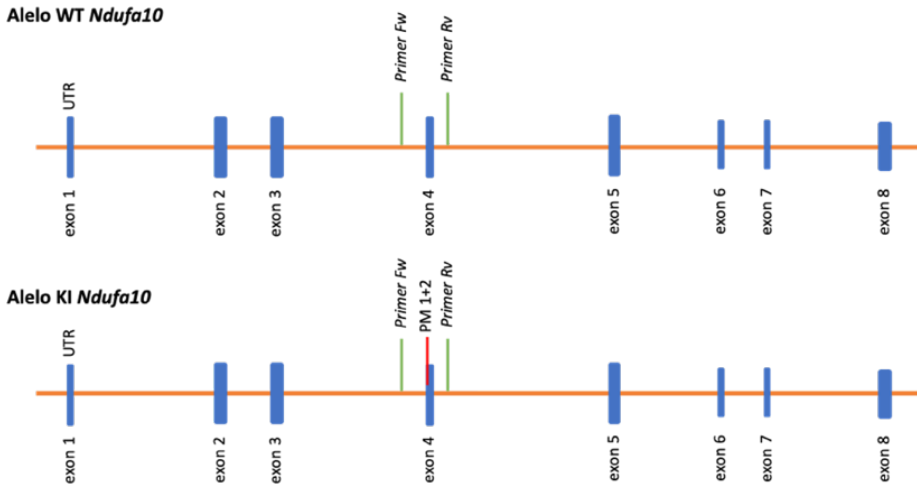


Figura 25: Representación de la disposición de *primers* en la amplificación del exón 4 del gen *Ndufa10*. PM 1+2: Punto de mutaciones 1 y 2 de alelo KI.

La composición de la mezcla de reacción se detalla en la Tabla 2. Las condiciones de la reacción de amplificación se recogen en la Figura 26. El producto de amplificación se resuelve en un gel de agarosa al 2% (p/v) durante 1 hora a 100 V.

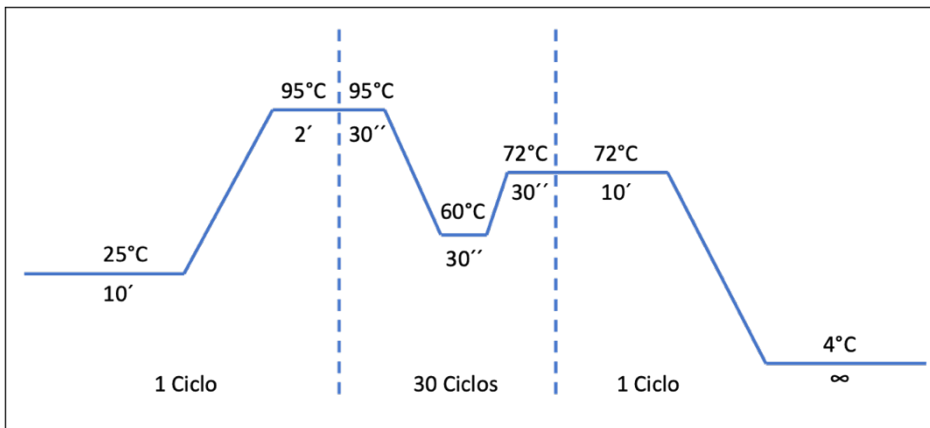


Figura 26: Condiciones de amplificación por PCR del exón 4 del gen *Ndufa10*.

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
<i>TaKaRa Taq HS (5 U/ μL)</i>	0,025 U/ μL	0,125
<i>UNG (2 U/ μL)</i>	0,02 U/ μL	0,25
<i>10X PCR tampón Mg_2^+ Plus¹</i>	1X	2,5
<i>dNTPs Mix²</i>	0,2 mM	2
<i>Forward Primer (10 μM)</i>	0,5 μM	1,25
<i>Reverse Primer (10 μM)</i>	0,5 μM	1,25
<i>Agua estéril</i>	-	15,625
<i>DNA</i>	4 ng/ μL (100 ng)	2
<i>Volumen Final</i>		25 μL

¹100mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 15 mM MgCl_2

²2,5 mM dATP; dTTP; dGTP, dCTP

Tabla 2: Composición de la mezcla de PCR para amplificar el exón 4 del gen *Ndufa10*

2.2.2 Digestión del exón 4 del gen *Ndufa10*.

Como se mencionó anteriormente, en el alelo KI se ha introducido una secuencia de restricción específica para facilitar el genotipado. En concreto, la secuencia introducida es una diana de restricción para la enzima *NheI* (*New England Biolabs* # R3131L) que tras la digestión del fragmento editado amplificado dará lugar a dos fragmentos de 297 y 189 pb (Figura 27).

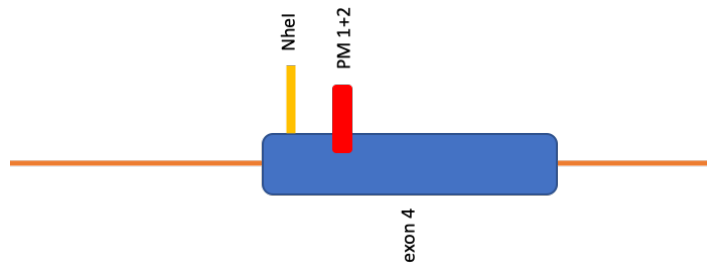


Figura 27: Esquema de la disposición de elementos relevantes para la restricción del exón 4 en el alelo KI; PM 1+2: Posición esquemática de los puntos de mutación 1 y 2 introducidos en el exón 4 del gen *Ndufa10*.

Las condiciones de la reacción de restricción se recogen en la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
<i>NEBuffer 2.1 10X</i> ¹	2	1X
<i>NheI</i> ²	1	0,5 U/ μL
<i>Producto de PCR</i>	5	-
<i>Agua estéril</i>	12	-
<i>Volumen final</i>	20	

¹50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA; pH 7,9

²10.000 U/mL, Biolabs, R0131L

Tabla 3: Composición de la mezcla de restricción.

2.3 Estudio de la evolución de la curva de pesos.

Se realiza un seguimiento semanal del peso de los animales desde el momento del destete (3 semanas) hasta las 35 semanas de vida del animal. Llegados a las 35 semanas los animales son sacrificados y se detiene el seguimiento. Los animales se pesan en la campana de las salas de manipulación de la SPF del estabulario del Institut de Recerca Vall d'Hebron

con una misma balanza de precisión. La distribución de animales que participan en el estudio de pesos es la siguiente (Tabla 4):

Sexo	Genotipo	Nº Animales
Machos	WT/WT	13
	WT/KI	39
	KI/KI	24
Hembras	WT/WT	28
	WT/KI	30
	KI/KI	8

Tabla 4: Sexo y genotipo de los animales que participan en el estudio de la curva de pesos.

Se estudiaron un total de 142 animales, de los que 41 fueron WT, 69 Hgz y 32 KI. WT/WT: Animales con genotipo *Wild type* ($Ndufa10^{WT/WT}$); WT/KI: Animales con genotipo heterocigoto ($Ndufa10^{E160A;R161A/WT}$); KI/KI: Animales con genotipo homocigoto para el alelo *knock-in* ($Ndufa10^{E160A;R161A/E160A;R161A}$).

2.4 Estudio de supervivencia.

Para el estudio de supervivencia se utiliza el estimador de supervivencia Kaplan-Meier. Se trata de un estimador no paramétrico de la función supervivencia y que tiene en cuenta la censura de animales durante el estudio. Permite una representación gráfica mediante una función escalonada. Al ser un método no paramétrico no asume ninguna función de probabilidad y, por tanto, maximiza la verosimilitud de los resultados obtenidos (hace máxima la función de verosimilitud). En el estudio se analiza una muestra aleatoria de animales de tamaño n durante un tiempo k ($t_1 < t_2 < \dots < t_k$) (siendo $k \in n$) en los que se observan eventos. Para cada tiempo k_i existirán n_i animales en riesgo y se observarán d_i eventos. Además, en el intervalo $[t_i, t_{i+1}]$ se producirán m_i pérdidas.

Los animales y genotipos que han participado en el estudio son los mismos que participaron en el estudio de la evolución del peso y se recogen en la Tabla 4.

2.5 Eutanasia de animales y extracción de muestras.

Durante todo el estudio se lleva a cabo un protocolo de supervisión y control para roedores (previamente aprobado por el comité ético de experimentación animal del Institut de Recerca Vall d'Hebron (CEEA 73/19-) con el objetivo de detectar posibles signos de dolor o sufrimiento en los animales y garantizar en todo momento el bienestar físico de estos. Para ello, se controla la evolución del peso de los animales, el comportamiento, la postura corporal y el aspecto físico. En dicho protocolo se establece una serie de criterios de punto final para los animales en función de la puntuación que se asigna a cada animal durante su supervisión. En caso de que esta puntuación superase el umbral máximo de aceptación se procede a la eutanasia del animal mediante asfixia en cámara de CO₂ o por dislocación cervical, y se contabiliza la muerte de este. En base a la curva de supervivencia decidimos unos tiempos en los que eutanasiar a los animales para recolectar muestras y tejidos. Estos fueron a las 7, 14 y 24 semanas de edad.

2.6 Extracción de tejidos.

Cuando los animales alcanzan la edad indicada para el sacrificio, se eutanasiar por dislocación cervical y se diseccionan para obtener los siguientes tejidos: Hígado, cerebro, corazón, riñones, bazo, pulmones y músculo (gastrocnemio, bíceps femoral y soleus). También recogemos un fragmento de cola para regentipar los animales. Tras la extracción se guardan en un tubo de 1,5 mL y se congelan rápidamente en nitrógeno

líquido o bien se utilizan directamente cuando el procedimiento requiere partir de tejido fresco. Si no se han utilizado en el momento, se almacenan congelados a -80°C . Antes de utilizar el tejido, este se pulveriza en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero cerámico hasta obtener un polvo homogéneo. De esta manera, el pulverizado de tejido total que obtenemos resulta mucho más homogéneo y representativo del tejido en cuestión para futuros procedimientos.

3. Extracción de ácidos nucleicos.

3.1 Extracción de DNA.

3.1.1 Extracción de DNA de células humanas.

Para la extracción de DNA de células humanas utilizamos el kit comercial *QiAmpDNA Minikit (Quiagen)* y partimos de un *pellet* equivalente a 1×10^6 células. Todo el proceso se desarrolló según las instrucciones incluidas en el *kit*. Brevemente, este consistió en un lisado inicial de las células con un tampón que proporciona el pH necesario para que el DNA que se libera quede adsorbido en una membrana de sílice, mientras que las proteínas presentes en el lisado no son retenidas. A continuación, el DNA se lavó para eliminar interferentes y se eluyó de la columna utilizando Tris-HCl 10mM pH 8 (para proporcionar una baja concentración salina y unas condiciones de pH que favorecen la elución del DNA retenido). La concentración final de DNA obtenido para cada muestra se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un *NanoDrop (NanoDrop Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific)*. Las purificaciones cuyo *ratio* de absorbancia 260/280 fue inferior a 1,8-2,0 se descartaron, ya que estos valores de *ratio* son indicativos de contaminación excesiva por proteína. El DNA resultante se almacenó congelado a -20°C hasta su posterior utilización.

3.1.2 Extracción de DNA procedente de tejidos de ratón.

En este caso, la metodología elegida para la extracción de DNA depende del objetivo final:

3.1.2.1 Extracción orgánica con fines de genotipado animal.

Para el genotipado de los animales partimos de un fragmento de oreja (obtenido durante la identificación de los ratones mediante perforación) o cola (obtenido tras la eutanasia con el fin de confirmar el genotipado inicial), a partir de los cuales seguimos el protocolo que se detalla a continuación:

- Lisar el tejido en 400 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 0,5% SDS (p/v)) suplementado con 0,2 mg/mL de proteinasa K durante toda la noche en un baño a 56°C.
- Añadir 75 μ L de acetato potásico 8M y mezclar con agitador *vortex*.
- Añadir 500 μ L de cloroformo y mezclar con agitador *vortex*.
- Centrifugar a 13.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA).
- Separar la fase acuosa y pasarla a un nuevo tubo de 1,5 mL
- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto.
- Centrifugar a 13.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA).
- Eliminar el sobrenadante y lavar el *pellet* o precipitado en 1 mL de etanol 75% (v/v).
- Centrifugar a 13.000 x g durante 10 minutos a TA.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el DNA en un baño seco a 55°C durante 15 minutos.
- Resuspender el DNA en 50-100 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8 e incubarlo durante 10 minutos en baño seco a 55°C para facilitar la solubilización.
- El DNA se puede conservar en la nevera a 4°C hasta su utilización (o a -20°C para su almacenamiento a largo plazo).

3.1.2.2 Extracción de DNA de alta pureza.

Para este propósito partimos de muestras de tejido de ratón previamente congelado a -80°C . Antes de iniciar la extracción como tal, pulverizamos todo el tejido en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. Se separaron el equivalente a 50 mg de tejido pulverizado (aproximadamente una medida de espátula tipo microcuchara) e iniciamos la extracción del DNA genómico con el *kit* comercial *QiAmpDNA Minikit* (*Quiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante (mismo *kit* y procedimiento que se detalla en el apartado 3.1.1 extracción de DNA en células humanas).

3.2 Resolución de DNA por electroforesis en gel de agarosa.

La concentración de agarosa (p/v) en el gel se elige en función del tamaño de los fragmentos que se deseen separar. En cualquier caso, para preparar el gel, disolvimos la cantidad de agarosa requerida en tampón TBE (90 mM Tris-borato; 2 mM EDTA; pH 8) y añadimos bromuro de etidio a una concentración final de 0,6 mg/mL. Cargamos las muestras en el gel diluidas en tampón de carga 10X (*Orange G, Sigma-Aldrich, 08756*) y llevamos a cabo la electroforesis en tampón TBE a un voltaje constante de 100-120 V durante el tiempo necesario para que las bandas de interés se separen suficientemente. Transcurrida la electroforesis, visualizamos las bandas de DNA en un transiluminador gracias al efecto intercalante del bromuro de etidio, que emite fluorescencia cuando se expone a una fuente de luz ultravioleta.

3.3 Extracción de RNA total de tejidos de ratón.

Para obtener el RNA total se parte de tejidos de ratón previamente congelados a -80°C . Estos se pulverizan en nitrógeno líquido con ayuda de un

mortero de porcelana hasta obtener un pulverizado homogéneo del tejido. A continuación, se separan 50 mg de pulverizado y se extrae el RNA total siguiendo las instrucciones descritas en el kit comercial *TRIzol™ Reagent Kit (invitrogen)* y aplicando las medidas estándar para prevenir la contaminación y degradación con RNasas (material específico para RNA, uso de guantes, limpieza de utensilios y superficies con RNAZap (Ambion), etc). Una vez extraído el RNA se determina la concentración obtenida en el espectrofotómetro *NanoDrop*.

El RNA obtenido se trata con DNAsa I para eliminar restos de DNA genómico que puedan contaminar la muestra, utilizando el kit comercial Ambion *DNAsa-free*. Para ello, se diluyen 5 µg de RNA en 20,5 µL de H₂O *RNAsa-free* (agua MiliQ recién filtrada libre de RNasas) y se prepara la mezcla de reacción para el tratamiento final siguiendo la composición descrita en la Tabla 5.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
<i>10X DNAsa I Buffer</i>	2,5	1X
<i>rDNAsa I (2U/ µl)</i>	2	0,16 U/µl
<i>RNA (5 µg)</i>	20,5	0,2 µg /µL
<i>V final</i>	25	

Tabla 5: Composición de la mezcla de reacción para el tratamiento con DNAsa I.

La mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se añaden 2,5 ul del inhibidor de DNAsa I que contiene el *kit* (quelante de iones bivalentes en suspensión), se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 10.000 x g y 4°C durante 2 minutos para precipitar y eliminar el inhibidor. Finalmente se habrán obtenido 0,2 µg /µL de RNA tratado que se conserva a -20°C (-80°C por largos periodos de almacenaje) hasta su utilización.

3.3.1 Evaluación de la calidad del RNA obtenido mediante electroforesis capilar.

La calidad del RNA obtenido se evalúa analizando 2 μ L del producto obtenido en el sistema *Bioanalyzer (Nano XP)*. El sistema utiliza un sistema de electroforesis capilar, agentes intercalantes y un control interno para evaluar la relación entre el rRNA y el tRNA presentes en la muestra.

3.3.2 Transcripción reversa del RNA obtenido.

Con el fin de analizar el nivel de expresión de diferentes genes se somete el RNA total extraído de tejido de ratón a transcripción reversa para obtener el correspondiente DNA complementario (cDNA) que utilizaremos para la cuantificación relativa de expresión mediante rt-qPCR. La transcripción reversa del RNA se realiza utilizando el kit comercial *High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)*. Se prepara una mezcla de reacción (Tabla 6) y se realiza la reacción de PCR reversa según las condiciones indicadas en la Figura 28.

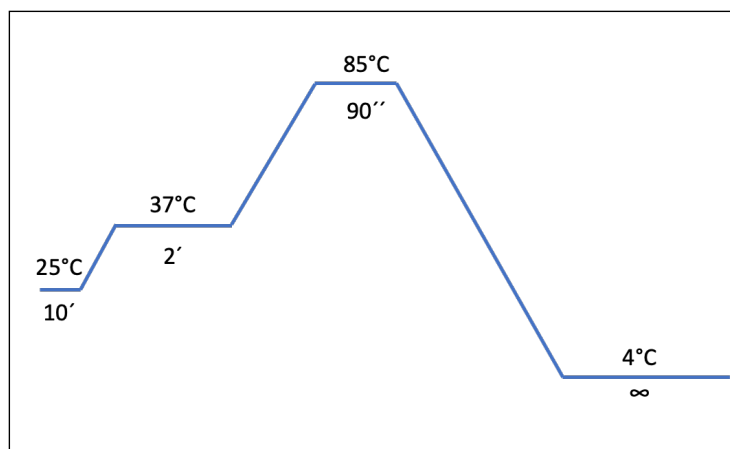


Figura 28: Condiciones de amplificación para la reacción de transcripción reversa

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
<i>RT Buffer 10X</i>	4	1X
<i>dNTPs Mix¹ 100 mM</i>	1,6	4 mM
<i>RT Random Primers 10X</i>	4	1X
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/mL)</i>	2	2,5 U/μl
<i>RNA DNAsa Free (0,2 mg/ml)</i>	20 (2 μg)	0,1 μg / μL
<i>H₂O Nuclease free</i>	8,4	-
<i>Volumen final</i>	40	

Tabla 6: Composición de la mezcla de reacción para la transcripción reversa del RNA.

3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos.

Independientemente del procedimiento que se realice para obtener DNA o RNA, el ácido nucleico se cuantifica por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm en un *NanoDrop[®] ND-1000 o ND-2000 (NanoDrop Technologies)*.

Para la cuantificación se cargan 1 μL de muestra en el pedestal, se baja el brazo para bloquear el paso de la luz y se procede a leer la absorbancia de la muestra en un rango de entre 220-750 nm, utilizando para calcular la concentración el pico a 260 nm, donde absorben los ácidos nucleicos. La concentración se calcula según la ley de Lambert-Beer:

$$c = (A \cdot \epsilon) / b$$

Donde **c** es la concentración de ácido nucleico en moles/L (M); **A** es la absorbancia obtenida a 260 nm en UA (unidades de absorbancia); **ε** es el coeficiente de extinción molar en litro/mol-cm (50 ng-cm/μl) para DNA de

doble cadena) y **b** es la longitud de la trayectoria de la luz a través de la muestra en cm. Este cálculo lo realiza el aparato de forma automática y se obtiene directamente la concentración de DNA en ng/ μ L de la muestra.

4. Obtención de fracciones proteicas de cultivos y tejidos de ratón.

4.1 Homogenado total de proteína.

El proceso para la obtención de extractos de proteína es similar tanto para extractos procedentes de tejidos de ratón como para extractos celulares.

En el caso de extractos procedentes de células, partimos de un *pellet* correspondiente a 10^6 células totales que resuspendimos en 50 μ L de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% SDS (p/v); 0,5% desoxicolato sódico (p/v); IGEPAL® CA-630 (Sigma) 1% (v/v)) suplementado con inhibidores de proteasas (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, cOmplete™, Sigma-Aldrich*) e inhibidores de fosfatasas (*PhosSTOP™ EASYpack, Sigma-Aldrich*).

En el caso de extractos de tejidos de ratón, partimos de 50 mg de tejido previamente pulverizado (aproximadamente una medida de espátula microcuchara) que resuspendimos en 200 μ L de tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. En ambos casos se procede a la homogeneización del extracto con la ayuda de un homogeneizador mecánico para microtubos (*pellet pestle, Sigma-Aldrich*) hasta que todo el extracto está homogéneo, y se incuba durante 30 minutos en hielo. A continuación, se centrifuga a 20.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se determina la concentración de proteína del extracto con el método de Bradford (apartado 4.3 de esta sección). Finalmente, las muestras se llevan a la concentración deseada, en función del objetivo experimental, diluyéndolas en el mismo tampón RIPA.

4.2 Aislamiento de la fracción mitocondrial.

El aislamiento de la fracción mitocondrial utilizado se basa en un proceso de centrifugación diferencial. Utilizamos un protocolo optimizado en función de si se parte de células humanas en cultivo o de tejido de ratón.

4.2.1 Aislamiento de mitocondrias procedentes de células en cultivo.

En este caso, para obtener suficiente cantidad final de material, partimos de 10 placas de cultivo de 150 mm (*SARSTEDT, 83.3903*) de diámetro (área de 148 cm²) totalmente confluentes y se sigue el protocolo que se detalla a continuación:

- Lavar las placas 2 veces con 10 mL de PBS 1X (Gibco®) y añadir 3 mL de Trispsina-EDTA 1X (*Biowest, X0930-100*) a cada una.
- Incubar 5 minutos a 37°C en incubador hasta que la acción de la tripsina logre disociar las células de la superficie de cultivo.
- Lavar las células con 30 mL de medio de cultivo suplementado.
- Recoger las células y llevar a un volumen final de 30 mL con PBS 1X.
- Centrifugar las células a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA).
- Resuspender el *pellet* de células en 10 mL de tampón de homogeneización (250 mM sacarosa; 1 mM EGTA; 10 mM Hepes pH 7,4) e incubar 10 minutos en hielo. Desde este momento todo el procedimiento debe realizarse en cámara fría a 4°C.
- Homogeneizar el lisado de células en un homogeneizador de vidrio tipo Dounce aplicando 50 golpes de homogeneización por ciclo. Nuestro homogeneizador tiene una capacidad de 5 mL por lo que realizamos 6 ciclos homogeneizando la totalidad del volumen en fracciones de 5 mL.

- Centrifugar el homogenado en tubos de fondo redondo a 1.500 g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga *Sorvall RC6plus* (ThermoFisher Scientific) con un rotor *Fiberlite™ F21-8 x 50y Fixed-Angle Rotor* (ThermoFisher Scientific).
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo cónico de 15 mL y conservar en hielo.
- Resuspender el *pellet* en 10 mL más de tampón de homogeneización y se vuelve a homogeneizar de 5 en 5 mL (como se ha indicado anteriormente).
- Centrifugar el homogenado a 1.500 g durante 10 minutos a 4°C.
- Recoger el sobrenadante y combinarlo con el sobrenadante previo en un tubo de centrifuga de 50 mL. La mezcla se lleva a un volumen final de 30 mL en tampón de homogeneización.
- Centrifugar todo el sobrenadante a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Utilizar tubos de fondo redondo aptos para alta velocidad.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 1 mL de tampón de homogeneización para transferirlo a un tubo de 1,5 mL.
- Centrifugar a 10.000 g durante 2 minutos a 4°C en una centrifuga *MiniSpin (Eppendorf)*.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con la fracción enriquecida en mitocondrias en 1 mL de tampón MAITE (25 mM sacarosa; 75 mM sorbitol; 100 mM KCl; 10 mM K₂HPO₄; 0,05 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 10mM Tris-HCl pH 7.4) apartando una alícuota de 20 µL para determinar proteína (ver apartado 4.3 de esta sección).
- Centrifugar de nuevo a 10.000 g durante 2 minutos a 4°C en una centrifuga *MiniSpin* para precipitar de nuevo la fracción enriquecida en mitocondrias. El *pellet* puede congelarse a -80°C hasta su posterior utilización o emplearse en el mismo momento, en función del procedimiento que se desee realizar.

4.2.2 Aislamiento de mitocondrias procedentes de tejido de ratón.

Para este procedimiento partimos siempre de tejido fresco de ratones que han sido eutanasiados previamente según se ha detallado anteriormente (apartado 2.5 de materiales y métodos). La extracción de mitocondrias se ha realizado en hígado, cerebro y corazón de ratón. Hemos seleccionado tampones optimizados para proporcionar mayor rendimiento y pureza en la obtención de la fracción mitocondrial de diferentes tejidos^{178,179}. Así pues, en función del tejido que se emplea, se utiliza un tampón de homogeneización diferente (tampón de homogeneización A para el hígado y tampón de homogeneización AT para cerebro y corazón) según se detalla en la Tabla 7. El protocolo seguido, independientemente del tejido, es el siguiente:

- El tejido se sumerge en tampón de homogeneización frío inmediatamente después de su extracción del animal eutanasiado. Todo el procedimiento posterior se lleva a cabo a 4°C en cámara fría.
- Disgregar el tejido sumergido cortando en pequeños fragmentos y lavar 3 veces con tampón de homogeneización fresco para eliminar cualquier resto de sangre, pelo etc.
- Resuspender el tejido troceado en un volumen final de 5 mL de tampón de homogeneización.
- Homogeneizar el tejido en un homogeneizador tipo *Dounce* hasta obtener una mezcla de aspecto homogéneo (aproximadamente 10-15 golpes de homogeneización).
- Centrifugar el homogenado en tubos cónicos de 15 mL a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga *Sorvall RC6plus* (ThermoFisher Scientific) con un rotor *Fiberlite™ F21-8 x 50y Fixed-Angle Rotor* (ThermoFisher Scientific)
- Transferir el sobrenadante a un tubo en centrífuga de fondo redondo apto para alta velocidad de 50 mL.

- Resuspender el *pellet* en otros 5 mL de tampón de homogeneización y volver a homogeneizar (en el caso del hígado no es necesario volver a homogeneizar el *pellet* y este se descarta tras la primera ronda de homogeneización).
- Centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Combinar ambos sobrenadantes en el mismo tubo de centrifuga de 50 mL y centrifugar a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C.
- El *pellet* enriquecido en fracción mitocondrial obtenido se resuspende en 8 mL del tampón de homogeneización correspondiente y se reparte en 8 tubos de 1,5 mL que se lavan y se combinan entre sí en sucesivas rondas de lavado hasta obtener todo el *pellet* enriquecido en la fracción mitocondrial en un solo tubo de 1,5 mL.
- Finalmente, el *pellet* se resuspende en 1 mL de tampón MAITE y se separan 20 µL para medir la concentración de proteína.
- El *pellet* puede utilizarse en el momento o almacenarse congelado a -80°C hasta su posterior uso.

Tampón	Volumen (mL)	Concentración final
<i>A (Hígado)</i>	Sacarosa	320 mM
	EDTA	1 mM
	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
<i>AT (Cerebro y corazón)</i>	Sacarosa	75 mM
	d-sorbitol	225 mM
	EGTA	1 mM
	Tris-HCl	10 mM
	BSA (libre de ácidos grasos)	0,15 % (P/V)

Tabla 7: Composición de los tampones de homogeneización utilizados para el aislamiento de mitocondrias procedentes de tejido de ratón.

4.3 Cuantificación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteína en los homogenados, tanto de células como de tejidos, se realiza normalmente mediante una variación del método de Bradford¹⁸⁰. En esta, se prepara una recta patrón de diferentes concentraciones conocidas partiendo de una solución acuosa de albúmina de suero bovino (BSA) a 2mg/mL.

A partir de esta se preparan una serie de diluciones seriadas en el tampón en el que se encuentre la muestra cuya concentración se desea determinar, hasta obtener los puntos de la recta 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 y 1 mg/mL de BSA. La determinación se lleva a cabo en placas de 96 pocillos *Microtest Plate 96 Well F*, (SARSTEDT, 2024-09-30). En cada pocillo se añaden 5 μ L de muestra problema por triplicado y 5 μ L de cada punto de la recta patrón también por triplicado y se añaden 250 μ L del reactivo *Coomassie Protein Assay Reagent* (ThermFisher, 23200). Este es un colorante hidrofóbico que cuando se encuentra en medio acuoso es de color marrón y cuando pasa a un ambiente hidrofóbico, como puede ser el interior de una proteína y, se encuentra en un medio ácido, sufre una reacción química por la que pasa a ser de color azul y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. La mezcla de proteína y *Coomassie* se incuba durante 5 minutos a TA y se determina la absorbancia a 590 nm. La concentración de la muestra problema se determina extrapolando la absorbancia obtenida con la recta patrón. Sin embargo, cuando se trata de muestras que presentan una alta concentración de detergente, el método anteriormente descrito no suele ser eficiente, ya que el detergente, al tener una larga cola hidrofóbica, suele interferir con la determinación de proteína dando una elevada intensidad de color azul.

En estos casos o bien diluimos la muestra previamente en medio acuoso o se utiliza el kit comercial *DCTM Protein Assay Reagent (BIO-RAD Laboratories Inc.)* modificado del tradicional método Biuret para la cuantificación de proteínas. El método se basa en la reacción del Cu^{2+} con el enlace peptídico de las proteínas de la muestra que resulta en la aparición de un color púrpura cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Para la determinación se sigue el protocolo indicado en el kit y la concentración de proteína se determina en función de la absorbancia obtenida a 630 nm y por extrapolación con la curva patrón de BSA.

5. Métodos de clonaje.

5.1 Vectores plasmídicos utilizados y obtención del cDNA de interés.

5.1.1 pcDNA™ 3.1 (+).

El vector pcDNA™ 3.1 (+) (Figura 29) (*invitrogen™*) es un plásmido de 5,4 kb derivado del pcDNA™ 3 (*invitrogen™*) que ha sido diseñado para inducir un alto nivel de expresión tanto de forma estable como transitoria en células de mamífero. El plásmido contiene los siguientes elementos:

- Promotor temprano de citomegalovirus (CMV) que promueve un alto nivel de expresión en la gran mayoría de células de mamífero.
- *Multiple Cloning Site* (MCS) en *forward* y *reverse* para facilitar la clonación.
- Gen de resistencia a Ampicilina para la selección en bacterias
- Gen de resistencia a Neomicina para la selección en células eucariotas.

En el laboratorio se disponía de un plásmido pcDNA™ 3.1 (+) al que previamente se le había introducido la secuencia del cDNA humano de la NDUFA10 junto con un Flag *tag* en su extremo C-terminal, por lo que este plásmido se utilizó como vector donador de dicha secuencia.

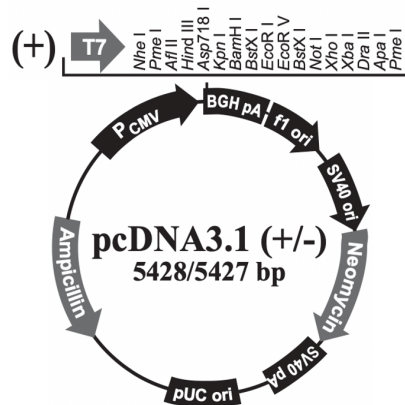


Figura 29: Representación esquemática del plásmido pcDNA™ 3.1 (+). Se muestra el plásmido sin el inserto del cDNA NDUFA10-Flag, el cual se introdujo justo a continuación de la secuencia MSC utilizando las dianas NheI/XbaI (*invitrogen™*, 2010).

5.1.2 Obtención del cDNA humano de la NDUFA10-Flag a partir del pcDNA 3.1 (+).

Como se ha mencionado anteriormente, en el laboratorio se disponía previamente del cDNA humano de la NDUFA10 fusionado con la secuencia Flag en su extremo C-terminal (DYKDDDDK), clonado en el plásmido de expresión pcDNA 3.1 (+). Este plásmido se utilizó como vector donador del cDNA en cuestión.

Para la extracción del cDNA, se realizó una doble digestión del plásmido con las enzimas de restricción XbaI y NheI, esperando obtener dos fragmentos de 5.322 y 1.126 pb. La digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C y posteriormente se inactivó por exposición a elevada temperatura durante 20 minutos a 80°C. La composición de la mix de reacción se muestra a continuación (Tabla 8).

El producto obtenido tras la digestión se separó en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. El fragmento resultante de 1.126 pb se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio y purificó del fragmento de gel de interés.

<i>Reactivo</i>	Volumen (μL)	Concentración final
<i>NEBuffer 2.1¹ 10X</i>	20	1x
<i>XbaI²</i>	2	1 U/μL
<i>NheI³</i>	2	0,1 U/μL
<i>pcDNA 3.1 (+)</i>	25 (32 ng)	0,16 ng/μL
<i>Agua</i>	151	-
<i>Volumen final</i>	200	

¹50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 μg/mL BSA; pH 7,9

²100.000 U/mL, Biolabs, R0145T

³10.000U/mL, Biolabs, R0131L

Tabla 8: Composición de la mezcla de reacción para la digestión del pcDNA 3.1 (+).

5.1.3 Purificación del cDNA NDUFA10-flag en geles de agarosa.

Para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de una digestión enzimática, en primer lugar, separamos los fragmentos de DNA generados por tamaño mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa. El gel se prepara conteniendo bromuro de etidio que permite teñir el DNA durante su migración. A continuación, el gel se expone a una fuente de luz ultravioleta de baja intensidad (longitud de onda larga) para detectar las bandas que se han generado y evitar inducir mutaciones en el fragmento y, con un bisturí, se recorta la banda del tamaño indicado.

Para la purificación se emplea el kit de extracción *QIAquick® Gel Extraction Kit (QUIAGEN)* que permite purificar fragmentos de DNA de entre 70 pb y 10 kb.

El proceso consta de un primer paso en el que se diluye del fragmento de agarosa que contiene el DNA de interés en un *buffer* con indicador de pH, seguido de una purificación mediante cromatografía de afinidad en membrana de sílice con un tampón de alto contenido en sal (que favorece la adsorción del DNA a la membrana de sílice), un lavado para eliminar impurezas y un paso final de elución del DNA con agua.

5.1.4 pLKO1.

El plásmido p-LKO1 (Figura 30) (*MISION® shRNA - Sigma-Aldrich™*-) se utilizó para la producción de partículas lentivirales y la posterior transducción de células HeLa con el objetivo de obtener clones estables que expresen la proteína NDUFA10-Flag. El plásmido utilizado había sido modificado previamente para sustituir el promotor hPGK por el promotor CMV e incorporar un MCS más completo que facilite el clonaje de fragmentos de DNA (*cedido por el Dr. Villena, Laboratorio de Diabetes y Metabolismo, VHIR*). En este p-LKO1 modificado se subclonó el cDNA humano de la proteína NDUFA10- Flag extraído del vector donador pcDNA 3.1 (+).

El plásmido p-LKO1 confiere resistencia a Ampicilina (*GOBEMICINA®. Laboratorios Normon*) y Puromicina (*Gibco® by Life Technologies™*) para la selección en bacterias y células eucariotas respectivamente.

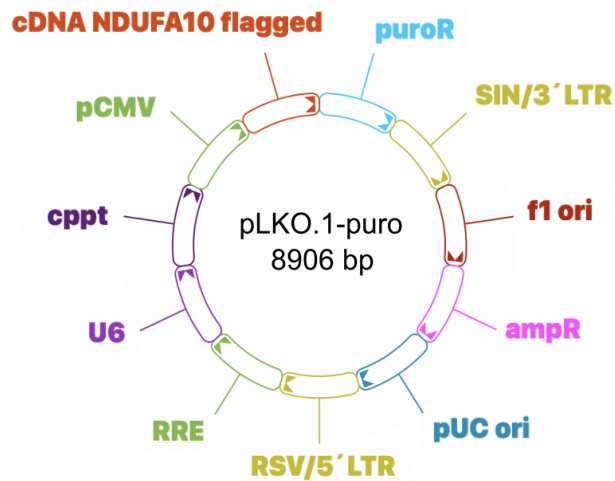


Figura 30: Representación esquemática del plásmido pLKO1. En la figura se muestran los elementos más representativos del plásmido. Para el clonaje del inserto conteniendo el cDNA NDUFA10-Flag se utilizaron las dianas de restricción NheI/XbaI. Los elementos no aparecen a escala en la imagen.

5.1.5 Vectores *helper* de empaquetamiento pMISSIONgagpol y pMISSIONvsvg.

Los vectores de empaquetamiento pMISSIONgagpol y pMISSIONvsvg (*MISSION® shRNA - Sigma- Aldrich™*-) se utilizaron como vectores complementarios al pLKO1 ya que dirigen la expresión de los elementos necesarios para la formación y ensamblaje de las partículas lentivirales.

El plásmido pMISSIONvsvg (Figura 31 A) contiene la secuencia VSV-G, que codifica la glicoproteína vesicular del virus de la estomatitis G, la cual es necesaria para formar la envoltura vírica.

El plásmido pMISSIONgagpol (Figura 31 B) contiene las secuencias:

- gag: proteína estructural precursora de las partículas lentivirales que contiene componentes de la matriz, cápside y nucleocápside.
- pol: Proteína codificante para la transcriptasa reversa vírica y componentes integradores.
- tat: Secuencia trans-activadora de la transcripción.
- rev: Secuencia que facilita la expresión nuclear de los genes virales.

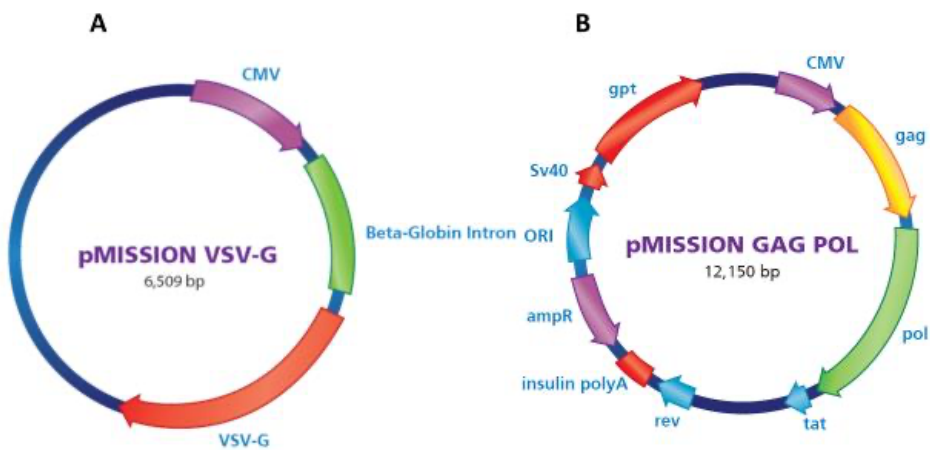


Figura 31: Vectores de empaquetamiento pMISSIONgagpol y pMISSIONvsvg. Representación esquemática de los vectores de empaquetamiento pMISSIONvsvg (A) y pMISSIONgagpol (B) utilizados para el empaquetamiento de las partículas lentivirales generadas. Vectores comerciales obtenidos de *Sigma-Aldrich*.

5.2 Clonaje del cDNA NDUFA10-Flag en el vector pLKO.1.

En primer lugar, el vector pLKO1 se sometió a una doble digestión con las mismas enzimas de restricción que se habían empleado para extraer el cDNA del plásmido donador (XbaI y NheI).

La digestión se lleva a cabo durante 2 horas a 37°C. La composición de la mix de reacción se muestra a continuación (Tabla 9):

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
<i>Buffer NEB</i> ¹ 10X	20	1x
<i>Xba</i> I ²	2	1 U/μL
<i>Nhe</i> I ³	2	0,1 U/μL
<i>pLKO1</i>	167 (50 mg)	0,25 ng/μL
<i>Agua</i>	9	-
<i>Volumen final</i>	200	

¹50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 μg/mL BSA; pH 7,9

²100.000 U/mL, Biolabs, R0145T

³10.000U/mL, Biolabs, R0131L

Tabla 9: Composición de la mezcla de reacción para la digestión inicial del pLKO.1.

A continuación, se defosforila el producto de digestión para evitar que los dos extremos libres se vuelvan a reanillar (no se realizó una purificación preparativa en gel de agarosa). Para esto, se utilizó el kit *Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche®)*, incubando la mix de reacción (Tabla 10) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se inactivó por calor incubando a 75°C durante 5 minutos.

A continuación, se procedió a la ligación con cDNA NDUFA10-Flag en el pLKO.1. Para ello se utilizó también el kit comercial *Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche®)*, utilizando una relación molar 1:2 entre el plásmido y el inserto en cuestión. La composición de la *mix* de ligación se muestra a continuación (Tabla 11):

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
<i>pLKO1 digerido</i>	8,5 μL	0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>rApid Alkaline Phosphatase Buffer 10X</i> ¹	2 μL	1X
<i>rApid Alkaline Phosphatase</i> ²	1 μL	0,05 U/ μL
Agua	8,6 μL	
Volumen final	20 μL	-

¹ 0,5M Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,5

² 1U/ μL Roche®

Tabla 10: Composición de la mezcla de reacción para la defosforilación del pLKO.1 digerido.

Reactivo	Volumen	Concentración final
<i>pLKO1 defosforilado (25 ng/μL)</i>	1 μL	1,25 ng/ μL
<i>cDNA NDUFA10 purificado</i> ¹	2 μL	-
<i>DNA Dilution Buffer 5X</i>	2 μL	1X
Agua	5 μL	-
<i>T4 DNA Ligation Buffer 2X</i>	10 μL	1X
<i>T4 DNA Ligase</i> ²	1 μL	0,1 U/mL
Volumen final	20 μL	

¹La concentración varía en función de la purificación

²5 U/mL, Roche®

Tabla 11: Composición de la mezcla de reacción para la ligación del cDNA NDUFA10-Flag en el pLKO.1.

5.3 Transformación de células quimiocompetentes.

Para amplificar y obtener clones individuales del plásmido de interés se transformaron células de *E.Coli* quimiocompetentes comerciales de las que se disponía previamente congeladas en una solución de glicerol al 10% (v/v)

a -80°C . La cepa de *E.Coli* quimiocompetente que se empleó fue la *E.Coli XL10-Gold Ultracompetent (200314, Agilent)*. Para la transformación se descongelaron varias alícuotas de *E.Coli* de $100\ \mu\text{L}$ y se incubaron junto con $10\ \mu\text{L}$ del producto de ligación obtenido durante 30 minutos en hielo. A continuación, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 30 segundos y rápidamente se volvió a incubar en hielo durante 2 minutos. Finalmente, se añadieron $250\ \mu\text{L}$ de medio Luria Bertani (LB) líquido (*Luria Broth Base, 12795- 027 invitrogenTM*) y la mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación constante a 180 rpm. Al día siguiente, todo el volumen se sembró en placas de LB-Agar (*BactoTM Agar, 214010 Becton Dickinson*) a una concentración del 2% (p/v) suplementado con Ampicilina a una concentración de $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ para la selección de los clones que hubiesen incorporado el producto de ligación de interés. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C .

5.4 Selección y amplificación de los clones de interés.

Al día siguiente, los clones que hayan crecido en las placas suplementadas con antibiótico son potencialmente de interés pues habrán incorporado el plásmido que confiere la resistencia al antibiótico empleado para la selección. Cada colonia observada en la placa se recogió con un asa de *Kolle* esterilizada previamente y se sembró en 5 mL de medio LB líquido suplementado con $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de Ampicilina para seguir manteniendo la presión de selección durante toda la noche a 37°C . Finalmente realizamos la extracción del DNA plasmídico de los cultivos que hayan incorporado la resistencia antibiótica en un proceso comúnmente denominado *Miniprep*.

5.5 Extracción de DNA plasmídico por *Miniprep*.

La Miniprep permite obtener DNA plasmídico a pequeña escala procedente de un cultivo de bacterias. Para ello, utilizamos el kit comercial *Illustra™ plasmidPrep MiniSpin Kit (28-9042-70, GE Healthcare)*. El protocolo está basado en una lisis alcalina inicial de las células en cuestión, seguido de una separación del DNA por cromatografía de afinidad en membrana de sílice. El DNA adherido a la membrana se lava para eliminar impurezas y finalmente se eluye en agua. Una vez obtenido el DNA de interés se debe comprobar que la secuencia obtenida es correcta mediante restricción y secuenciación de los productos obtenidos.

5.6 Comprobación del DNA plasmídico obtenido por Miniprep.

Los plásmidos obtenidos se comprobaron por análisis de restricción con diferentes enzimas. Los diferentes productos de digestión se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Las enzimas empleadas y los tamaños de los fragmentos de DNA esperados se resumen en la Tabla 12.

Plásmido	Digerido con	Fragmentos esperadas (pb)
<i>pLKO1 NDUFA10-Flag</i>	XbaI / NheI	5.006/3.900
<i>pLKO1 NDUFA10-Flag</i>	ApaI	7.917/741/248
<i>pMISSIONvsug</i>	ApaI	6.509
<i>pMISSIONvsug</i>	BglII	6.509
<i>pMISSIONgagpol</i>	XbaI	12.150
<i>pMISSIONgagpol</i>	NheI	12.150

Tabla 12: Enzimas de restricción empleadas y patrones de digestión esperados para cada plásmido.

Igualmente, los plásmidos obtenidos también fueron comprobados por secuenciación *Sanger*, utilizando el servicio de secuenciación ofrecido por *Macrogen*, utilizando *primers* cubriendo la secuencia de interés (del cDNA NDUFA10-Flag y resistencia a puromicina) en ambas direcciones 5' y 3' (Tabla 13) (Figura 32).

Nombre	Secuencia
Forward (Fw)	5' AGGTGAAGAGCGTCACCATC 3'
Reverse (Rv)	5' CTCCGAGTCACTTATCATCATCATCCTTATAATCCTTCAGCCAGATCCACT 3'
Forward a (Fwa)	5' AAGCTTGGTACCATGGCCTTGCGGCTCCTGAA 3'
Reverse b (Rvb)	5' CACAAACACCTTGTCTGTGG 3'

Tabla 13: *Primers* utilizados para la secuenciación del plásmido pLKO1 NDUFA10-Flag.

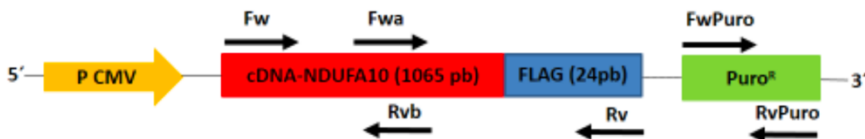


Figura 32: Posición ocupada por los *primers* utilizados en la secuenciación sobre los elementos de interés en el plásmido pLKO1 NDUFA10-Flag.

Los clones que resultaron ser positivos se conservaron para su utilización posterior. Para ello, se crecieron cultivos frescos en LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina durante toda la noche a 37°C y con agitación constante de 180 rpm para expandir el cultivo. A la mañana siguiente se congelaron rápidamente a -80° o nieve carbónica en 15% glicerol para su conservación, sirviendo para generar nuevos cultivos en el momento deseado. Uno de los clones se seleccionó para el trabajo posterior. Esta construcción se comprobó además de por análisis de restricción, mediante secuenciación. Para ello, se creció en 250 mL de LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina durante toda la noche a 37°C y con agitación

constante de 180 rpm para expandir el cultivo y purificar el DNA plasmídico por *Maxiprep*.

5.7 Extracción de DNA plasmídico por Maxiprep.

La Maxiprep permite obtener DNA plasmídico a gran escala a partir de cultivos bacterianos de interés, por lo que se utiliza cuando sea necesario obtener grandes cantidades de dicho DNA.

La extracción se realizó mediante el kit comercial *E.Z.N.A. Endo-Free Plasmid DNA Maxi Kit (D6926-04, OMEGA bio-tek™)*. El protocolo está basado en una lisis alcalina de las células bacterianas seguida de una separación del DNA por cromatografía de intercambio iónico en membrana de sílice y su posterior elución de la membrana. El kit permite obtener DNA libre de endotoxinas bacterianas que podrían afectar en futuras aplicaciones.

5.8 Producción de vectores lentivirales.

Con el objetivo de obtener una línea celular estable humana que exprese la proteína NDUFA10-Flag se decidió optar por el empleo de vectores lentivirales debido a su elevada capacidad infectiva y capacidad de integrarse en el genoma de la célula, lo que aumenta considerablemente la eficiencia de transformación de las células replicativas en cultivo. Se trata de unos vectores modificados que son defectivos en algunos elementos lo que impide su capacidad replicativa en células normales. Estos elementos se aportan a través de vectores *helper* y células de empaquetamiento.

La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo utilizando la línea celular HEK-293T, que contiene el antígeno SV40, el cual permite la replicación de plásmidos transferidos y una expresión prolongada en el

tiempo de estos productos génicos. El proceso está basado en la cotransfección de las células en cuestión con el plásmido de transferencia pLKO1 y los dos plásmidos *helpers*, pMISSIONgagpol y pMISSIONvsvg, en presencia de Polietilenimina (PEI) (*Polysciences, Inc.*). Las células HEK-293T se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² (T75) a una confluencia del 80-90% (aproximadamente 20 x 10⁶ células totales) y se les permitió adherirse a la superficie durante 8-10 horas. Pasado este tiempo las células están listas para ser transfectadas y se preparó la *mix* de transfección según se recoge en la Tabla 14. Las células junto con la *mix* de transfección se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Reactivo	T75	Concentración final
NaCl 150 mM	1.500 µl	20 µl/cm ²
pLKO1 NDUF10-Flag / pLKO1 vacío	7,5 µg	100 ng/ cm ²
pMISSIONvsvg	1,5 µg	20 ng/ cm ²
pMISSIONgagpol	4,5 µg	60 ng/ cm ²
PEI ¹	75 µl	1 µl/ cm ²

¹1 mg/mL, pH 7,4 y filtrado a 0,22 µm

Tabla 14: Composición de la *mix* de transfección.

Pasado el tiempo de incubación, cambiamos el medio al cultivo celular para eliminar posibles restos celulares y se añade la mezcla de DNA-PEI, (*mix* de transfección) distribuyendo la solución de forma homogénea sobre la superficie del cultivo. Las células se incuban durante toda la noche a 37°C con la mezcla.

Al día siguiente cambiamos el medio de cultivo por medio fresco y incubamos hasta 72 horas post-transfección, momento en el cual tiene lugar la máxima producción y liberación al medio de partículas lentivirales.

En este momento iniciamos la recolección de las partículas que se van produciendo. Para esto, recogimos los 12 mL totales de medio condicionado post-transfección y añadimos 6 mL de medio fresco al cultivo productor, que se incubaba durante 8 horas más a 37°C. A las 8 horas recogimos de nuevo el medio que contiene más partículas lentivirales y se substituye por otros 12 mL de medio de cultivo fresco que se incubaba durante 16 horas más a 37°C. Finalmente se obtienen 30 mL de medio condicionado que contiene las partículas lentivirales que servirán para transducir líneas celulares no empaquetadoras.

5.9 Transducción de vectores lentivirales en células HeLa.

Las células HeLa fueron las elegidas para la transducción con las partículas lentivirales generadas para obtener la línea celular estable que expresase la proteína NDUFA10-Flag. Para esto, utilizamos los medios condicionados post-transfección obtenidos de las HEK-293T empaquetadoras transfectadas con el pLKO1 NDUFA10-Flag y pLKO1 vacío. Los medios se transfirieron directamente a un T75 conteniendo células HeLa a un 80% de confluencia (18×10^6 células totales). Transcurridas 48 horas de incubación de las células HeLa con el medio que contenía las partículas lentivirales se inició el proceso de selección de las células que habían sido transducidas mediante la adición al medio de cultivo de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Puromicina. Tras un periodo de una semana, las células que habían sobrevivido eran resistentes a puromicina y por tanto mostraban haber sido eficientemente transducidas. Finalmente, disminuimos la concentración de Puromicina en el medio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración que se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo para someter a las células a una presión de selección constante.

5.10 Comprobación de los clones estables seleccionados.

Para comprobar que los clones seleccionados contenían de manera correcta la secuencia genética de la NDUFA10-Flag se utilizaron los mismos *primers* que se recogen en la Tabla 13 (Figura 32), con el objetivo de amplificar por PCR las secuencias Flag y de resistencia a puromicina. Del mismo modo se comprobó mediante Western-Blot que los clones seleccionados con el constructo NDUFA10-Flag producían la proteína de interés mediante el uso de anticuerpos Anti-NDUFA10 y Anti-Flag.

6. Purificación de proteínas por afinidad.

6.1 *Pull-Down* con dNTPs inmovilizados en resina.

Los ensayos de *Pull-Down* son un tipo de ensayo *in-vitro* que se utilizan para determinar interacciones físicas entre proteínas o bien entre una proteína y un sustrato y que se suelen utilizar como método de *screening* para identificar posibles interacciones desconocidas entre proteínas. Son métodos similares a una inmunoprecipitación en los que el anticuerpo se reemplaza por otro sistema de afinidad diferente para favorecer la interacción con la o las proteínas de interés^{181,182} (Figura 33).

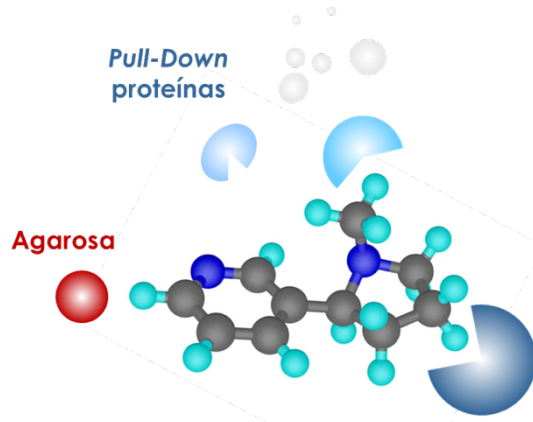


Figura 33: Representación esquemática de los elementos que intervienen en un *Pull-Down* de proteínas. En rojo se muestra la agarosa a la que se encuentra conjugada la molécula frente a la que la proteína en cuestión muestra afinidad; La estructura química que se representa en esferas azules y grises representa el nucleótido por el que las proteínas muestran la afinidad.

En este caso se pretendía identificar posibles interacciones de proteínas mitocondriales con dGTP. Por ello, utilizamos una resina conjugada a dGTP además de otras con dTTP o dCTP que nos servirían como control de especificidad. Las resinas empleadas fueron las siguientes:

- *Immobilized γ -amino-octyl-dGTP (Jena Bioscience #AC-112L)*
- *Immobilized γ -amino-octyl-dTTP (Jena Bioscience #AC-115L)*
- *Immobilized γ -amino-octyl-dCTP (Jena Bioscience #AC-108L)*

En estas resinas los nucleótidos se encuentran conjugados a través de su fosfato γ a una molécula que actúa como linker (amino-octyl) y lo mantiene unido de forma covalente a las esferas (*beads*) de agarosa. De este modo, el nucleótido (desde su base nitrogenada) queda expuesto a la muestra que deseamos testar. Para llevar a cabo el *Pull-Down* partimos de un *pellet* de 5 mg de mitocondria que se sometió a un proceso de lisis en tampón de unión (0,2 M NaCl; 75 mM Hepes pH 7,9; 10 mM EDTA; 5 % glicerol; 0,02 % DDM) suplementado con inhibidores de proteasas (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, cOmplete™, Sigma-Aldrich*) e inhibidores de fosfatasa (*PhosSTOP™ EASYpack, Sigma-Aldrich*) a una concentración final de 1 mg/mL durante 15 minutos en hielo. A continuación, el lisado se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar posibles restos no solubilizados y el sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL. A continuación, el lisado libre de restos no solubilizados se sometió a un proceso de *pre-clearing* para descartar posibles uniones inespecíficas a la matriz de agarosa. Para ello, lo incubamos con una resina de agarosa control (*Blank*) (*Jena Bioscience® #AC-001L*) a razón de 60 μ L de matriz de agarosa/mg de proteína en el lisado. La incubación se llevó a cabo durante 45 minutos a 4° y a continuación 15 minutos más a temperatura ambiente manteniendo una agitación suave constante (agitador orbital). Transcurrido el tiempo de incubación el lisado se centrifugó a 1.000 g durante 2 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL para eliminar las *beads* de agarosa.

En el siguiente paso, el lisado libre de proteínas que puedan generar uniones inespecíficas se incubó con las resinas conjugadas a nucleótido (60 μ l

matriz/mg de proteína en el lisado). Las resinas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de 45 minutos a 4°C manteniendo una agitación suave constante (agitador orbital) Transcurrida la incubación, lavamos cuatro veces las resinas con 5 mL de tampón de lavado (0,2 M NaCl; 75 mM Hepes pH 7,9; 100 mM EDTA; 5% glicerol; 0,002% DDM), una vez con 3 mL y, por último, con 1 mL. Finalmente, las proteínas retenidas en la resina se eluyeron con un volumen 1:1 (*beads*:tampón) de tampón de elución (95 mM dGTP; 0,2 M NaCl; 1 mM DTT; 75 mM Hepes pH 7,9) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El resultado de la purificación se comprobó mediante tinción con plata y Coomassie coloidal. La identificación de las proteínas reveladas tras la tinción se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS-Orbitrap). Los péptidos resultantes se buscaron en la base de datos UniprotKB/Swissprot de *Mus musculus*, usando el programa Mascot (Matrix Science, London, UK) en el servicio de proteómica del Vall d'Hebron Institut d'Oncologia. En ensayos posteriores, tras la identificación de NDUFA10 como proteína de interés, se estudiaron los eluidos de la purificación mediante western-blot e inmunodetección con anticuerpos específicos.

6.2 Inmunoprecipitación Anti-Flag.

Con el objetivo de purificar la proteína NDUFA10, realizamos una inmunoprecipitación con resina conjugada al anticuerpo Anti-Flag. Disponíamos de una línea celular HeLa que expresa dicha proteína conjugada con un Flag *tag* en su extremo C-terminal (HeLa^{Flag}). Para la inmunoprecipitación, inicialmente crecimos 10 placas de 150 mm de diámetro de estas células hasta alcanzar su confluencia realizamos la correspondiente extracción de mitocondrias (según lo descrito en el apartado 4.2 de esta sección).

Una vez obtenido el *pellet* de mitocondrias este se congela a -80°C . El proceso de crecimiento y extracción se realiza hasta conseguir cinco *pellets* de mitocondria (aproximadamente 10 mg de proteína mitocondrial.).

Una vez que dispusimos de suficiente material de partida, resuspendimos los cinco *pellets* mitocondriales en un volumen final de 3 mL de tampón de lisis (150 mM NaCl; 1 % Tritón X-100; 0,5 % desoxicolato sódico; 50 mM Tris pH 7,4) suplementado con inhibidores de proteasas (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, cOmplete™, Sigma-Aldrich*) e inhibidores de fosfatasa (*PhosSTOP™ EASYpack, Sigma-Aldrich*). La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo para garantizar la lisis completa del *pellet* de mitocondrias y transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C . Transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo y recogimos una alícuota de 50 μl para medir la concentración de proteína mitocondrial obtenida, a fin de llevar el lisado a una concentración de 1 mg/mL en tampón de lisis. Como paso previo a la inmunoprecipitación, incubamos el lisado mitocondrial con *beads Mouse IgG Agarose (Sigma-Aldrich® - A0919)* a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína en el lisado durante 1 hora a 4°C para eliminar posibles proteínas de unión inespecífica (*pre-clearing*). Transcurrido el tiempo de incubación, centrifugamos el lisado a 1.000 g durante 5 minutos y a 4°C para sedimentar las *beads Mouse IgG Agarose* y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo en el que se realiza la inmunoprecipitación Anti-Flag propiamente dicha. Para ello, el lisado se incubó con *ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich® #M8823)* a una concentración de 30 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteína en el lisado durante 2 horas a 4°C . En este caso las *beads* son magnéticas, lo que permite separarlas fácilmente del lisado con un imán sin necesidad de centrifugación. Una vez separadas las *beads*, descartamos el sobrenadante y las lavamos.

Realizamos 6 lavados de 10 minutos con 1 volumen de tampón de lisis a 4°C. Finalmente, realizamos la elución de la proteína retenida en las *beads* mediante la adición del péptido 3xFlag a una concentración de 150 ng/μL en TBS (150 mM NaCl; 50mM Tris-HCl pH 7,4) suplementado con inhibidores de proteasas, que compete por la unión al anticuerpo y desplaza las proteínas retenidas. Añadimos un volumen de 3XFlag por volumen de *beads* (*beads*:3xFlag). La proteína eluída se conserva a -80°C para futuros experimentos. La eficiencia y especificidad de la inmunoprecipitación se comprobó por Western-Blot e inmunodetección de la proteína NDUFA10

6.3 Inmunoprecipitación del complejo I mitocondrial.

En este tipo de inmunoprecipitación se utiliza una mezcla comercial de anticuerpos frente al complejo I mitocondrial con el objetivo de poder “capturar” el complejo en estado nativo. Para ello, partimos de un *pellet* de 5 mg de mitocondria de hígado de ratón que se solubilizó en tampón de lisis (PBS 1X; DDM 1% (p/v), Anti-Proteasas 1X; Anti-fosfatasa 1X) durante 30 minutos en hielo. Finalizado el tiempo de incubación, el lisado se centrifugó a 25.000 g durante 30 minutos a 4°C para sedimentar posibles restos de membrana y otros componentes no solubilizados. El DDM es un detergente no iónico que presenta capacidad para extraer proteínas de naturaleza hidrófoba, pero que al porcentaje utilizado, mantiene la conformación nativa de las proteínas en solución, por lo que es un detergente adecuado para lisar la membrana mitocondrial manteniendo intacta la estructura nativa de los complejos mitocondriales.

El sobrenadante se divide en dos partes iguales en volumen. Una de estas partes se utiliza como control negativo del proceso de inmunoprecipitación y se incuba con proteína G conjugada a una resina de agarosa a una concentración de 15 μL/mg (*Immobilized Protein G Agarose Beads* -#

ab174816, Abcam-). La otra parte se sometió al proceso de inmunoprecipitación propiamente dicho con la mezcla comercial de anticuerpos frente al complejo I mitocondrial a una concentración de 150 µg/mg (*Complex I Immunocapture Kit - #ab109711*, Abcam-). Ambas incubaciones se realizaron durante toda la noche a 4°C en un orbital con movimiento constante. Al día siguiente, ambas se lavaron dos veces durante 10 minutos a 4°C con tampón de lavado (PBS 1X; 0,5% DDM) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Una vez completados los lavados, separamos una alícuota de 50 µL de ambas fracciones para monitorizar la eficiencia de la inmunoprecipitación por western blot e inmunodetección. Finalmente, se eluyen, de manera desnaturante, las proteínas que hayan quedado capturadas en la proteína G y el cocktail de anticuerpos frente al complejo I con 300 µL de TCA 0,5 M para a continuación someter a los eluidos a una extracción ácida de dNTPs.

6.4 Cuantificación de proteínas inmunoprecipitadas: Tinción de geles de poliacrilamida con *Coomassie* Coloidal.

Dado que la cantidad de proteína que se obtiene en una inmunoprecipitación no suele ser suficiente como para determinar su concentración por el método tradicional de cuantificación de proteínas por *Bradford*, se utilizó un método alternativo basado en la tinción de geles de poliacrilamida con *Coomassie* Coloidal (*Coomassie Brilliant Blue G250 – Sigma-Aldrich-*) y la cuantificación relativa de la proteína de interés respecto a una curva estándar de BSA. Para esto, cargamos en un gel de poliacrilamida al 12% una curva de concentración creciente de BSA (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 ng BSA) junto con un volumen conocido (15 µL) del extracto inmunoprecipitado cuya concentración queríamos conocer.

El gel se resuelve por electroforesis SDS-PAGE durante 2 horas a 100 V. Terminada la electroforesis teñimos el gel con la solución de *Coomassie Coloidal*.

Para la tinción, en primer lugar, incubamos el gel durante 1 hora con agitación constante en solución de fijación (45% metanol; 1% ácido acético). Pasado este tiempo reemplazamos la solución de fijación por la solución de tinción (17% sulfato amónico; 0,1% *Coomassie Brilliant Blue G250*; 34% metanol; 0,5% ácido acético) e incubamos durante toda la noche en agitación. Al día siguiente se destiñe el exceso de colorante con varios lavados con agua destilada hasta que las bandas de proteína son claramente visibles respecto al fondo del gel. Finalmente, cuantificamos las bandas de proteína por densitometría y obtuvimos una curva patrón relacionando la concentración de proteína con la intensidad de cada banda, de forma que extrapolamos la concentración aproximada de proteína contenida en el extracto inmunoprecipitado.

7. Inmunodetección de proteínas por *Western-Blot*.

7.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con SDS (*SDS-PAGE*).

Se trata de un tipo de electroforesis en condiciones desnaturizantes que permite la separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en una trama de polímeros de acrilamida/bis-acrilamida en función de la carga eléctrica que les confiere el SDS y que es proporcional a la masa de la molécula, ya que el SDS se une a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4g de SDS/g de proteína)¹⁸³.

Para ello, preparamos de forma manual geles de poliacrilamida de 1,5 mm de grosor utilizando el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)*. Los geles están formados por un gel separador al 12% y un gel concentrador al 5% de poliacrilamida. En primer lugar, se prepara el gel separador, que será la parte en la que propiamente se resuelvan las proteínas, cuya composición se recoge en la siguiente tabla (Tabla 15):

Reactivo	Volumen
40% Acrilamida/Bis-acrilamida 37.5:1 (p/v)	3 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2,5 mL
SDS 10%	100 µl
Persulfato de amonio (APS) 10% (p/v)	100 µl
Agua destilada	4,5 mL
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina)	4 µl

Tabla 15: Composición del gel separador.

Una vez se ha preparado la mezcla esta se agita suavemente hasta asegurar su homogeneidad y se disponen 8 mL en el soporte previamente ensamblado para su polimerización. En la parte superior se añade agua destilada para prevenir el contacto con el oxígeno del aire que dificulta la polimerización y evitar imperfecciones en la zona que hará de transición entre el gel concentrador y separador, y se espera hasta su completa polimerización (aproximadamente 30 min). A continuación, se elimina el agua por decantación y se disponen 2 ml de la mezcla del gel concentrador, cuya composición se recoge en la tabla (Tabla 16) sobre el gel separador ya polimerizado insertando un peine que forma los pocillos que permitirán cargar las muestras, evitando la formación de burbujas. Se espera hasta la completa polimerización (aproximadamente 20 minutos).

Reactivo	Volumen
40% Acrilamida/Bis-acrilamida 375:1 (p/v)	375 µl
Tris-HCl 1.5M pH 6.8	380 µl
SDS 10%	30 µl
Persulfato de amonio (APS) 10% (p/v)	30 µl
Agua destilada	2,25 mL
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina)	3 µl

Tabla 16: Composición del gel concentrador.

La preparación de las muestras cuya concentración de proteína ha sido previamente cuantificada incluye separar la cantidad deseada de cada una e igualar hasta un volumen final de carga con el mismo tampón en el que se han preparado (en función de cada experimento). A continuación, añadimos un mismo volumen de de tampón de carga 2X (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS (p/v); 20% glicerol (v/v); 200 mM DTT; 0,1 % azul de bromofenol (p/v)) (volumen total máximo de 30 µL para permitir su desnaturalización,

proporcionar densidad y añadir un colorante que nos permita monitorizar el frente durante la electroforesis. Incubamos durante 10 minutos en un baño a 65°C para desnaturalizar las muestras y cargamos en el gel. En paralelo cargamos 10 µL del marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color -Bio-Rad-*) para monitorizar la migración. En el caso de no utilizar todos los pocillos, añadimos 20 µL de tampón de carga 2X en los vacíos para evitar alteraciones en la migración de los carriles contiguos. Por último, se lleva a cabo la electroforesis en tampón de electroforesis (192 mM glicina; 0,1% SDS (p/v); 25 mM Tris-HCl pH 8,3) con una corriente constante de 100-120 V hasta que se resuelven los pesos moleculares de interés, momento que suele coincidir con la desaparición del frente de la electroforesis del gel.

7.2 Electroforesis azul nativa o BN-PAGE.

El BN-PAGE es un caso especial de electroforesis que se desarrolla en condiciones no desnaturalizantes y que proporciona un alto grado de resolución a la hora de separar complejos proteicos procedentes de homogenados de tejidos o células. Permite separar complejos proteicos de entre 10 y 10.000 kDa¹⁸³.

En este caso, a diferencia del SDS-PAGE, se utiliza el *Coomassie G-250* para unirse a los complejos proteicos y conferirles una carga neta negativa, que será proporcional a su tamaño, manteniéndolos en su conformación nativa. El *Coomassie G-250* debe estar presente tanto en el tampón de electroforesis como en el tampón de carga de las muestras para mantener un flujo continuo de este durante toda la electroforesis.

Para la preparación de los extractos proteicos en condiciones nativas partimos de un *pellet* de 50 µg de mitocondria procedente de extractos

celulares o de tejidos de ratón. El pellet se resuspende a una concentración de 2 mg/mL en tampón MB2 (1,75 M ácido aminocaproico; 75 mM Bis-Tris; 2 mM EDTA; pH 7,0) al que le añadimos DDM hasta una concentración final en la muestra del 1% (p/v).

Solubilizamos las muestras durante 15 minutos en hielo y centrifugamos durante 20 minutos a 20.000 g a 4°C. Recuperamos el sobrenadante y añadimos el tampón de carga SBG (750 ácido aminocaproico; 5% *Coomassie Brilliant Blue G-250* (p/v)). Las muestras se cargan en geles comerciales en gradiente de acrilamida del 4-16% (*NativePAGE™ Novex®, Invitrogen*).

Para la electroforesis utilizamos el tampón *NativePAGE™ Running Buffer* (*Invitrogen*) que se dispone en el ánodo de la cubeta de electroforesis. Para el tampón del cátodo, el *Running Buffer* se suplementa con tampón *NativePAGE™ Cathode Buffer Additive* (*Invitrogen*, 0,4% de *Coomassie G-250*), a una concentración final del 0,02% (*Dark Blue Cathode Buffer*) hasta que el frente de electroforesis ha recorrido 1/3 del gel aproximadamente. En este momento, sustituimos el *Dark Blue Cathode Buffer* por el *Light Blue Cathode Buffer* (0,002% de *Coomassie Blue G250*) que se mantiene hasta el final de la electroforesis.

La electroforesis se inicia a 40 V durante 15 minutos y a continuación durante 1 hora a 80 V, hasta que el frente ha superado el primer tercio del gel. Finalmente elevamos el voltaje hasta los 100 V y lo mantenemos durante aproximadamente 4 horas más. Todo el proceso de electroforesis se realiza a 4°C para evitar el sobrecalentamiento de los componentes que podría alterar la migración.

7.3 Transferencia por *Western -blot*.

Una vez completada la electroforesis, ya sea mediante SDS-PAGE o BN-PAGE, se procede a la transferencia de las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida hasta una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 6 x 9 cm. Previo al proceso de transferencia la membrana de PVDF debe ser activada por inmersión en metanol durante un minuto. Se utiliza un sistema de transferencia húmeda en el que, en primer lugar, se colocan 2 esponjas y 4 filtros *Whatman* de 6 x 9 cm previamente empapados en tampón de transferencia (48 mM Tris-HCl; 39 mM glicina; 0,04% de SDS (p/v); 20% metanol (v/v)), a continuación, se coloca el gel de poliacrilamida y la membrana activada sobre este evitando en todo momento la formación de burbujas de aire. Finalmente se colocan otros 4 filtros *Whatman* y dos esponjas adicionales. Por último, se monta el “sándwich” creado en el casete de transferencia. El casete debe colocarse de manera que el gel quede orientado hacia el lado negativo de la cubeta, ya que las proteínas se desplazan desde el gel a la membrana desde el polo negativo al positivo. Todo el conjunto se cubre con tampón de transferencia y se somete a un amperaje de 400 mA durante 1 hora o de 80 mA durante toda la noche, en ambos casos a 4°C.

7.4 Inmunodetección y revelado.

Una vez completada la transferencia, la membrana de PVDF se bloquea durante 1 hora en 25 mL de solución de bloqueo (5% leche en polvo (p/v) en TTBS - 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; 20 mM Tris-HCl pH 7,6-) a temperatura ambiente y con agitación constante. Una vez bloqueada, la membrana se incuba con los anticuerpos primarios para las proteínas que se pretende detectar. Para ello, preparamos una dilución del anticuerpo en solución de bloqueo y se incuba durante toda la noche a 4°C (o 1h a

temperatura ambiente) en agitación constante. Al día siguiente la membrana se somete a dos lavados de 10 minutos en TTBS con agitación constante y se incuba con el anticuerpo secundario que reconocerá las IgGs de ratón (*P0260, Agilent*) o de conejo (*P0448, Agilent*), en función del animal en el que se haya generado el anticuerpo primario empleado, a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Estos anticuerpos secundarios están conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP), lo que permite su posterior detección por quimioluminiscencia.

Transcurrido el tiempo de incubación la membrana vuelve a someterse a dos lavados de 10 minutos en TTBS y se procede al revelado. Para ello, se incuba la membrana con 2 mL de una mezcla 1:1 de los dos reactivos del kit comercial *ImmobilonTM Western (WBKLS0500, Millipore)*, que provee los sustratos para la HRP conjugada en el anticuerpo secundario. Las imágenes del revelado se captan en el detector de quimioluminiscencia *ODYSSEY Fc (Li-COR)* con un tiempo de exposición variable en función del anticuerpo y abundancia relativa de la proteína de interés en las muestras analizadas (habitualmente entre 30 segundos y 2 minutos). Por último, se cuantifican las bandas obtenidas mediante un análisis densitométrico con el software *Image Studio Life v5.2 (Li-COR)*.

8. PCR cuantitativa en tiempo real.

La PCR cuantitativa en tiempo real (rt-qPCR) es una variante de la PCR convencional que se utiliza para amplificar y cuantificar simultáneamente y de forma absoluta el producto de la amplificación que está teniendo lugar. Se utilizan *primers* específicos para amplificar el gen de interés, así como sondas *TaqManTM* conjugadas a fluorocromos (FAM/VIC) que emiten fluorescencia a una longitud de onda determinada. La cuantificación de los amplicones se realiza en cada ciclo de PCR mediante detección de la fluorescencia generada. De esta manera, para un grupo de muestras cuyos amplicones se han obtenido en reacciones de PCR con eficacias equivalentes, detectamos un umbral de fluorescencia determinado, que será equivalente a la concentración del amplicón. En nuestro laboratorio utilizamos esta técnica para cuantificar el número de copias de mtDNA y los niveles de expresión relativa de mRNAs de interés.

8.1 Cuantificación del número de copias de mtDNA por rt-qPCR.

En el caso de la cuantificación de mtDNA, determinamos el número de copias de un gen mitocondrial respecto a un gen nuclear de copia única. Para ello se emplean una serie de *primers* y sondas específicas para cada gen que se quiera estudiar. Para determinar el número de copias del gen mitocondrial se analiza el *ratio* gen mitocondrial/gen nuclear. En este caso realizamos una cuantificación absoluta extrapolando el número de copias en las muestras problema a partir de una recta patrón constituida con estándares de número de copias conocido (a partir de plásmidos en los que se ha clonado el gen mitocondrial y nuclear que se analiza). El gen nuclear y mitocondrial que se analiza variará en función de si se trata de muestras de células humanas o de tejido de ratón.

8.1.1 Procesamiento del DNA.

Una vez que se ha extraído el DNA problema, ya sea procedente de células humanas o de tejido de ratón, se realizan diluciones 1/3 del DNA problema en Tris-HCl 10 mM pH 8. Para la reacción de rt-qPCR se analizan, por duplicado, tanto las muestras de DNA directas (a una concentración aproximada de entre 100 y 500 ng/ μ l) como sus respectivas diluciones 1/3, con el objetivo de detectar posibles interferentes en la amplificación.

8.1.2 Preparación de la placa de rt-qPCR.

Utilizamos placas de 384 pocillos compatibles con el termociclador y detector de fluorescencia utilizado. Para la reacción de amplificación propiamente dicha, se cargan en cada pocillo de la placa de rt-qPCR 7,5 μ L de mezcla de reacción y 2,5 μ L del DNA problema en este orden. La placa se sella con una lámina adhesiva y se realiza un *spin* para concentrar toda la muestra en el fondo del pocillo y garantizar la correcta lectura de fluorescencia. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador y detector de fluorescencia *ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)*.

Las condiciones de amplificación se detallan a continuación (Figura 34). Cuando se alcanza la temperatura de 60°C en cada ciclo de amplificación se realiza la lectura de la fluorescencia correspondiente. Finalmente, Para el análisis de los datos se utiliza el programa *SDS 2.4 (Applied Biosystems)*.

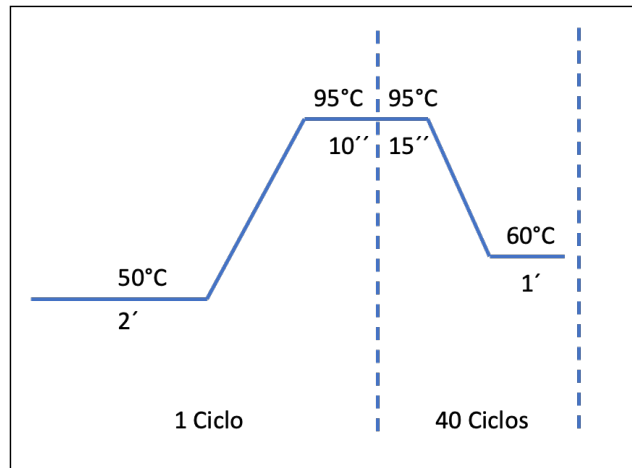


Figura 34: Condiciones de ciclos y temperaturas para la reacción de amplificación.

8.1.3 Cuantificación del número de copias de mtDNA en células humanas.

Para la cuantificación del número de copias de mtDNA en células humanas amplificamos como gen mitocondrial el rRNA ribosómico 12S (*MTRNR1*) y como gen nuclear de copia única el gen de la RNAsaP (*RPP40*). Se realiza una rt-qPCR de tipo *Multiplex* de forma que cada una de las sondas utilizadas presenta un fluorocromo diferente (FAM para rRNA 12S y VIC para RNAsaP) con espectros de emisión no solapantes que permiten realizar la lectura de las dos sondas de forma simultánea.

8.1.3.1 *Primers*, sondas y kit utilizado.

Para la cuantificación del gen *RPP40* (*RNASEP*) se utiliza el kit comercial *RNAsaP Control Reagent (VIC-Quencher TAMRA, Applied Biosystems)*. El kit contiene los *primers* y sonda necesarios para la amplificación del gen. Para la cuantificación del gen *MTRNR1* (rRNA12S) se utilizan los siguientes *primers* y sonda:

- *rRNA 12S Primer Forward*: CCACGGGAAACAGCAGTGAT (ntd 805-824¹)
- *rRNA 12S Primer Reverse*: CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA (ntd 903-927¹)
- *rRNA 12S Sonda*: FAM-5' TGCCAGCCACCGCG 3'-MGB (ntd 888-900¹)

¹Posición según la secuencia de referencia del mtDNA humano (NC_012920).

8.1.3.2 Preparación de la recta patrón.

Se prepara una recta patrón de número de copias conocido de los genes *rRNA 12S* y *RNAseP*. Para ello, se realizan diluciones seriadas en Tris-HCl 10 mM pH 8 a partir de un *standard* previamente cuantificado que contiene el amplicon clonado en un plásmido (STD) (Tabla 17). Cada punto de la curva patrón, así como los controles de contaminación (Tris-HCl 10 mM pH 8 y agua destilada (dH₂O)) se determinan por triplicado.

8.1.3.3 Mezcla de reacción.

Al tratarse de una reacción de tipo *Multiplex*, se realiza la amplificación y detección de forma simultánea de ambos genes, por lo que los reactivos se añaden a la muestra problema en el mismo pocillo. Se añaden 7,5 µL de mezcla de reacción y 2,5 µL de DNA problema en cada pocillo de una placa de 384 pocillos. Para la reacción se utiliza *TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Uracil-N-Glycosylase, Applied Biosystems)*. La composición final de la mezcla de reacción se detalla en la Tabla 18.

STD	Nº copias/5 mL rRNA 12S	Nº copias/5 µL RNAsaP
STD 1	9.000.000	90.000
STD 2	3.000.000	30.000
STD 3	1.000.000	10.000
STD 4	333.333	3.333
STD 5	111.111	1.111

Tabla 17: Número de copias de los amplicones en los estándares que conforman las curvas patrón para la cuantificación del mtDNA en células humanas (cantidades de los utilizados en el presente estudio).

Reactivo	Concentración final	Volumen (µL)
Master Mix II 2X	1X	5
Primer Fw rRNA 12S (4 mM)	100 nM	0,25
Primer Rv rRNA 12S (4 mM)	100 nM	0,25
Sonda rRNA 12S (5 mM)	125 nM	0,25
Ensayo RNAsaP (20X)	1X	0,5
DNA	20-100 ng/µL	2,5
dH ₂ O	-	1,25

Tabla 18: Composición de la mezcla de reacción para la cuantificación de mtDNA en células humanas.

8.1.4 Cuantificación del número de copias de mtDNA en tejidos de ratón.

Para la cuantificación del mtDNA en tejidos de ratón amplificamos como gen mitocondrial el *mt-Rnr2* (RNA ribosómico 16S y como gen nuclear de copia única *Ang1* (angiogenina 1). En este caso las sondas utilizadas para la cuantificación están marcadas con el mismo fluorocromo (FAM) por lo que la determinación de cada gen tiene que realizarse por separado.

8.1.4.1 *Primers, sondas y kit utilizado.*

Para la cuantificación del gen nuclear *Ang1* se utiliza el *kit* comercial *ANG1 Inventoried Assay, Life Technologies: Mm00833184_s1*) que contiene los *primers* y sonda necesarios para la amplificación del gen, mientras que para la cuantificación del gen mitocondrial *mt-Rnr2 (16S rRNA)* se utilizan los siguientes *primers* y sonda por separado.

- *rRNA 16S Primer Fw*: AATGGTTCGTTTGTTCACGATT
 - *RRNA 16S Primer Rv*: AGAAACCGACCTGGATTGCTC
- RRNA 16S Sonda*: FAM-5' AAGTCCTACGTGATCTGAGTT 3'-MGB.

8.1.4.2 *Preparación de la recta patrón*

Igual que en el caso de las células humanas, se prepara una recta patrón de número de copias conocido de los genes *mt-Rnr2 (rRNA 16S)* y *Ang 1* mediante diluciones seriadas, a partir de un estándar inicial de número de copias conocido para cada gen, en Tris-HCl 10 mM pH 8. También se determinan por triplicado, al igual que los controles de contaminación. Las rectas patrón para cada gen se detallan en la Tabla 19.

STD	Nº copias/ μL	
	<i>Ang1</i>	<i>rRNA 16S</i>
STD 1	108.000	3.690.000
STD 2	18.000	1.230.000
STD 3	3.000	410.000
STD 4	500	136.670
STD 5	500	45.555

Tabla 19: Número de copias del amplicon *Ang1* y *rRNA 16S* en los estándares que conforman la curva patrón para la cuantificación de DNA nuclear y mitocondrial de ratón (cantidades de los utilizados en el presente estudio).

8.1.4.3 Mezcla de reacción.

Como se ha mencionado anteriormente, en este caso es necesario preparar dos mezclas de reacción diferentes, una para la detección de cada gen, ya que ambos genes van marcados con el mismo fluorocromo (FAM). Sin embargo, para ambos genes se utiliza el ensayo *TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Uracil-N-Glycosilase, Applied Biosystems)*. Para cada gen se mezclan 7,5 μL de su correspondiente mezcla de reacción con 2,5 μL de DNA problema. La composición de cada mezcla se detalla en la Tabla 20 y 21

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
<i>Master Mix II 2X</i>	1X	5
<i>Ensayo Ang 1 (20X)</i>	1X	0,5
<i>DNA</i>	20-100 ng/ μL	2,5
<i>dH₂O</i>	-	2

Tabla 20: Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen *Ang 1*.

Reactivo	Concentración final	Volumen (μL)
<i>Master Mix II 2X</i>	1X	5
<i>Primer Fw rRNA 16S (10 mM)</i>	300 nM	0,3
<i>Primer Rv rRNA 16S (10 mM)</i>	300 nM	0,3
<i>Sonda rRNA 16S (5 mM)</i>	150 nM	0,3
<i>DNA</i>	20-100 ng/ μL	2,5
<i>dH₂O</i>	-	1,6

Tabla 21: Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen *mt-Rnr2* (*rRNA 16S*).

8.2 Cuantificación de los niveles de expresión génica (mRNA)

En este caso se realiza una cuantificación relativa del cDNA de interés respecto a un gen que sirve como normalizador entre las distintas muestras. Para esto, se determina el número de copias de DNA complementario (cDNA) de los diferentes genes que se quieran analizar en cada uno de los tejidos de estudio.

8.2.1 rt-qPCR para estudio de expresión.

La reacción de rt-qPCR se lleva a cabo en placas de 384 pocillos, utilizando el kit comercial *TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Uracil-N-Glycosilase, Applied Biosystems)* y la amplificación y detección de fluorescencia tiene lugar en un termociclador y detector de fluorescencia *ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System* (Apartado 8.1.2 materiales y métodos). Utilizamos los ensayos *TaqMan®* de expresión génica prediseñados (*Applied Biosystems*) para la detección de los niveles de mRNA de los diferentes genes de interés. Además, utilizamos el gen de la ciclofilina

A (*Ppia*) como referencia para normalizar los valores entre las diferentes muestras. Las sondas utilizadas fueron:

- Clclofilina A (*Ppia*) Mm02342430_g1
- *Ndufa10* Mm00600325_m1

Cada muestra se analiza por triplicado para obtener un valor medio de cDNA (mRNA) en cada caso que se normaliza con los niveles de cDNA (mRNA) de *Ppia*. La reacción de rt-qPCR tiene lugar en la siguiente mezcla de reacción (Tabla 22):

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ l)
TaqMan® Master Mix II 2X	1X	5
Ensayo 20X ¹	1X	0,5
cDNA problema ²	0,0125 (μ g/ μ L)	2,5
dH ₂ O	-	2

¹Sonda y *primers* específicos para cada gen que se pretenda analizar

²cDNA obtenido de la reacción de transcripción inversa (1 μ g/20 μ L)

Tabla 22: Composición de la mezcla de reacción para la reacción de rt-qPCR para determinación de expresión génica.

9. Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.

9.1 Subfraccionamiento de muestras mitocondriales en gradiente de densidad.

La ultracentrifugación en gradiente de densidad ha sido empleada con el objetivo de separar los complejos respiratorios y otros complejos proteicos globulares en función de sus tamaños y densidades, de manera que podamos estudiarlos de una manera más aislada y en relación a los dNTPs. El método está basado en que las moléculas se moverán a través del gradiente hasta alcanzar el punto en que su densidad sea igual a la de la sacarosa que las rodea. Para esto, partimos de un *pellet* de mitocondria procedente de hígado y cerebro de ratón, los cuales se solubilizaron en tampón DDM (10 mM KH_2PO_4 ; 1% DDM (p/v); Anti-Proteasas 1X; Anti-Fosfatasa 1X), cuando pretendíamos mantener los complejos proteicos en condiciones nativas o bien en tampón Triton X-100 (150 mM NaCl; 1% Triton™ X-100 (v/v); 0,5% deoxicolato sódico (p/v); 50 mM Tris-HCl pH 7,4) cuando intentábamos generar unas condiciones más astringentes bajo las que no podemos asegurar el completo ensamblaje de los complejos respiratorios (ETC).

Independientemente del tampón utilizado, solubilizamos las mitocondrias durante 30 minutos en hielo agitando el tubo suavemente cada 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 20.000 g durante 30 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Este se dispuso sobre un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa del 15-37,5% preformado en tampón Tris-HCl (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,05% DDM (p/v) -condiciones nativas- o 0,05% Triton™ X-100 (v/v) – condiciones más astringentes-). La composición de cada una de las fracciones del gradiente se recoge en la Tabla 23. El gradiente se centrifugó a 38.000 rpm durante 16 horas a 4°C utilizando un rotor de ultracentrífuga Sorvall® TH-641 rotor (Thermo Fisher Scientific).

Una vez centrifugada la muestra, recogimos 12 fracciones de 1 mL desde la parte inferior del gradiente (de mayor a menor densidad) perforando cuidadosamente el tubo en su base. Posteriormente, separamos una alícuota de 50 μ L de cada fracción para comprobar la eficacia del proceso de fraccionamiento mediante análisis *western-blot*.

Fracciones	% Sacarosa	Volumen (mL)	g Sacarosa/10mL
1	-	1,1	-
2	15	1,1	1,5
3	17,5	1,1	1,75
4	20	1,1	2
5	22,5	1,1	2,25
6	27,5	1,1	2,75
7	30	1,1	3
8	32,5	1,1	3,25
9	35	1,1	3,5
10	37,5	1,1	3,75

Tabla 23: Composición de las fracciones del gradiente de densidad de sacarosa.

10. Ensayos bioquímicos.

10.1 Extracción de dNTPs.

10.1.1 Extracción ácida de dNTPs mitocondriales.

Para la extracción ácida de dNTPs se parte de mitocondria procedente de la muestra de interés según hemos descrito (apartado 4.2 de esta sección) cuya concentración de proteína ha sido previamente determinada. El procedimiento se basa en una lisis ácida de las mitocondrias y precipitado de sus proteínas, seguida de una neutralización de pH con tri-n-octilamina y finalmente la separación orgánica con freón de la fase acuosa donde se han solubilizado los dNTPs. El procedimiento a seguir se detalla a continuación:

- Preparar alícuotas de 0,5-1 mg de proteína mitocondrial. La cantidad de proteína se ajusta en función del rendimiento de la extracción de mitocondrias que varía con la muestra de origen (tipo de tejido, células en cultivo etc).
- Las alícuotas de mitocondrias se centrifuga a 10.000 g en una centrífuga *Mini Spin (ependorf)* durante 2 minutos a 4°C para precipitarlas.
- Se descarta el sobrenadante y se procede a la lisis ácida de las mitocondrias con 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,5 M o ácido perclórico (PCA) 0,6 M. Se agita enérgicamente durante 15 segundos en un agitador *vortex*.
- Centrifugar a 20.000 x g durante 5 minutos a 4°C.
- Transferir rápidamente el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL con tapón de rosca y añadir 1,5 volúmenes (450 µL) de de tri-n-octilamina 0,5 M disuelta en freón (1,1,2-triclorofluoroetano, #91440 *Fluka*) y

mezclar durante 30 segundos en agitador *vortex* para neutralizar el pH ácido de los extractos.

- Centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Se recogen 150 µL de la fase acuosa superior (1/2 de la fase acuosa) para evitar la posible contaminación con la fase orgánica que interferiría en determinaciones posteriores y se pasan a un nuevo tubo de 1,5 mL para secarlos en un *speed-vac* hasta que se haya eliminado la totalidad del volumen (2-3 horas sin temperatura pre-fijada).
- El precipitado que contiene los dNTPs se conserva a seco a -80°C hasta que se procede con la determinación enzimática de dNTPs.

10.1.2 Extracción metanólica de dNTPs mitocondriales.

La extracción de dNTPs mitocondriales con metanol se ha utilizado tradicionalmente como método alternativo a la extracción ácida para prevenir la hidrólisis de los dNTPs durante el proceso de extracción. En este proceso el *pellet* de mitocondria se incuba con metanol al 60% seguido de una centrifugación para precipitar la proteína. El proceso incluye un paso adicional en el que se hierva la muestra para garantizar la completa desnaturalización de proteínas resistentes al metanol con posible actividad enzimática que pueda alterar la composición de dNTPs de la muestra. Sin embargo, mientras que algunos autores aseguran la completa desnaturalización de la proteína hirviendo el extracto metanólico antes de centrifugar para precipitar la proteína (MetOH+B+C)¹⁸⁴, otros hierven el sobrenadante metanólico una vez se ha precipitado la proteína de la muestra por centrifugación (MetOH+C+B)¹¹⁵. En este trabajo se han realizado ambos métodos mediante el siguiente procedimiento:

- Se preparan alícuotas de 0,5-1 mg de proteína mitocondrial igual que en el caso de la extracción ácida y se centrifugan a 10.000 g en una centrífuga *Mini Spin (ependorf)* durante 2 minutos a 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se reconstituye en 300 µL de metanol 60%. Se mezcla bien mediante agitador *vortex* durante 30 segundos y los extractos se mantienen durante 2 horas a -20°C para garantizar la precipitación de las proteínas presentes.
- En este punto se pueden seguir los dos procedimientos detallados anteriormente:
 - MetOH+B+C:
 - Hervir el extracto metanólico durante 5 minutos en un baño a 95°C.
 - Centrifugar el extracto a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C.
 - Recoger el sobrenadante.
 - MetOH+C+B:
 - Centrifugar el extracto metanólico a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C.
 - Recoger el sobrenadante y hervirlo durante 5 minutos en un baño a 95°C a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C.
- Secar el sobrenadante metanólico en el *speed-vac* hasta que todo el volumen se haya evaporado.
- Conservar los precipitados a -80°C hasta que se procede con la determinación enzimática de dNTPs.

10.1.3 Extracción de la fracción de dNTPs mitocondriales libre y asociada a proteínas.

Con el fin de poder determinar la concentración de dNTPs libres y asociados a proteína en una misma muestra, diseñamos un procedimiento que consiste en una combinación de las extracciones ácidas y metanólicas de dNTPs anteriormente detalladas. El procedimiento se realizó de la siguiente forma:

- Se prepararon alícuotas de mitocondria de 0,5-1 mg de proteína y se centrifugaron a 10.000 g en una centrífuga *Mini Spin (Eppendorf)* a 4°C para sedimentar las mitocondrias.
- Se resuspendió el *pellet* mitocondrial en 300 µL de metanol al 60%. Se mezcló enérgicamente mediante agitación *vortex* durante 30 segundos y se mantuvo durante 2 horas a -20°C.
- Los extractos metanólicos se centrifugaron a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C.
- Se separó el *pellet* (donde se encuentra la fracción de dNTPs asociados a proteína) del sobrenadante (donde se encuentra la fracción libre de dNTPs) que se pasó a un nuevo tubo de 1,5 mL
- El *pellet correspondiente a la fracción proteica* se resuspendió en 300 µL de metanol 60% para igualar los volúmenes con el sobrenadante
- En ambas fracciones se añadieron 60 µL de TCA 3M (hasta una concentración final de 0,5 M TCA) a cada una de las fracciones y se mezclaron bien mediante una agitación *vortex* durante 30 segundos.
- A partir de aquí se siguió el mismo protocolo que el detallado para la extracción ácida de dNTPs.

10.1.5 Extracción de dNTPs celulares totales.

Para la extracción de dNTPs celulares totales se parte una placa de cultivo de 150 mm de diámetro con las células de interés al 100% de confluencia y se lleva a cabo el siguiente protocolo (todo el proceso se realiza a 4°C):

- Realizamos dos lavados de la placa de células con 10 mL de PBS 1X.
- Las células se disocian de la placa con la ayuda de un *Cell lifter* (SPL, 90040).
- Recogemos todas las células de la placa en 1 mL de PBS 1X y se pasan a un tubo de 1,5 mL y se centrifugan durante 5 minutos a 500 g a 4°C.
- Resuspendemos el *pellet* de células en 600 µL de TCA 0,5 M para someterlas a una extracción ácida de dNTPs
- A partir de aquí se sigue el mismo proceso que en el caso de la extracción ácida de dNTPs mitocondriales (ajustando los volúmenes correspondientes).

10.2 Determinación enzimática de dNTPs.

Para la determinación enzimática de dNTPs utilizamos una variación del método inicialmente descrito por Sherman y Fyfe¹⁸⁵, que posteriormente fue modificado por Ferraro y colaboradores¹⁷⁵ y que más recientemente se modificó por González-Vioque y colaboradores¹¹⁷. Brevemente, se trata de un ensayo tipo *primer extension* para el que diseñamos una serie de oligonucleótidos específicos con un molde que permiten la incorporación del cada nucleótido problema en la muestra, junto con el nucleótido radiactivo presente en la mezcla de reacción que servirá como marcador. De esta manera, la cantidad de radiactividad incorporada será proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena que se haya sintetizado en función del contenido del dNTP problema en la muestra.

Por último, utilizamos una recta patrón de concentraciones conocidas de dNTPs a partir de las cuales podremos relacionar la radiactividad detectada con una concentración determinada de dNTP y, de esta manera, extrapolar las concentraciones de dNTPs problema en las muestras en función de la radiactividad detectada. Por tanto, la determinación de cada uno de los cuatro dNTPs (dATP; dTTP; dGTP; dCTP) se realiza por separado y se compone de los siguientes elementos:

10.2.1 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados son pequeños polímeros sintetizados que se forman a través de la hibridación de dos cadenas de nucleótidos, una cadena corta común para los cuatro dNTPs y que funciona como *primer* para la polimerasa y una cadena larga que es específica para el dNTP que se desea determinar y actúa como molde. Las secuencias de todos ellos se recogen en la Tabla 24. La síntesis de cada una de las cadenas que componen el oligonucleótido se lleva a cabo de manera independiente en el servicio ofrecido por *invitrogen*TM. Una vez recibido cada oligonucleótido se procede a la hibridación de las cadenas. Para ello se resuspenden los oligonucleótidos liofilizados en NaCl 0,1 M, para que queden a una concentración final de 100 μ M, y se prepara una dilución equimolar de cada uno, mezclando el oligonucleótido común con el específico para cada dNTP. Por último, se deja incubar en agua a 70°C durante toda la noche mientras la temperatura va disminuyendo hasta llegar a temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene cada oligonucleótido con la secuencia descrita en la Tabla 24 a una concentración final de 50 μ M. Por último, se realiza una dilución 1:10 en agua miliQ para obtener una concentración final de oligonucleótidos a 5 μ M. Se alicuotan y conservan a -20° hasta su uso.

<i>dNTP a determinar</i>	Secuencia oligonucleótido
<i>dATP</i>	5' AAATAAATAAATAAATAAATGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
<i>dTTP</i>	5' TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
<i>dGTP</i>	5' TTTCTTCTTCTTCTTCTTTCGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
<i>dCTP</i>	5' TTTGTTGTTTGTGTTGTTGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'

Tabla 24: Secuencias de los oligonucleótidos empleadas en la determinación enzimática de dNTPs. En rojo se representa la secuencia del oligonucleótido común (cadena corta) utilizado para la determinación de los cuatro dNTPs y que actúa como *primer* para la polimerasa. En verde se muestra la secuencia del oligonucleótido específico empleado para la cuantificación de cada dNTP y que actúa como el molde para el crecimiento de la cadena de DNA.

10.2.2 dNTPs radiactivos.

Dependiendo del nucleótido que se desea medir se debe utilizar un radionucleótido diferente. Para la determinación de los nucleótidos dTTP, dGTP y dCTP se utiliza ($8\text{-}^3\text{H(N)}$) dATP ($^3\text{H-dATP}$) y para la determinación del dATP se utiliza (metil- ^3H) dTTP ($^3\text{H-dTTP}$). En el caso del dTTP, dGTP y dCTP, la cadena larga del oligonucleótido que se utiliza en la determinación enzimática contiene el nucleótido complementario al que se desea medir en cada caso, espaciado entre 2 o 3 nucleótidos de timina que serán los que hibriden con el radionucleótido $^3\text{H-dATP}$.

En el caso de la determinación del dATP, la cadena larga del oligonucleótido contiene el nucleótido complementario (T) espaciado entre 3 nucleótidos de adenina que hibridarán con el radionucleótido $^3\text{H-dTTP}$.

Ambos radionucleótidos son comerciales y se reciben en una solución de etanol al 50% con una actividad específica inicial que varía ente los 15-35 Ci/mmol. Para poder realizar la determinación enzimática es necesario eliminar el etanol en el que se encuentra el radionucleótido. Para ello, se pasa el volumen necesario para la reacción a un tubo de 1,5 mL y se evapora en el *speed-vac* a temperatura ambiente durante 30 minutos para finalmente resuspender el precipitado seco en el volumen de agua requerido para obtener una concentración final de 15 μM . El volumen necesario del stock de radionucleótido se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$V_{stock} = \frac{V \cdot C}{C_{stock}}$$

Donde **V** es el volumen necesario para que se desarrolle la reacción (0,5 μL /muestra); **C** es la concentración final del radionucleótido en la reacción (15 μM); y **C_{stock}** es la concentración molar a la que se encuentra el radionucleótido y que varía en función del stock utilizado.

10.2.3 Polimerasa: Thermo Sequenase DNA Polymerase.

Para la reacción de polimerización se utiliza la enzima *Thermo Sequenase DNA Polymerase (93-79000-10KU, GEHealthcare)*. La enzima utiliza la cadena corta del oligonucleótido como *primer* y la cadena larga, específica para cada dNTP que se desea determinar, como molde para la síntesis de DNA e incorporar en ella los dNTPs presentes en la mezcla de reacción (tanto los intrínsecos de la muestra como los radiactivos añadidos a esta). De esta forma, la cantidad total de dNTP radiactivo incorporado será proporcional a la intensidad de la radiación b que se detecta y dependerá de la cantidad de cada dNTP presente en la muestra. La reacción de polimerización tiene lugar a 48°C y se realiza a punto final.

10.2.4 Determinación.

La determinación consiste en una reacción enzimática de polimerización en la que intervienen todos los componentes citados anteriormente. En primer lugar, se prepara una recta patrón de concentraciones conocidas de los cuatro dNTPs mediante de diluciones seriadas, en Tris-HCl 40 mM pH 7,4, de un stock que contiene una mezcla de ellos. Las concentraciones que componen la curva se recogen en la siguiente tabla (Tabla 25).

<i>dNTP a determinar</i>	Concentraciones de la curva (nM)
<i>dATP</i>	5; 10; 20; 100; 200; 400
<i>dGTP</i>	
<i>dCTP</i>	
<i>dTTP</i>	5; 10; 20; 35; 70; 100

Tabla 27: Rectas patrón para la determinación de dNTPs. Se utiliza un multistandard con los cuatro dNTPs. Para cada dNTP se utilizan rangos de concentración en los que las curvas muestran un comportamiento lineal. En el caso del dTTP encontramos saturación a partir de 100 nM por lo que esta concentración se utiliza como el estándar más alto de la curva.

A continuación, los extractos de dNTPs, obtenidos como se ha detallado anteriormente, se reconstituyen en un volumen de Tris-HCl 40 mM pH 7,4 para obtener la muestra a una concentración equivalente a 12,5 µg de proteína/µL (es importante tener en cuenta que los extractos de dNTPs generados carecen completamente de proteína tras haber sido esta precipitada y eliminada durante el proceso de extracción, aquí nos referimos al extracto correspondiente a 12,5 µg de proteína mitocondrial inicial). Se determina la concentración de dNTPs en la muestra directamente reconstituida y una dilución 1/3 en Tris-HCl 40 mM pH 7,4 de la misma, para cada uno de los cuatro dNTPs, por duplicado (cada dNTP se medirá finalmente por cuadruplicado para detectar posibles interferencias debidas a

componentes de la muestra que puedan alterar la determinación final). Para cada reacción se mezclan 5 μL de la muestra directa o diluida con 15 μL de la mezcla de reacción (Tabla 26).

<i>Reactivo</i>	Concentración final	Volumen (μL)
<i>Buffer Klenow (Tris-HCl 1M pH 7,4)</i>	40 mM	0,6
<i>MgCl₂ (0,1M)</i>	10 mM	2
<i>DTT (0,5 M)</i>	5 mM	1
<i>Oligonucleótido (5 μM)</i>	0,5 μM	1
<i>Radionucleótido (15 μM)</i>	0,75 μM	1
<i>Polimerasa</i>	0,025 U/ μL	0,016
<i>Agua destilada</i>	-	10,2
<i>Volumen final</i>	-	15,6

Tabla 28: Composición de la mezcla de reacción para la determinación de dNTPs.

La mezcla de reacción se incubaba en un baño a 48°C durante 1 hora. A continuación, para separar los oligonucleótidos de doble cadena formados del exceso de radionucleótido libre presente en las mezclas de reacción, realizamos una cromatografía en fase sólida. Para ello, se realiza un *spin* de centrífuga y se disponen 19 μL del volumen total de reacción sobre cada una de las posiciones de un filtro de fibra de vidrio DEAE cargado positivamente de 96 posiciones (*DEAE Filtermat 102 x 258 mm, 1205-405*) y se deja secar completamente a temperatura ambiente. Una vez secos, se procede al lavado del filtro para favorecer la selección, por pH, de oligonucleótidos de doble cadena formados durante la reacción. Los lavados se realizan en todo momento con agitación constante del filtro y a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados de 10 minutos y 3 lavados de 5 minutos con una solución de Na_2HPO_4 al 5% (p/v), un lavado de 10 minutos con agua destilada y un lavado final de 10 minutos con etanol 70% (v/v) para favorecer el secado.

Finalmente, el filtro se deja secar a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente, se recortan cada una de las posiciones del filtro DEAE con ayuda de un bisturí y se introduce cada una en un vial de centelleo *Scintillation Vial 20 mL (SARSTEDT, 73.662.500)* al que se le añaden 2 mL de líquido de centelleo *ULTIMA GOLD™ (PerkinElmer)* y se procede a medir la radiactividad contenida en cada vial con un contador de emisiones β *Tri-Carb® 4810TR (PerkinElmer)*. La cantidad de dNTPs presentes en cada muestra se calcula mediante la extrapolación de las cpm obtenidas en la recta patrón y las cpm obtenidas en cada una de las muestras y corrigiendo el resultado por el factor de dilución en cada caso.

10.3 Ensayo de fotoafinidad: *UV-Crosslink*.

Los ensayos de fotoafinidad son un método estándar que tradicionalmente se ha utilizado para estudiar interacciones proteína-RNA¹⁸⁶. Aprovechan la radiación ultravioleta (UV) para inducir la formación del complejo proteína-RNA (RNP) mediante la formación de enlaces covalentes estables que permiten aislar el complejo en condiciones desnaturalizantes sin que los componentes de este se separen.

En este caso se pretendía estudiar la interacción proteína-dNTP, por lo que se han realizado varias adaptaciones sobre los protocolos más comúnmente utilizados. Igualmente, el ensayo se basa en incubar los [α -³²P]-dNTPs con la proteína de interés para favorecer la formación de manera espontánea del complejo proteína-dNTP, seguido de una exposición a radiación UV que inducirá la formación de enlaces covalentes en el complejo y su posterior resolución en un SDS-PAGE. La señal procedente del α -³²P se visualiza mediante autorradiografía.

El proceso a seguir es el siguiente:

- Incubar 30 ng de proteína purificada durante 20 minutos a temperatura ambiente en una proporción 1:1 en volumen de mezcla de reacción 2X (150mM Tris-HCl pH7.6; 10 mM MgCl₂; 0,8 mM DTT; 20 nM los [α -³²P]-dNTPs) para llegar a un volumen final de reacción de 40 μ L (20 μ L de proteína purificada + 20 μ L de mezcla de reacción 2X). Esta incubación se realiza en una placa tipo ELISA de 96 pocillos.
- Someter a radiación ultravioleta en un *Crosslinker WC 500 UV Crosslinker (Hoefer)* durante 30 minutos a 4°C.
- Añadir 50 μ L de TBS + 1 μ L de desoxicolato sódico al 2% (p/v) y pasar todo el volumen a un tubo de 1,5 mL para precipitar la proteína.
- Mezclar con agitador *vortex* e incubar 30 minutos en hielo.
- Añadir TCA 100% (*Sigma-Aldrich, T0699-100ML*) hasta el 15% (v/v) e incubar durante toda la noche a 4°C
- Centrifugar a 20.000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar al aire el *pellet* a temperatura ambiente durante 10-20 minutos.
- Resuspender el *pellet* en tampón de carga de western-blot.
- Si el pH es demasiado ácido se neutraliza añadiendo 0,5 μ L de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.
- Calentar las muestras en un baño a 65°C durante 10 minutos.
- Las muestras se resuelven por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 %.
- Transcurrida la electroforesis, el gel de poliacrilamida se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente en solución de fijación (3% glicerol (v/v); 25% etanol (v/v)).
- Una vez fijado el gel se seca durante toda la noche entre papeles de celofán (referencia) previamente hidratados en agua destilada.
- Finalmente, el resultado se comprueba por autorradiografía empleando una película *Amersham HyperfilmTMMP (GE Healthcare)*.

Para todos los casos incubamos, además, el correspondiente [α - 32 P]-dNTP en el mismo tampón de elución empleado para purificar la proteína, así como con BSA a concentraciones de 1 y 100 ng, con el objetivo de descartar posibles interacciones inespecíficas.

10.4 Actividad OXPHOS: Complejo I.

La actividad del complejo I mitocondrial se determina por espectrofotometría a través del análisis de la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm debido a su oxidación durante la transferencia de electrones para la reducción de la ubiquinona. Como material de partida utilizamos homogenado de células en cultivo y para normalizar diferencias en el contenido mitocondrial, los valores obtenidos se expresan relativos a la actividad citrato sintasa.

En primer lugar, se determina la actividad del complejo I mitocondrial. Para ello, se recoge un *pellet* equivalente a un millón de células y se resuspende en 200 μ L de tampón manitol (225 mM manitol; 75 mM sacarosa; 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 0,1 mM EDTA) para su homogeneización por sonicación al 60% de intensidad durante 5 segundos con el sonicador Microson Ultrasonication Cell Disruptor XL2000 (Misonix). El homogenado se centrifuga a 650 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de 1,5 mL, se determina la concentración de proteína presente en el homogenado (según se describe en el apartado 4.3 materiales y métodos) y se lleva a una concentración final de 1 mg/mL con tampón manitol. A continuación se mezclan 20 μ L de homogenado con 945 μ L de la mezcla de reacción (100 μ M decilubiquinona; 3,75 mg/mL BSA; 50 mM K_2HPO_4 pH 7,5) y 5 μ L de una mezcla 1:1 de etanol y dimetilsulfóxido (EtOH:DMSO). En paralelo se analiza también un control negativo de la reacción en las mismas condiciones, pero al que se añaden 5 μ L de rotenona

2,5 mM (disuelta en EtOH:DMSO) en lugar de la mezcla EtOH:DMSO. La reacción de oxidación se inicia mediante la adición a la mezcla de 50 μ L de NADH 2 mM a 37°C y se monitoriza la variación de absorbancia durante 3 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro UV-2401PC UV-VIS (Shimadzu Corporation).

10.5 Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) comprenden todas aquellas moléculas derivadas del oxígeno. Los ROS que pueden existir de forma independiente y que presentan uno o más electrones desapareados en sus orbitales se denominan radicales libres¹⁸⁷.

10.5.1 Determinación de superóxido mitocondrial (O_2^-) con *MitoSOX*TM.

El anión superóxido (O_2^-) es la primera especie reactiva de oxígeno que se genera en los sistemas biológicos. Uno de los principales puntos de producción de O_2^- es la mitocondria, donde este se genera como un subproducto durante la fosforilación oxidativa. Cuando la cadena respiratoria se encuentra estrechamente acoplada, entorno al 1-3% del oxígeno que se consume se reduce de forma incompleta, generando una serie de electrones “fugados” que pueden interactuar rápidamente con el oxígeno molecular (O_2) y reducirlo para dar lugar al anión superóxido (O_2^-). El O_2^- tiene una vida media muy corta y es poco reactivo. Su inestabilidad se debe a que la reacción de dismutación del O_2^- a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es muy favorable y puede tener lugar de forma espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa. Por tanto, para cuantificar la formación de O_2^- es preferible utilizar sondas que puedan reaccionar con el anión recién formado y, por tanto, que puedan acceder a la matriz mitocondrial.

Para la determinación de O_2^- se utiliza la sonda comercial *MitoSOXTM* (*Molecular ProbesTM*, M36008). Esta es una sonda fluorogénica permeable a las membranas de células vivas y que está dirigida específicamente hacia la mitocondria. Una vez en la matriz mitocondrial, el *MitoSOXTM* se oxida por la acción del anión O_2^- mitocondrial y emite fluorescencia roja a una longitud de onda máxima de emisión de 585 nm que será proporcional a la cantidad de O_2^- presente en la matriz. La sonda no es susceptible de oxidación por otros sistemas que producen ROS o especies reactivas de nitrógeno. Como control positivo para la detección de ROS se utiliza Antimicina A (*Sigma-Aldrich*), un inhibidor específico del complejo III de la CTE que induce una importante formación de ROS a nivel de este complejo, a una concentración de 200 μ M. El protocolo seguido es el siguiente:

- El día anterior a la determinación se siembran en una placa de cultivo de seis pocillos(6-well) (*SARSTEDT*) 600.000 células por pocillo (80% de confluencia) y se dejan adherir a la superficie de cultivo durante toda la noche.
- Resuspender un vial de *MitoSOXTM* en 13 μ L de DMSO para obtener un stock a concentración final 5 mM.
- Diluir 1:1000 el stock en medio de cultivo sin fenol red (Gibco DMEM (1X), 21063-029) para obtener una concentración final de trabajo de 5 μ M (Medio MitoSOX).
- Retirar el medio de cultivo y lavar las células dos veces con PBS 1X.
- Añadir 1 mL de Medio MitoSOX e incubar durante 30 minutos a 37°C en el incubador de cultivos celulares.
- Retirar el medio y lavar las células dos veces con PBS 1X.
- Añadir 500 μ L de tampón de lisis (1% Triton X-100 (v/v) en PBS 1X) e incubar las células 30 minutos en oscuridad y agitación constante a temperatura ambiente.
- Recoger las células lisadas y separar una alícuota de 100 μ L para determinar la concentración de proteína.

- Disponer en una placa de 96 pocillos negra y de fondo plano 250 μL de células lisadas.
- Leer la fluorescencia emitida a 585 nm en un espectrofotómetro (*Varioskan™ LUX multimode microplate reader, ThermoFisher Scientific*).
- La fluorescencia obtenida será proporcional a la cantidad de superóxido mitocondrial y se corrige por la cantidad de proteína determinada en cada caso.

10.5.2 Determinación de ROS celular: H₂DCFDA.

Para la determinación de ROS celular se utiliza la sonda 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (*invitrogen™, C2938*). A diferencia del *MitoSOX™* empleado para la determinación de O₂⁻, el H₂DCFDA es una sonda inespecífica que reacciona con cualquier tipo de especie reactiva de oxígeno presente en el citoplasma celular. La molécula en sí es una forma químicamente reducida y acetilada de la fluoresceína. En su estado basal es una molécula no fluorescente, pero puede emitir fluorescencia verde (525 nm) cuando los grupos acetato que presenta son disociados de la molécula por la acción de esterasas intracelulares y queda expuesta a la oxidación por parte de ROS citoplasmáticos. Igual que en el caso del *MitoSOX™*, utilizamos Antimicina A 200 μM como control positivo. El protocolo a seguir para la determinación se detalla a continuación:

- El día anterior a la determinación se siembran en una placa *6-well* 600.000 células por pocillo (80% de confluencia) y se dejan adherir a la superficie de cultivo durante toda la noche.
- Resuspendemos 5 mg de H₂DCFDA (contenido de todo el vial) en 1,480 μL de DMSO para obtener un stock a concentración final 5 mM.

- Diluir 1:500 el stock en medio de cultivo sin fenol red para obtener una concentración final de trabajo a 10 μM (Medio H₂DCFDA).
- Retirar el medio de cultivo y lavar las células dos veces con PBS 1X.
- Añadir 1 mL de medio H₂DCFDA e incubar durante 30 minutos a 37°C en el incubador de células.
- Retirar el medio y lavar las células dos veces con PBS 1X.

A partir de aquí se procede con la lisis celular y la lectura de fluorescencia a 525 nm de forma similar a la detallada para el caso del *MitoSOX*TM.

10.6 Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

La determinación del potencial de membrana mitocondrial interna se lleva a cabo por citometría de flujo empleando el indicador dependiente de voltaje perclorato de tetrametilhidrorodamina etil ester (TMRE) (*Molecular Probes*TM, T669). Se trata de una sonda que emite fluorescencia en el espectro rojo-naranja, que resulta permeable a las membranas celulares y está cargada positivamente. En mitocondrias activas, correctamente acopladas con un potencial de membrana negativo, el TMRE, cargado positivamente penetra en la mitocondria y emite fluorescencia. La alteración o pérdida del potencial de membrana se traduce en una disminución de la carga negativa de esta, lo que provoca una disminución de la entrada de TMRE y por tanto una menor emisión de fluorescencia.

Como control positivo de la despolarización de la membrana mitocondrial se utiliza el desacoplante carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (*Sigma-Aldrich*, C2759-100MG) a una concentración de 200 μM . El protocolo seguido se detalla a continuación:

- El día anterior a la determinación se siembran en una placa *6-well* 600.000 células por pocillo (80% de confluencia) y se dejan adherir toda la noche a la superficie de cultivo.
- Las células se lavan dos veces con PBS 1X.
- Incubamos las células con TMRE 50 nM en medio de cultivo sin *fenol-red* durante 30 minutos a 37°C en el incubador de células.
- Trispsinizamos las células y las pasamos a un tubo de 1,5 mL
- Se precipitan las células centrifugando a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspendemos el *pellet* en 1 mL de PBS 1X y el volumen se transfiere a un tubo para citometría (*BD Falcon™*).
- La fluorescencia se analiza por citometría de flujo en un citómetro *Fortessa LSRII (BD)* monitorizando un total de por lo menos 10.000 células para cada condición.
- Los resultados se analizan con el *software Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience)*.

RESULTADOS

1. El *pool* de dNTPs mitocondriales no está equilibrado.

Existen evidencias de que una alteración en el balance en el *pool* de dNTPs puede ser mutagénica en las células¹⁸⁸ y, además, se sabe que los defectos en la homeostasis del *pool* de dNTPs juegan un papel muy importante en la patogénesis de algunas enfermedades mitocondriales como los síndromes de depleción y deleciones múltiples del mtDNA (por ejemplo, la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) o la deficiencia de TK2)¹¹⁷. Sin embargo, en la literatura, se ha reportado la existencia de importantes asimetrías en el *pool* mitocondrial de dNTPs, tanto en tejido de rata como en células humanas en condiciones fisiológicas, encontrándose el dGTP significativamente sobrerrepresentado frente al resto de dNTPs (aproximadamente 90% del total)¹⁸⁴. Estos hallazgos contrastan con los niveles de dNTPs totales que han sido descritos por otros autores, donde el dGTP representa entorno al 10% del total¹⁷⁵.

Para profundizar en el estudio de estas discrepancias, hemos analizado en detalle el *pool* mitocondrial de dNTPs en hígado, cerebro y corazón de ratón. Para esto, llevamos a cabo extracciones en medio ácido de mitocondrias de cada tejido y determinamos la concentración de dNTPs mediante un método enzimático adaptado (materiales y métodos apartado 10.1.1). Nuestros resultados están en consonancia con las observaciones previamente descritas en mitocondrias de tejidos de rata y líneas celulares por Wheeler y Mathews en 2011. Concretamente, nuestros resultados reflejan una clara asimetría en cuanto a los niveles de dNTPs mitocondriales en estos tejidos, encontrándose el dGTP como el nucleótido mayoritario en mitocondrias de hígado, cerebro y corazón (67%, 73% y 95% del total de dNTPs respectivamente) (Figura 35).

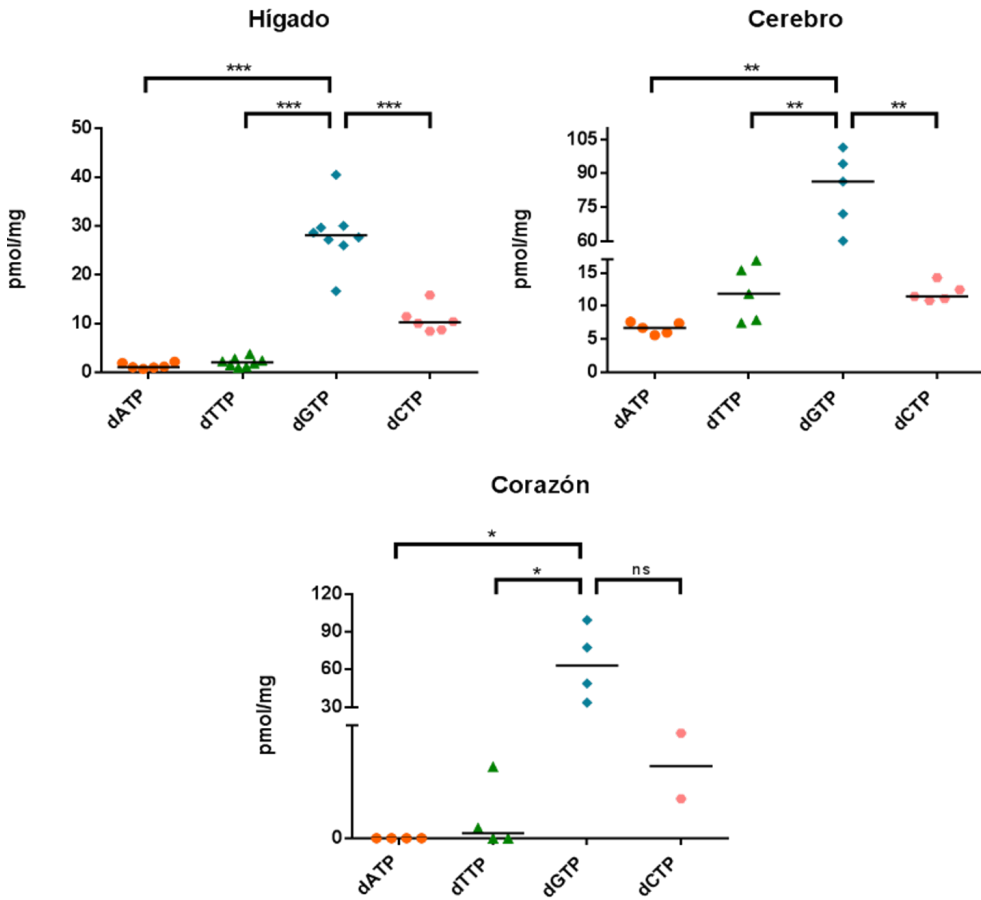


Figura 35: dNTPs mitocondriales en tejidos de ratón. La extracción de dNTPs se realiza en medio ácido (TCA) a partir de un *pellet* fresco de 1 mg de proteína mitocondrial para cada tejido. Se representan los pmol de dNTPs por mg de proteína. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal) (Hígado: n=6-8; Cerebro: n= 5; Corazón n= 4). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05; ns: resultado no estadísticamente significativo (p > 0.05).

Del mismo modo, también analizamos el *pool* mitocondrial de dNTPs en células humanas HEK-293T, para comparar con las observaciones previamente descritas por Wheeler y Mathews.

Nuestros resultados muestran el mismo desequilibrio que identificamos en tejidos de ratón, siendo de nuevo el dGTP significativamente mayoritario respecto a los demás dNTPs (60% del total) (Figura 36). Por último, para completar el análisis, decidimos comparar el *pool* mitocondrial con el *pool* celular total de dNTPs en células HEK-293T. En este último caso, encontramos que es el dTTP el nucleótido mayoritario (60% del total), en consonancia con el estado relicativo de estas células, sin encontrar diferencias significativas entre las cantidades del resto de dNTPs (Figura 36).

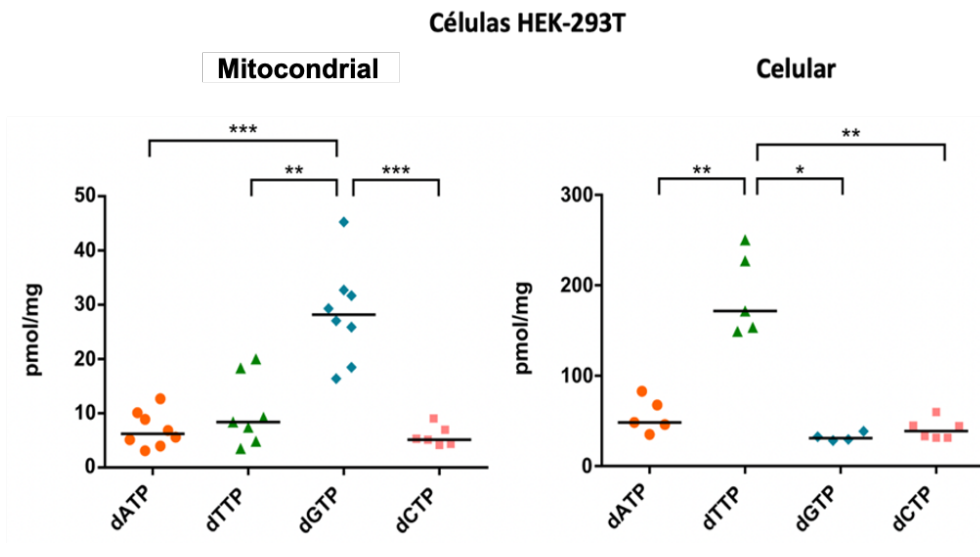


Figura 36: dNTPs en células humanas HEK-293T. La extracción de dNTPs se realiza en medio ácido (TCA) a partir de un *pellet* fresco de 1 mg de proteína mitocondrial (Mitocondrial) o de un *pellet* de células equivalente a 1×10^7 células totales (Celular). Se representan los pmol de dNTPs por mg de proteína. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal). (Mitocondria: n=6-8; Celular: n= 5). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: *** p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05;

2. La mayor parte del dGTP mitocondrial está unido a proteína.

2.1 El método de extracción puede interferir con la determinación final de dNTPs.

Existen diferentes métodos de extracción de dNTPs, pero independientemente del método utilizado, todos requieren la eliminación de la fracción proteica de los extractos. Algunos de estos métodos llevan a cabo esta eliminación mediante el tratamiento ácido de la muestra (típicamente ácido tricloroacético (TCA) o ácido perclórico (PCA)) seguido de una neutralización del pH con trioctilamina (TOA), mientras que otros utilizan MetOH (metanol) para este propósito, con el objetivo de prevenir la hidrólisis ácida de los dNTPs. Además, el procedimiento con metanol incluye un paso en el que el extracto se hierve para garantizar la completa desnaturalización de algunas enzimas cuya actividad sería resistente al tratamiento con metanol, y que por tanto puedan alterar el contenido en dNTPs del extracto final (fosfatasas, quinasas). Sin embargo, mientras que algunos autores aseguran esta desnaturalización hirviendo el extracto previamente a la centrifugación, otros hierven el extracto posteriormente a la centrifugación, cuando ya se han eliminado la mayor parte de las proteínas presentes en la muestra. Es importante reiterar que la única diferencia entre estos dos protocolos es el orden de los pasos. En ambos protocolos el extracto se inicia mediante la adición de MetOH, pero el primer protocolo sigue inmediatamente con la desnaturalización térmica de las proteínas (B) antes de eliminar el pellet proteico por centrifugación (C) (MetOH+B+C), mientras que el otro protocolo elimina del pellet proteico por centrifugación sin desnaturalización térmica, la cual se lleva a cabo después en el sobrenadante (MetOH+C+B). Estas diferencias en cuanto al procesamiento de los extractos podrían ser especialmente relevantes, ya que es importante tener en cuenta que algunas enzimas podrían seguir siendo activas durante el procesado y

que, por tanto, estas podrían alterar la cuantificación final de dNTPS. Para estudiar la posible actividad residual de este tipo de enzimas, realizamos una adición de una cantidad conocida de dNMPs, dNDPs y dNTPs (100 pmoles) a un lisado mitocondrial de hígado de ratón que posteriormente fue procesado siguiendo cuatro métodos distintos para la extracción de dNTPS (PCA; TCA; MetOH+B+C; MetOH+C+B) (Materiales y métodos apartado 10.1). La adición de dNMPs y dNDPs a los lisados mitocondriales reveló la existencia de actividad residual de quinasas en forma de dNTPs generados *in vitro*. Esta actividad resultaba especialmente elevada en los métodos que se basan en tratamientos con MetOH. Igualmente, estos métodos mostraron en general una menor recuperación sobre la adición de dNTPs (excepto dGTP), evidenciando la conservación de actividades (fosfatasas u otras) o condiciones que pueden degradar y alterar el *pool* final de dNTPs a determinar. Cabe destacar que la recuperación de dNTPs mediante extracción ácida en medio acuoso era muy deficiente, sugiriendo que la composición de la muestra del lisado mitocondrial protege parcialmente frente a la hidrólisis ácida (Figura 37).

En su conjunto, nuestros resultados indican que los métodos de extracción basados en ácido son los más eficientes en cuanto a garantizar la estabilidad de los dNTPs de la muestra, así como los que minimizan la interferencia causada por la actividad residual de fosfatasas y quinasas durante el procesamiento de los extractos. Concretamente, tomando todos los datos en su conjunto, determinamos que el método que podría darnos resultados más fiables en cuanto a la composición del *pool* de dNTPs mitocondrial sería la extracción ácida con TCA seguida de neutralización con TOA.

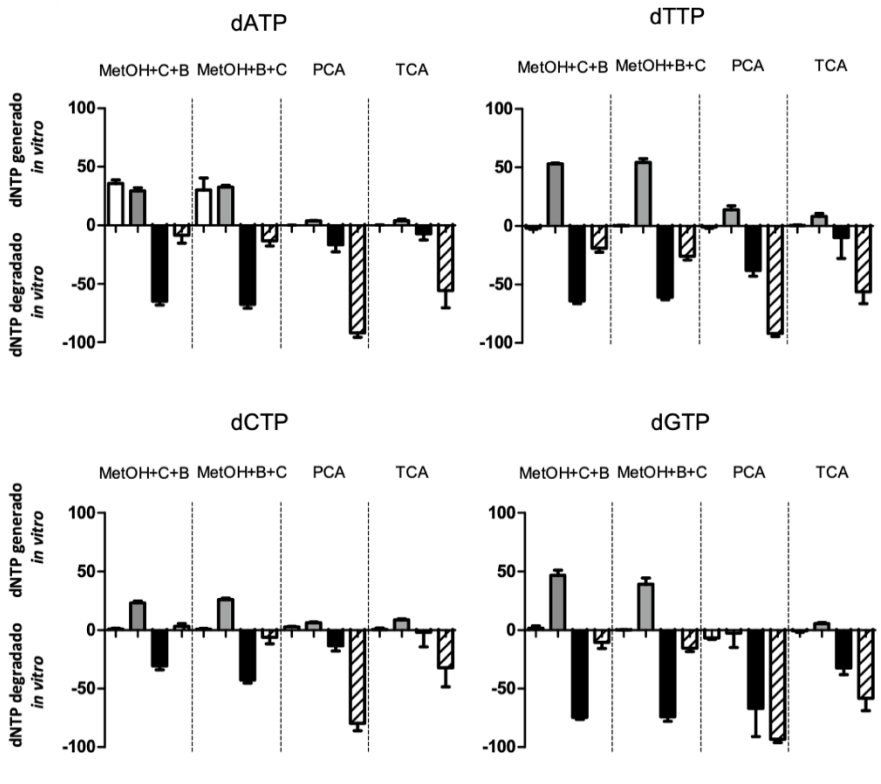


Figura 37: Ensayo de recuperación de dNTPs en función del método de extracción. Se realizó una adición 100 pmol de una mix de los cuatro dNTPs, otra de los cuatro dNDPs y otra de los cuatro dNMPs, a un lisado de mitocondrias de hígado de ratón que, posteriormente, fue procesado siguiendo cada uno de los cuatro métodos de extracción descritos (PCA; TCA; MetOH+B+C; MetOH+C+B), seguido de la correspondiente cuantificación de dNTPs en cada condición. Se representan los pmol de dNTP degradados/generados en base a la cantidad teóricamente esperada en función de la cantidad adicionada. La gráfica de barras representa la desviación estándar para cada determinación. Blanco: Adición dNMP; Gris: Adición dNDP; Negro: Adición dNTP; Rayado: Adición de dNTP a solución acuosa (n=5).

2.2 Los diferentes métodos de extracción de dNTPs afectan significativamente a la cuantificación final de dGTP en mitocondria.

Por otro lado, con el objetivo de profundizar más en el análisis de las discrepancias en cuanto a los niveles de dGTP en mitocondria reportadas por diferentes autores^{175,184}, preparamos extractos de mitocondria de hígado de ratón siguiendo los diferentes métodos de extracción de dNTPs descritos, para posteriormente cuantificar los dNTPs en cada uno de ellos. En general, obtuvimos resultados similares con los métodos de extracción basados en TCA, PCA y MetOH+B+C, aunque con este último siempre se obtuvieron niveles de dNTPs más bajos que con los dos métodos basados en extracción ácida (Figura 38), probablemente debido a la mayor manipulación que sufre el extracto y a la actividad enzimática residual que se mantiene durante el procesamiento de los extractos en metanol. Por otro lado, los resultados confirmaron la abundancia del dGTP sobre el resto de dNTPs en extractos mitocondriales preparados con cualquiera de los tres métodos anteriores (Figura 38), representando este en torno al 90-60% del total de dNTPs mitocondriales. Sin embargo, al comparar los métodos de extracción basados en metanol, encontramos que, aunque con ambos métodos se obtienen cantidades comparables de dATP, dTTP y dCTP, la cuantificación total de dGTP es drásticamente diferente entre ambos. De forma que, cuando el extracto metanólico se centrifuga previamente a la desnaturalización por ebullición (MetOH+C+B), se observan cantidades de dGTP prácticamente indetectables (por debajo del límite de detección de la técnica), mientras que si el extracto metanólico se desnaturaliza por ebullición previamente a la centrifugación (MetOH+B+C) se obtienen cantidades de dGTP marcadamente superiores al resto de dNTPs y, además, comparables a los valores obtenidos con los métodos ácidos (Figura 38). Esto sugiere que la práctica totalidad del dGTP presente en el extracto se pierde durante el proceso de centrifugación previo a la ebullición.

Sin embargo, la ebullición del extracto previamente al proceso de centrifugación debe liberar la gran mayoría del dGTP presente en dicha fracción, lo que permite obtener valores similares a los detectados en extractos ácidos (PCA o TCA).

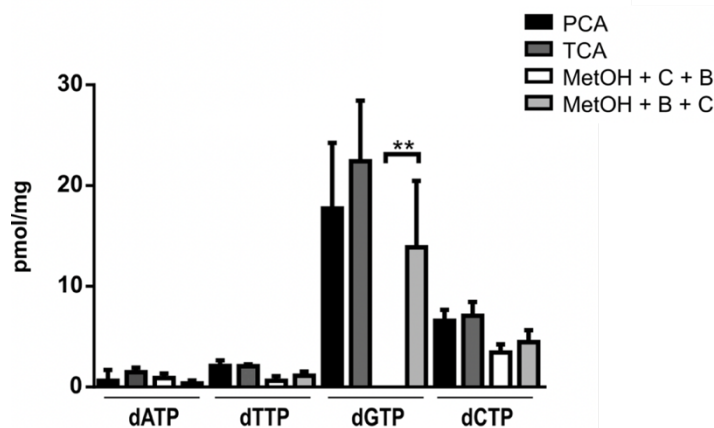


Figura 38: Comparativa entre la cuantificación de dNTPs mitocondriales obtenida en función del método de extracción utilizado. La extracción de dNTPs se realiza según cada uno de los cuatro métodos sobre un *pellet* de 1 mg de proteína mitocondrial de hígado de ratón. Se representan los pmol de dNTPs obtenidos por mg de proteína. El dGTP resultó indetectable en el caso del método MetOH+C+B. Las gráficas de barras representan la desviación estándar (n= 4 para cada dNTP y método de extracción). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: ***p < 0.01.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la práctica totalidad del dGTP presente en extractos mitocondriales se encuentra retenido en la fracción proteica, de manera que cuando estos se centrifugan, antes de la desnaturalización térmica de la proteína presente, el dGTP es eliminado del medio junto con la proteína. Solo los métodos que garantizan la completa desnaturalización de la fracción proteica previamente a su eliminación del extracto, liberan niveles comparables de dGTP.

2.3 La mayor parte del dGTP mitocondrial está retenido en la fracción proteica.

Con el objetivo de separar las fracciones proteicas y solubles de los extractos generados para la cuantificación de dNTPs, utilizamos un método de extracción alternativo que combina un tratamiento inicial del extracto con metanol, para precipitar la proteína, con el tratamiento final del pellet proteico y del sobrenadante con ácido (TCA) para garantizar la desnaturalización proteica. Decidimos utilizar TCA, en lugar de por ejemplo la desnaturalización por ebullición, con el objetivo de evitar posibles interferencias a causa de que pudiese darse una concentración de los extractos durante el proceso de ebullición. Una vez precipitada la proteína tras el tratamiento con metanol, la fracción proteica (*pellet*) y soluble (sobrenadante) se separaron mediante centrifugación, para finalmente ambas ser sometidas al procesamiento en medio ácido con el objetivo de desnaturalizar toda la proteína allí presente. Siguiendo este método se procesaron extractos mitocondriales de hígado y cerebro de ratón para, posteriormente, cuantificar los dNTPs presentes en cada una de las fracciones generadas.

Finalmente se analizó la relación entre la fracción proteica y soluble (*pellet/sobrenadante*) para cada uno de los cuatro dNTPs. Un *ratio* superior a 1 indica la presencia mayoritaria del dNTP en la fracción proteica, mientras que si es inferior a 1 revela la presencia mayoritaria del dNTP en la fracción soluble. El análisis de estos *ratios* evidenció que, tanto en hígado como en cerebro, el dATP, dTTP y dCTP se encuentran mayoritariamente en la fracción soluble del extracto (*ratio pellet/sobrenadante* <1) (Figura 39) y, por tanto, no parecen estar interaccionando con ninguna de las proteínas presentes en la fracción proteica de forma significativa. Sin embargo, en el caso del dGTP, el *ratio* obtenido era claramente superior a 1 (Figura 39), lo que evidencia la

presencia mayoritaria de éste en la fracción proteica del extracto (97% en hígado y 87% en cerebro). Estos resultados volvían a corroborar la hipótesis de que la mayoría del dGTP mitocondrial se encuentra retenido en la fracción proteica del extracto, tanto en hígado como en cerebro de ratón. Además, la liberación del dGTP desde la fracción de proteína precipitada únicamente se produce cuando esta se somete a un proceso fuerte de desnaturalización, ya sea por tratamiento en condiciones ácidas o ebullición, lo que indica que la interacción dGTP-proteína es fuerte y estable durante todo el proceso de aislamiento de mitocondrias y extracción de dNTPs.

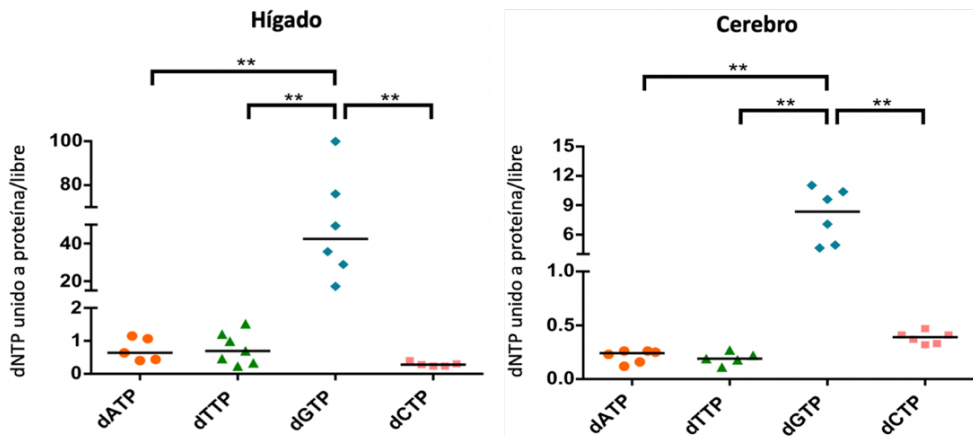


Figura 39: Ratios de dNTP unido a proteína vs libre en mitocondria de hígado y cerebro de ratón. En ambos tejidos, la extracción de dNTPs se realiza mediante precipitación con metanol, acoplada a desnaturalización con TCA, a partir de un extracto de 1 mg de proteína mitocondrial de hígado (izquierda) y cerebro (derecha). El extracto se separa en fracción proteica (dNTP unido a proteína) y fracción soluble (dNTP libre). Se representa el resultado del *ratio* obtenido entre los dNTPs cuantificados en cada fracción. *Ratio* <1 indica dNTP mayoritariamente en fracción soluble; *ratio* > 1 indica dNTP mayoritariamente en fracción proteica; *ratio*=1 indica cantidades iguales de dNTP en ambas fracciones. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal) (Hígado: n=5-7; Cerebro: n= 5-6;). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: **p < 0.01

Por otro lado, resultados obtenidos en nuestro grupo previamente a este trabajo, en los que se utilizó otro tipo de aproximaciones *in vitro*, mediante el empleo de [α - 32 P]-dGTP (dGTP*), también revelaron evidencias de la interacción del dGTP con proteínas de la fracción mitocondrial, lo cual está en consonancia con la hipótesis anterior. En estos ensayos, un extracto mitocondrial de hígado de ratón se solubilizó en 1% de DDM, que preserva la conformación nativa de proteínas y complejos proteicos, y, a continuación, se incubó con dGTP* 20 nM. La mezcla se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizante y el resultado se reveló mediante autorradiografía (Figura 40). La interacción entre las proteínas presentes en el extracto y el dGTP marcado se sometió a competencia química con un exceso de 10 a 100 veces, sobre la concentración de dGTP marcado, de diferentes nucleótidos no marcados. Este resultado mostró dos bandas de movilidad electroforética cuya intensidad se reduce gradualmente hasta la totalidad con un exceso de 10-1000 veces de dGTP no marcado (flechas negras) y, parcialmente con un exceso de 100 veces de diferentes nucleótidos de guanina (dGMP, dGDP y GTP). Sin embargo, estas bandas no se redujeron en ningún caso con un exceso de 100 veces de otros dNTPs (dATP, dTTP y dCTP) (Figura 40). Este resultado evidenció que el dGTP* se acompleja con proteínas del lisado mitocondrial y, como consecuencia, se produce una disminución significativa de la velocidad de migración en el gel respecto al dGTP* que corre libre (Figura 40).

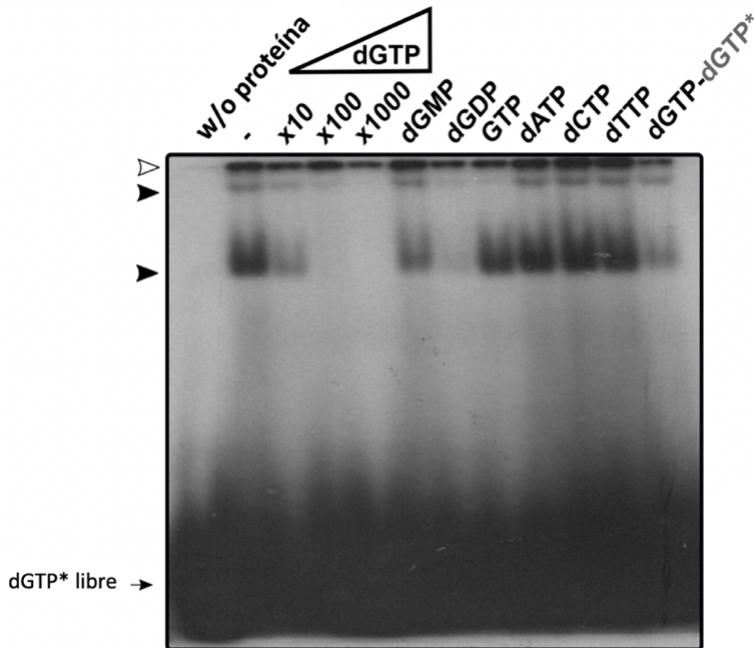


Figura 40: Ensayo de retardo en gel o cambio de movilidad electroforética (EMSA) del dGTP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ (dGTP*)) tras la incubación con lisados mitocondriales de hígado de ratón. Las competiciones se realizaron con un exceso de 10-1000 veces de dGTP no marcado y un exceso de 10 veces de varios dNTPs no marcados (dATP, dTTP y dCTP) y diferentes nucleótidos que contienen guanina (dGDP, dGMP y GTP). Las puntas de flecha blanca indican unión inespecífica y las negras, la unión específica que se desplaza con dGTP no marcado. La flecha indica la migración del dGTP libre (w/o: sin adición de lisado proteico). Imagen obtenida por autorradiografía.

Como hemos mencionado, se pudo observar que la retención del dGTP* en el lisado mitocondrial se puede desplazar en mayor o menor medida con un exceso de nucleótidos de guanina. La competición se da preferiblemente con formas de desoxirribonucleósido y en grado proporcional al grado de fosforilación de este, pero no con un exceso de cualquier otro nucleótido, indicando que la retención del dGTP* en el lisado ocurre de forma altamente selectiva (Figura 40).

En base a estos resultados y, con el objetivo de analizar más en profundidad este complejo dGTP-proteína mitocondrial, se estudió esta interacción mediante una aproximación diferente pero que también asegurase los posibles complejos dNTP-proteína como es el BN-PAGE. Para esto, un *pellet* de mitocondria de hígado de ratón se solubilizó en 1% DDM y, a continuación, se incubó con dGTP*. Finalmente, la interacción entre ambos componentes se trató con un exceso de 10-1000 veces de nucleótido no marcado y el resultado se reveló mediante autoradiografía (Figura 41).

Igual que en el caso anterior, se identificaron tres bandas de movilidad electroforética retardada del dGTP. Dos de ellas (puntas de flecha negras), muestran un comportamiento similar. Ambas se compiten a la concentración más baja de dGTP no marcado empleada, mientras que no lo hacen con un exceso 1000 veces superior de los otros tres dNTPs no marcados, o con un exceso 10 veces superior de cualquiera de los cuatro rNTPs (ATP, UTP, GTP y CTP) (Figura 41 panel derecho). Sin embargo, igual que en el caso anterior (Figura 40), ambas bandas también reducen su intensidad con un exceso de 10 veces de desoxirribonucleótidos de guanina (dGMP y dGDP) y desoxiguanosina no marcados de manera proporcional al estado de fosforilación en el que se encuentran (Figura 41 panel derecho), mostrando así un comportamiento específico para el dGTP. Por lo tanto, podemos deducir que estas bandas indican la presencia de complejos de proteína que se unen de forma específica al dGTP. La tercera banda (punta de flecha blanca), igual que en el caso anterior (EMSA), se consideró que corresponde a complejos de proteína que se unen al dGTP* de forma inespecífica dado que su formación se modifica únicamente ante excesos muy elevados de dGTP no marcado y sin embargo sí se reduce por excesos de otros dNTPs (Figura 41).

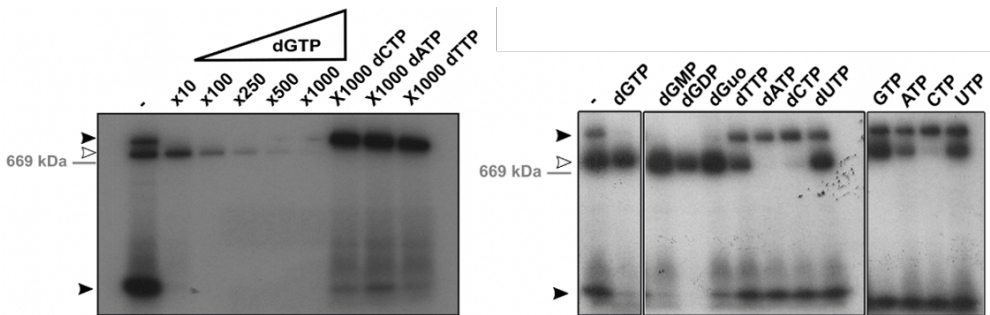


Figura 41: Cambio en la movilidad electroforética del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ después de la incubación con mitocondrias de hígado de ratón lisadas en condiciones nativas y resuelto por BN-PAGE. Se realizaron varias adiciones de (incubaciones con) un exceso de 10-1000 veces de dGTP no marcado y un exceso de 1000 veces de dATP, dTTP y dCTP (izquierda) y con un exceso de 10 veces de nucleótidos de guanina, desoxiguanosina y rNTPs no marcados (derecha). Las flechas negras indican la formación específica de complejos proteína-dGTP* mientras que la blanca indica bandas de origen inespecífico.

En su conjunto, los resultados obtenidos mediante ensayos tipo EMSA y BN-PAGE con radionucleótido revelan que bajo condiciones de migración nativas el dGTP* sufre un cambio relevante en su velocidad de migración electroforética respecto al dGTP* libre. Este retardo podría deberse a que el dGTP* esté formando un complejo con alguna o algunas de las proteínas presentes en el lisado mitocondrial. Además, es importante destacar que una de las bandas de competencia encontradas (flecha negra superior en BN-PAGE) recorre una distancia equivalente a una proteína de peso molecular superior a los 669 kDa, lo que indica que el dGTP* estaría reteniéndose en el lisado mitocondrial formando un complejo proteico de elevado peso molecular que se revela en forma de esta banda de elevado peso.

Por tanto, estos resultados obtenidos previamente concuerdan con los resultados obtenidos mediante los experimentos de separación de la fracción proteica y soluble de los extractos mitocondriales de dNTPs y apoyan la idea

de que el dGTP se encuentre retenido mayoritariamente en la fracción proteica.

3. El dGTP mitocondrial interactúa con el complejo I de la cadena respiratoria a través de la subunidad NDUFA10.

3.1 El complejo I de la cadena respiratoria retiene la mayor parte del dGTP mitocondrial.

Con el objetivo de identificar qué proteína o proteínas mitocondriales son las responsables de la interacción con el dGTP, llevamos a cabo una purificación de las proteínas presentes en un lisado de mitocondria de hígado de ratón mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de agarosa conjugada a dGTP (*immobilized γ -Amino-octyl-dGTP*) (o dCTP, *immobilized γ -Amino-octyl-dCTP* como control de especificidad).

Para ello, se solubilizó un extracto de proteína mitocondrial de hígado de ratón en DDM al 1%, preservando la estructura nativa de los complejos mitocondriales y el lisado resultante se sometió a cromatografía de afinidad con la resina de dGTP. Finalmente, las proteínas retenidas se eluyeron por competición con un exceso de dGTP y se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida. Una vez transcurrida la electroforesis el gel se tiñó, para revelar las bandas de proteína obtenidas, utilizando una solución de *nitrato de plata* (Figura 42).

El resultado de la tinción reveló que, en el caso de la cromatografía de afinidad a dGTP, aparecían dos bandas mayoritarias de proteína con un tamaño comprendido entre 50-25 kDa, que no se observan en la cromatografía de afinidad a dCTP o a agarosa libre, (Figura 42). Por tanto, estos resultados están en concordancia con el hecho de encontrar una proporción significativa de dGTP en la fracción proteica de los extractos mitocondriales analizados.

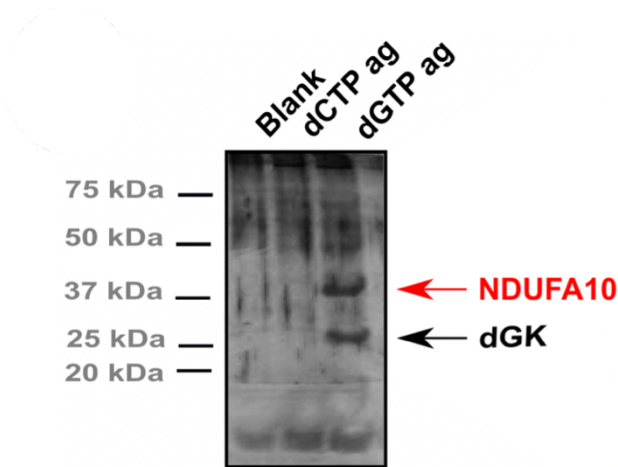


Figura 42: Purificación de proteínas mitocondriales de hígado de ratón mediante cromatografía de afinidad a dGTP. Se muestra el resultado de la purificación por afinidad a dGTP conjugado con agarosa (immobilized γ -Amino-octyl-dGTP) de proteínas mitocondriales de hígado de ratón. Se utilizaron dCTP (immobilized γ -Amino-octyl-dCTP) y agarosa libre de nucleótido como controles de especificidad. En ambos casos, la elución de las proteínas retenidas se realizó con dGTP 100 mM. La mezcla se resolvió mediante electroforesis SDS-PAGE y, finalmente, el gel se tiñó con nitrato de plata para revelar las bandas de proteínas. La identificación de las proteínas presentes en cada banda se llevó a cabo en una purificación a mayor escala teñida con *Coomassie Brilliant Blue G250* y analizada mediante LC-MS/MS.

Una vez determinada la presencia de proteínas de unión a dGTP en los lisados mitocondriales, y sobretodo, la existencia de dos bandas claramente mayoritarias, procedimos a escalar la purificación para conseguir material suficiente para la tinción con Coomassie G250, digestión con tripsina de las bandas y su identificación por LC-MS/MS. El resultado de la identificación reveló la presencia mayoritaria de una proteína en cada una de las bandas obtenidas. En la banda de mayor peso molecular (50-37 kDa) la proteína mayoritariamente identificada fue la NADH:Ubiquinona Oxidorreductasa Subunidad A10 (NDUFA10) (UniProtKB - Q99LC3). En la banda de menor peso molecular (37-25 kDa) se identificó como proteína mayoritaria la desoxiguanosina quinasa (dGK) (UniProtKB - Q9QX60) (Figura 42).

Además, se identificaron otras proteínas, subunidades del complejo I y varias proteínas con capacidad conocida para unir ribonucleótidos (GTP principalmente), pero todas ellas en mucha menor abundancia relativa que la dGK y la NDUFA10.

Como se ha mencionado previamente, la dGK es una proteína con actividad quinasa que participa en la ruta de salvamento mitocondrial para la síntesis de dNTPs. Concretamente, cataliza la primera fosforilación de los desoxirribonucleósidos de purina en la matriz mitocondrial (Figura 16). Además, se sabe que el dGTP actúa como un modulador alostérico de su actividad quinasa, por lo que no resulta sorprendente que fuese purificada por afinidad a dGTP¹¹⁸.

Por otro lado, la NDUFA10 es una subunidad accesoria localizada en el lado de la matriz del brazo de membrana del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta es una subunidad esencial para el ensamblaje del complejo I⁴⁶, pero no se ha descrito ninguna función específica adicional para esta hasta la fecha. Sin embargo, se sabe que esta subunidad presenta un dominio dNK, registrado en la base de datos PFAM (PF01712), que comparte con otras proteínas con función quinasa conocida que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs, como son la dCK en el citosol y la propia dGK o la TK2 en la mitocondria. Pese a esto, no se ha descrito hasta la fecha actividad quinasa en la subunidad NDUFA10 o el complejo I. Recientemente J. Hirst y colaboradores han estudiado en profundidad la estructura del complejo I y en concreto de la subunidad NDUFA10 de ratón mediante cristalografía crioelectrónica (Cryo-EM). Sus resultados sugieren la presencia de un nucleótido de purina con dos fosfatos unidos al dominio dNK de NDUFA10. En base a las predicciones hechas por modelización computacional y su abundancia relativa en la matriz mitocondrial, los autores proponen que se trata de ADP.

Por todo esto, la purificación de la subunidad NDUFA10 y otras subunidades del complejo I por afinidad a dGTP resulta altamente interesante y apoya nuestra hipótesis acerca de que el dGTP mitocondrial se encuentra mayoritariamente unido a proteína. A partir de aquí, teníamos dos proteínas candidatas a ser responsables de la interacción con el dGTP. Por su abundancia relativa y características, decidimos centrar nuestro trabajo en identificar si la NDUFA10 era la responsable de retener o interaccionar con la mayor parte del dGTP mitocondrial.

Para analizar más en profundidad esta posible interacción, se realizó una segunda purificación, mediante cromatografía de afinidad a dGTP, utilizando nuevamente agarosa conjugada a dGTP (*immobilized γ -Amino-octyl-dGTP*), sobre un lisado en DDM de proteína mitocondrial de hígado de ratón. Las proteínas retenidas por afinidad a dGTP se eluyeron de la resina por desplazamiento competitivo mediante la adición de una concentración 100 mM de diferentes ribo- y desoxirribonucleótidos (aproximadamente un exceso de 10 veces sobre la concentración de dGTP provista por la resina), incluyendo ADP. La eficacia de la elución y, por tanto, la capacidad de unión a cada nucleótido se comprobó mediante western-blot e inmunodetección de la proteína NDUFA 10 (Figura 43).

Tras las diferentes eluciones realizadas, pudimos comprobar que únicamente los nucleótidos de guanina (dGTP, dGDP y dGMP) y la desoxiguanosina (dGuo) son capaces de eluir, por desplazamiento competitivo, la proteína NDUFA10 de la resina (con una eficacia de elución directamente proporcional al estado de fosforilación en el que se encuentran) (Figura 43), mientras que ninguno de los otros tres dNTPs es capaz de desplazar significativamente la unión de la NDUFA10 al dGTP (Figura 43). Igualmente, ninguno de los ribonucleótidos de adenina (independientemente de su estado de fosforilación) ni tampoco el GTP, son capaces de eluir la proteína. Estos

resultados parecen indicar que la NDUFA10 presenta capacidad de interacción con el dGTP y, además, esta interacción es específica. Por otro lado, sugieren que la NDUFA10 no presenta capacidad de interacción con el ADP o, que en cualquier caso la afinidad por el dGTP es notoriamente mayor que por el ADP, pues este es incapaz de eluir la proteína adherida al dGTP de la resina a igual concentración (Figura 43).

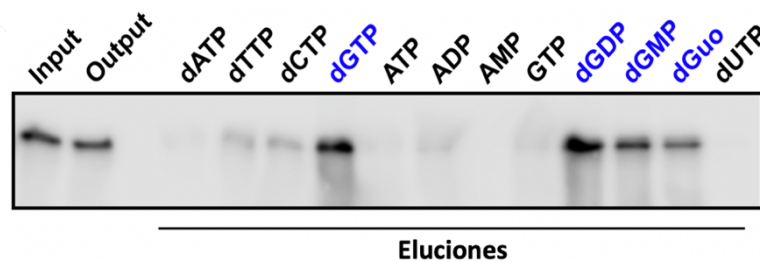


Figura 43: Análisis de la capacidad de unión de la NDUFA10 a diferentes nucleótidos mediante purificación por cromatografía de afinidad. La cromatografía se llevó a cabo sobre un lisado mitocondrial de hígado de ratón (5 mg de proteína mitocondrial) en 1% DMM utilizando dGTP conjugado con una resina de agarosa (*immobilized γ -Amino-octyl-dGTP*). Se realizaron diferentes eluciones de las proteínas purificadas frente a un exceso (100 mM) de diferentes ribo- y desoxirribonucleótidos, así como de desoxiguanosina (dGuo). Sobre las eluciones realizadas se analizó la presencia de NDUFA10 mediante SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpo específico. Input: lisado mitocondrial previamente a la cromatografía; Output: lisado mitocondrial tras la cromatografía.

3.2 El dGTP co-migra con el complejo I mitocondrial en gradientes de densidad de sacarosa.

Para profundizar más en la relación entre el dGTP y la subunidad del complejo I NDUFA10, estudiamos la interacción del dGTP endógeno mitocondrial con el complejo I de la cadena respiratoria mediante el fraccionamiento, en condiciones nativas (1% DDM), de un lisado mitocondrial de hígado y cerebro de ratón, en un gradiente de densidad de sacarosa.

Para ello, preparamos un gradiente de sacarosa con densidades comprendidas entre 15-37,5% en el que los componentes del lisado (5 mg de proteína mitocondrial por lisado) se separaron en función de sus densidades mediante ultracentrifugación. Se dividió el gradiente en 11 fracciones por cada tejido. Una vez separadas, se monitorizó la migración de los diferentes complejos mitocondriales a lo largo del gradiente mediante SDS-PAGE e inmunodetección de subunidades representativas de cada uno de los complejos (Figura 44 panel inferior). Por otro lado, llevamos a cabo la cuantificación de dNTPs presentes en cada una de las fracciones mediante extracción ácida con TCA (Figura 44 panel superior). De esta manera se pudo correlacionar la migración de cada uno de los complejos con la migración de los dNTPs mitocondriales en función de sus respectivas densidades (Figura 44).

El resultado mostró que la mayor parte del dGTP endógeno mitocondrial (70% del total) co-sedimenta con el complejo I de la cadena respiratoria en hígado (en las fracciones 2-3) y en cerebro (en las fracciones 2-4). Sin embargo, el resto de dNTPs mitocondriales sedimentaron juntos en fracciones de densidad inferior (fracciones 7-11 en ambos tejidos) como cabría esperar de encontrarse en forma soluble en la matriz mitocondrial, y separados del resto de complejos OXPHOS, por lo que no parecen estar asociados con ninguno de los complejos mitocondriales (Figura 44). En el caso del dATP, los niveles se encontraron en todo momento por debajo del límite de detección debido a que, posiblemente, este se degradó durante la preparación del lisado o la propia sedimentación, que implica una larga centrifugación de 16 horas.

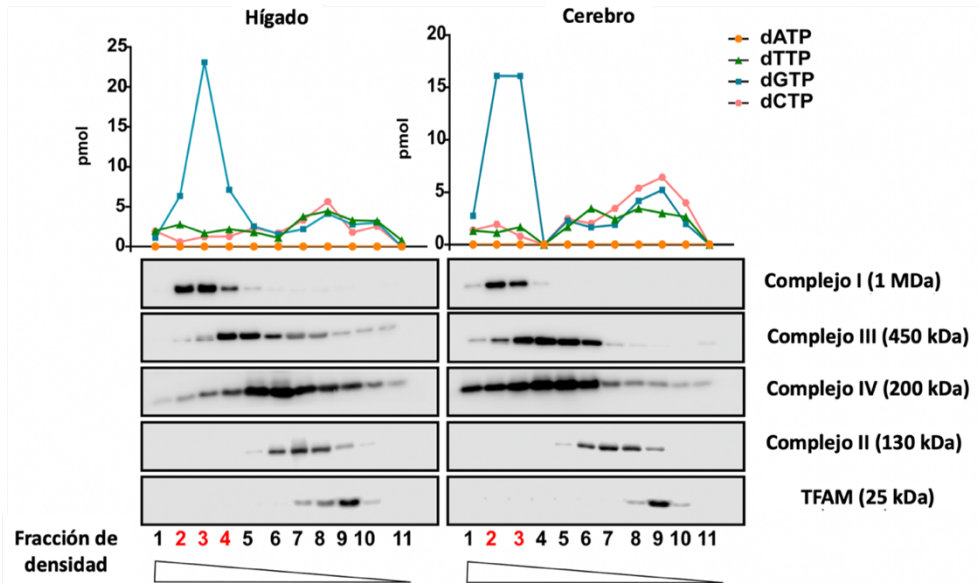


Figura 44: Estudio de co-migración de dNTPs con los complejos OXPHOS en gradiente de densidad. Cuantificación de dNTPs mitocondriales (pmol) (panel superior) en las distintas fracciones, separadas por densidad, de un lisado de mitocondria de hígado (panel izquierdo) o cerebro (panel derecho) de ratón en 1%DDM y su correlación con la migración de los complejos mitocondriales en cada fracción (panel inferior). Se realizó una extracción ácida de dNTPs (TCA) para su cuantificación en cada fracción (panel superior). La migración de los complejos mitocondriales se monitorizó por SDS-PAGE e inmunodetección frente a las subunidades NDUFA10 (complejo I); Core2 (complejo III); Cox IV (complejo IV); SDHA (complejo II) y TFAM (panel inferior). Los triángulos indican la variación de densidad (de mayor a menor) en las distintas fracciones del gradiente.

Igualmente, monitorizamos la migración por densidad del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), normalmente asociado al mtDNA, encontrando que este migra en las fracciones de menor densidad del gradiente (7-10 en hígado y 8-11 en cerebro) y no comigra con ningún complejo mitocondrial (Figura 44). Cabe destacar que la migración de TFAM coincide con el pico de detección del dATP, dTTP y dCTP, en fracciones de densidades más bajas, donde se esperaría que lo hiciesen al encontrarse

libres o no asociados a ningún complejo proteico o proteína de elevado peso molecular.

Por otro lado, para poder correlacionar específicamente, en función de sus densidades, la migración del dGTP mitocondrial con la migración de la NDUFA10, preparamos un segundo lisado mitocondrial de hígado y cerebro de ratón bajo condiciones más astringentes, buscando el desensamblaje de los complejos mitocondriales, pero no la desnaturalización total de las subunidades que los forman. Para ello, lisamos 5 mg de proteína mitocondrial de hígado y cerebro de ratón en paralelo con 1% DDM y 1% Tritón- X-100. Como anteriormente, los componentes del lisado se separaron en 11 fracciones en función de sus densidades y, monitorizamos la migración de NDUFA10 mediante SDS-PAGE e inmunodetección. Igualmente, cuantificamos los dNTPs presentes en cada una de las fracciones mediante extracción con TCA. Estos resultados se compararon con la migración del complejo I y los dNTPs mitocondriales bajo condiciones nativas (1% DDM) (Figura 45).

De esta manera, observamos que el complejo I se distribuyó en un rango de densidades más amplio, posiblemente por la presencia de subcomplejos de composición y por tanto densidad variables originados por la solubilización en Triton. En cualquier caso, pudimos corroborar que el dGTP continuaba comigrando con la NDUFA10 bajo estas condiciones.

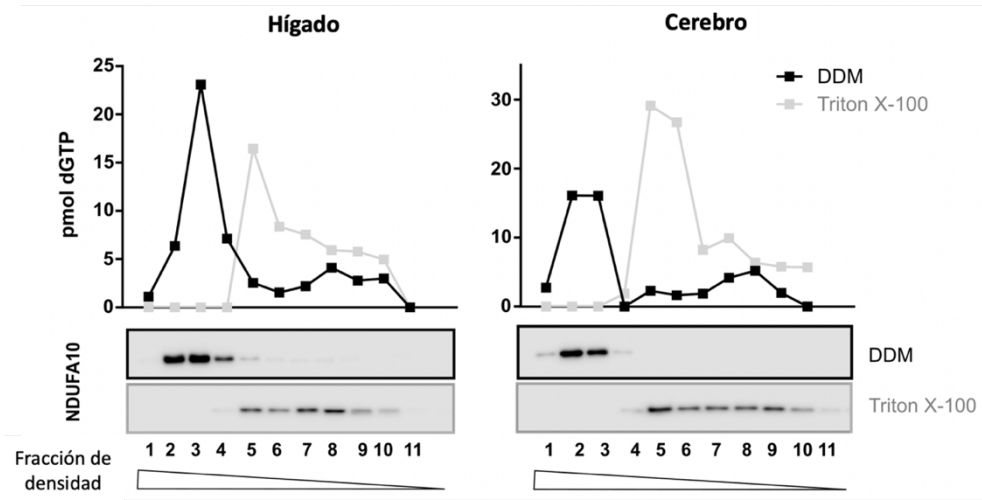


Figura 45: Distribución en el gradiente de densidad del dGTP contenido en lisados mitocondriales obtenidos con distintos detergentes. Cuantificación del dGTP mitocondrial (pmol) (panel superior) en las distintas fracciones, separadas por densidad, de un lisado de mitocondria de hígado (panel izquierdo) o cerebro (panel derecho) de ratón y su correlación con la migración de la NDUFA10 (gris) y el complejo I (negro) en cada fracción (panel inferior). Se realizó una extracción ácida de dNTPs (TCA) para la cuantificación en cada fracción (panel superior). La migración de la NDUFA10 y el complejo I se monitorizó por SDS-PAGE e Inmunodetección frente a la subunidad NDUFA10 (complejo I).

Las observaciones con los distintos gradientes de sacarosa nos permitieron concluir que todo el dGTP endógeno mitocondrial co-migra con el complejo I. Esta relación parece ser altamente específica y estable, pues se mantiene tanto en condiciones en las que la NDUFA10 está formando parte de un complejo I totalmente ensamblado (DDM) (Figura 44) o cuando se encuentra acomplejada a lo que parecerían diferentes formas de complejo I parcialmente ensamblados y, por lo tanto, se distribuye a lo largo de diferentes fracciones de densidad (Tritón) (Figura 45).

3.3 El dGTP co-inmunoprecipita con el complejo I mitocondrial.

Con el objetivo de determinar si la relación observada entre el dGTP endógeno y el complejo I mitocondrial es directa y específica, así como para determinar a qué proporción del dGTP endógeno involucra, decidimos inmunoprecipitar el complejo I bajo condiciones nativas. Para ello, solubilizamos un *pellet* de mitocondria de hígado de ratón bajo condiciones nativas (las mismas condiciones utilizadas en el gradiente de sacarosa) y, a continuación, inmunoprecipitamos el complejo I utilizando una mezcla comercial de anticuerpos monoclonales frente al complejo I mitocondrial (*Complex I immunocapture; Abcam*). En paralelo, incubamos un segundo extracto mitocondrial, lisado en las mismas condiciones, con proteína G como control del proceso, para descartar posibles interacciones inespecíficas. El resultado de la inmunoprecipitación se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección de diferentes subunidades del complejo I mitocondrial y subunidades de otros complejos como control de especificidad (Figura 46 panel derecho). Por otro lado, cuantificamos los dNTPs mitocondriales en los extractos generados durante la inmunoprecipitación, mediante extracción ácida en TCA (Figura 46 panel izquierdo).

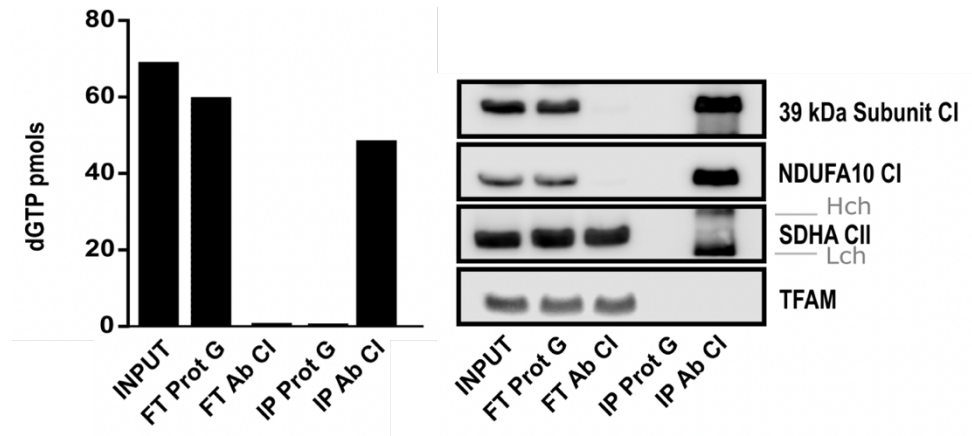


Figura 46: Cuantificación de dNTPs endógenos (izquierda) (pmol) en los extractos obtenidos tras la inmunoprecipitación del complejo I mitocondrial de hígado de ratón (derecha). El resultado de la inmunoprecipitación se monitorizó mediante SDS-PAGE e inmunodetección frente a las proteínas indicadas (panel derecho); se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente el complejo I (Ab CI). En paralelo se realizó una incubación con Proteína G como control de especificidad (Prot G). INPUT: Extracto previo a la inmunoprecipitación; FT: Extracto (*flow-through*) tras la inmunoprecipitación; IP: inmunoprecipitado. Hch/Lch: Cadenas pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos monoclonales utilizados para la inmunoprecipitación que se detectan por unión del anticuerpo secundario utilizado en la inmunodetección posterior. Para cada fracción, se cuantificaron los dNTPs mitocondriales presentes mediante extracción con TCA (izquierda).

El resultado de la inmunoprecipitación mostró que el 70% del dGTP que se pudo detectar inicialmente en el lisado (extracto INPUT) co-inmunoprecipita con el complejo I mitocondrial (extracto IP Ab CI) mientras que no se detectó dGTP en el control con proteína G (IP Prot G). Además, el dGTP apenas fue detectable en el extracto inmunodeplecionado de complejo I (*Flow thorough o output*; FT Ab CI), lo que indica que la práctica totalidad del dGTP endógeno que encontramos en el extracto IP Ab CI estaba unido al complejo I mitocondrial. Cabe destacar que, aproximadamente, un 30% del dGTP detectado inicialmente en el extracto INPUT no pudo ser detectado en el

extracto IP Ab CI ni en el correspondiente FT Ab CI, lo cual parecería indicar que estamos perdiendo esta proporción de dGTP endógeno durante la inmunoprecipitación, posiblemente debido a que el procedimiento experimental conlleva un gran número de pasos. Así mismo, se debe recalcar que inicialmente estamos detectando una cantidad de dGTP de partida en el lisado (INPUT) de unos 68 pmol, mientras que, según nuestros datos experimentales previos, deberíamos partir de una cantidad total de dGTP teórica de 141 pmol (equivalente al contenido esperado de dGTP en un extracto de 5 mg de proteína mitocondrial de hígado). Este resultado indica que solo podemos detectar el 48% del total de dGTP endógeno en el extracto y que, un 52% de este se estaría degradando durante el largo procesamiento de los extractos que implica la solubilización de la fracción mitocondrial y la incubación durante toda una noche de las muestras con anticuerpo. De acuerdo con esta idea, los otros tres dNTPs se encontraron en todos los extractos por debajo del límite de cuantificación, lo que de igual modo sugiere que posiblemente se degradaron durante el procedimiento experimental.

Por otro lado, estos resultados nos proporcionaron una importante orientación para la interpretación de nuestros resultados previos de BN-PAGE con dGTP marcado radiactivamente (dGTP*) (Apartado 2.3 de esta sección). Concretamente, en dichos resultados encontramos que el dGTP en mitocondria interaccionaba con un complejo de alto peso molecular y, cuyo tamaño podría ser compatible con el tamaño esperado para el complejo I (Figura 40 y 41).

Utilizando los extractos carentes de complejo I obtenidos durante la inmunoprecipitación del complejo I mitocondrial pudimos corroborar esta hipótesis. Para esto, estudiamos de nuevo los cambios en la movilidad electroforética en BN-PAGE del dGTP* tras su incubación con el extracto libre

de complejo I (FT Ab CI), el correspondiente control con proteína G (FT Prot G) y el extracto control previo a la inmunoprecipitación (INPUT). La interacción entre el dGTP* y las proteínas presentes en cada extracto se sometió a competencia con un exceso de 20 veces de dGTP no marcado. La mezcla se resolvió por electroforesis BN-PAGE y el resultado se reveló mediante autorradiografía (Figura 47).

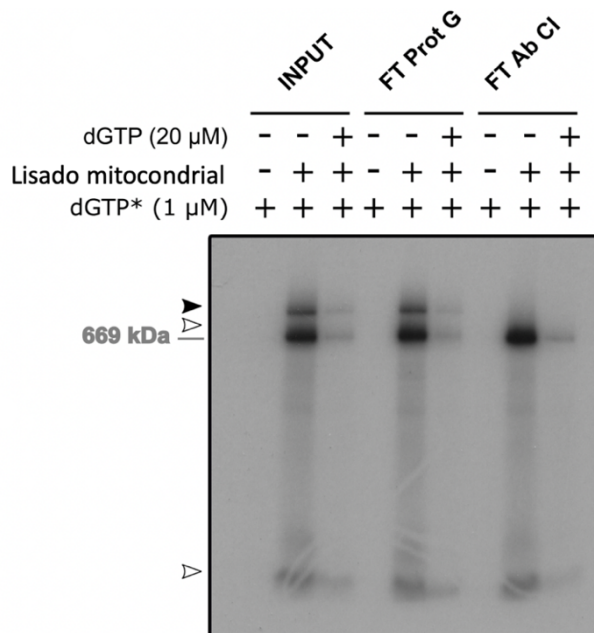


Figura 47: Análisis de los cambios en la movilidad electroforética del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ en BN-PAGE después de su incubación con extractos mitocondriales libres de complejo I. La interacción del dGTP* ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$) con las proteínas presentes en cada extracto (INPUT, FT Prot G, y FT Ab CI) se sometió a competencia con un exceso de 20 veces de dGTP no marcado. La mezcla se resolvió mediante electroforesis BN-PAGE y analizó mediante autorradiografía. Los símbolos +/- indican la adición (+) o no (-) de los componentes indicados en la figura. La flecha negra indica la formación de un complejo entre el dGTP* y el complejo I mitocondrial. Las flechas blancas indican interacciones inespecíficas o complejos de dGTP con otras proteínas. Imagen de autorradiografía obtenida tras 4 h de exposición (se dejó migrar el dGTP* libre (carriles sin lisado mitocondrial) fuera del gel mostrado para aumentar la resolución de las bandas de elevado peso molecular).

El resultado indicó, como anteriormente (Figura 40 y 41), que el dGTP* sufre un retraso significativo de la movilidad en el gel tras incubarlo con los extractos mitocondriales que se resuelve en tres bandas (Figura 47 flechas blancas y negra). El uso de extractos libres de complejo I nos permite identificar la banda superior de la autorradiografía (flecha negra) como específica el complejo dGTP-complejo I, ya que esta desaparece por completo al incubar el dGTP* con ellos (FT Ab CI), mientras que se mantiene en los extractos completos (INPUT y FT prot G). El resto de bandas (flechas blancas) muestran posibles interacciones específicas del dGTP con otras proteínas ya que se reducen parcialmente con un exceso de dGTP no marcado (Figura 47). Cabe destacar que la banda más abundante (primera flecha blanca) corresponde según los ensayos de movilidad previos (Figura 41) a un complejo que no es específico de dGTP, ya que también se reduce con otros dNTPs. Por tanto, este resultado corrobora que al menos en parte, el retraso en la movilidad electroforética del dGTP* se debe a la interacción de este con el complejo I mitocondrial, apoyando la hipótesis de que el dGTP endógeno se encuentra fuerte y establemente unido al complejo I de la cadena respiratoria y que esta unión está mediada por la subunidad NDUFA10 del complejo.

4. Generación de la línea celular humana NDUFA10^{Flag} e inmunopurificación de la proteína NDUFA10.

Una vez identificada la proteína NDUFA10 como la responsable de mediar la interacción entre el dGTP y el complejo I mitocondrial, decidimos generar una línea celular humana que expresase de forma estable la proteína NDUFA10 junto con un *tag* Flag fusionado en su extremo C-terminal (NDUFA10^{FLAG}). Esto nos permitió purificar la proteína NDUFA10 de una forma sencilla y disponer de ella para caracterizar a nivel molecular la interacción NDUFA10-dGTP. Para el proceso se seleccionó la línea celular humana HeLa, debido a su elevada capacidad de replicación e inmortalidad en cultivo y la facilidad en su manipulación. Con el objetivo de obtener una expresión estable, se seleccionaron clones tras su transformación con vectores lentivirales dirigiendo la expresión de NDUFA10^{FLAG}.

4.1 Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10-Flag.

Para obtener la proteína NDUFA10 purificada y poder disponer de ella para la realización de estudios *in-vitro*, esta se inmunoprecipitó a partir del clon HeLa^{Flag} obtenido por transformación con partículas lentivirales. Como control del proceso de inmunoprecipitación se utilizó el clon HeLa^{Control} transformado con el plásmido pLKO.1 vacío.

Para la inmunoprecipitación se prepararon lisados de proteína mitocondrial de ambos clones, que se sometieron al proceso utilizando un anticuerpo frente a la secuencia *tag* Flag conjugado a partículas magnéticas (*ANTI-FLAG M2 Magnetic BEADS, Sigma-Aldrich*®) para facilitar y mejorar el rendimiento del proceso de inmunoprecipitación (Materiales y Métodos apartado 6.2). La elución de la proteína se realizó en condiciones nativas, por desplazamiento competitivo con el péptido comercial 3xFlag (*Sigma-Aldrich*®).

El resultado de la inmunoprecipitación se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección frente a la NDUFA10 (Figura 53).

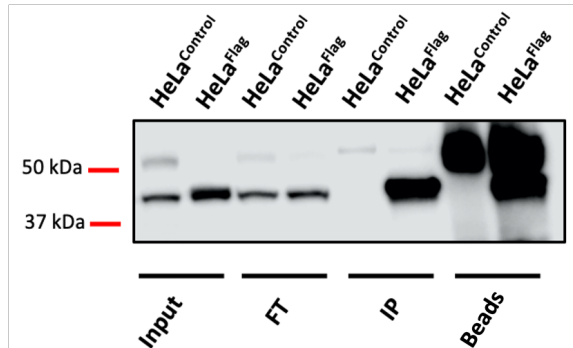


Figura 53: Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10-Flag a partir de mitocondria de células HeLa transformadas con vectores lentivirales. Se realizó una elución de la proteína por competición con el péptido 3xFlag y, el resultado se comprobó mediante SDS-PAGE e inmunodetección frente a la secuencia tag Flag. Se cargaron un 15 μ L del total de extracto IP. *Input*: Extracto previo a la inmunoprecipitación. *FT (Flow-through o output)*: Extracto resultante tras la inmunoprecipitación; *IP*: Inmunoprecipitado resultante de la elución competitiva con péptido 3xFlag. *Beads*: Inmunoprecipitado resultante de la segunda elución desnaturalizante sobre el anticuerpo *ANTI-FLAG M2*. Se muestra el resultado de la inmunodetección con anticuerpo específico policlonal frente a la proteína NDUFA10.

4.2 Cuantificación de la proteína obtenida tras la inmunoprecipitación.

Una vez inmunoprecipitada la proteína NDUFA10, cuantificamos la cantidad de proteína purificada resultante. Para esto, se cargó una curva patrón de concentraciones conocidas y decrecientes de BSA, junto con los extractos inmunoprecipitados procedentes de las líneas HeLa^{Flag} y HeLa^{Control}. Las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue G250*. La tinción evidenció la especificidad de la inmunoprecipitación ya que mayoritariamente detectamos una banda coincidente con el tamaño de NDUFA10 en los inmunoprecipitados provenientes de células HeLa^{Flag}.

Las bandas de proteína resultantes de la tinción (Figura 54 izquierda) se analizaron por densitometría. A partir de los valores de BSA, generamos una recta patrón que nos permitió extrapolar la concentración de NDUFA10 en los inmunoprecipitados (Figura 54 derecha). En base a la ecuación de la recta obtenida, estimamos una concentración de NDUFA10^{Flag} de 2,3 ng/ μ L en el inmunoprecipitado HeLa^{Flag}

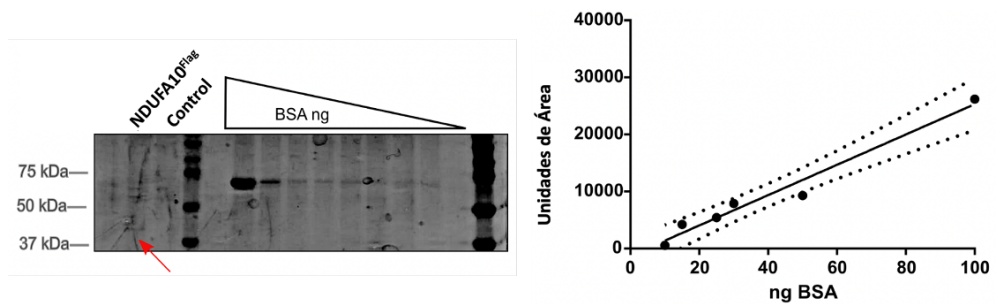


Figura 54: Estimación de la concentración de NDUFA10^{Flag} inmunoprecipitada. tinción con *Coomassie Brilliant Blue G250* (panel izquierdo) densitometría y extrapolación de la concentración a partir de una recta patrón de BSA (panel derecho). Se cargó una recta patrón de BSA de concentraciones decrecientes (200, 100, 50, 30, 25, 20, 15, 10, y 0 ng) junto con 15 μ L de inmunoprecipitado NDUFA10^{Flag} y HeLa^{Control}. El gel se resolvió por SDS-PAGE y las bandas de proteína se revelaron mediante tinción con *Coomassie Brilliant Blue G250* (izquierda). El análisis densitométrico de las bandas y su correlación con las concentraciones de BSA arroja una recta patrón $Y=265,8X-1276$; $R^2=0,96$ (derecha). A partir de esta recta se dedujo la concentración estimada de NDUFA10 en los inmunoprecipitados.

5. Estudio *in vitro* de la interacción NDUFA10-dGTP.

5.1 Ensayo de fotoafinidad: *UV-Crosslink*.

Una vez que disponíamos de la proteína NDUFA10 purificada y cuantificada se llevaron a cabo una serie de ensayos basados en los ensayos clásicos de fotoafinidad y *UV-Crosslink*, para caracterizar en más detalle la interacción NDUFA10-dGTP.

En general estos experimentos, tal y como se indica en el apartado 10.3 (materiales y métodos), consistieron en poner en contacto la proteína inmunopurificada (30ng de proteína por condición), con una concentración conocida de dNTP marcado radiactivamente con [α - 32 P] (20 nM en cada caso) para permitir la formación del complejo proteína-dNTP. Una vez se ha formado el complejo, la interacción se fija induciendo la formación de enlaces covalentes tras someter las muestras a radiación ultravioleta. El complejo covalente formado es altamente estable y puede resolverse mediante electroforesis SDS-PAGE. Finalmente, el resultado se comprueba por autorradiografía detectando la señal del [α - 32 P].

En una primera aproximación estudiamos la interacción de la NDFUA10 con cada uno de los cuatro [α - 32 P]-dNTPs por separado (Figura 55). Además, para descartar posibles interacciones inespecíficas del dNTP con alguno de los componentes de la mezcla, se añadieron controles como el propio tampón de elución utilizado en la inmunoprecipitación. A su vez, para descartar la posible unión a proteínas de forma inespecífica añadimos controles de BSA a dos concentraciones diferentes. El resultado obtenido únicamente reveló señal de autorradiografía en el caso del dGTP* incubado con la proteína NDUFA10 (Figura 55), mientras que no se observó ningún tipo de interacción entre el resto de dNTPs marcados utilizados y cualquiera de los componentes de la mezcla de reacción.

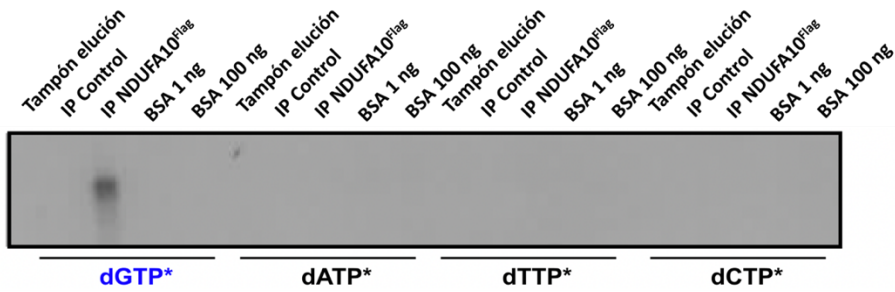


Figura 55: Resultado del UV-Crosslink entre la NDFUA10 y los cuatro $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dNTPs. Cada uno de los cuatro dNTPs marcados se incubó con 30 ng de NDUFA10 y el resto de los controles indicados en la figura. La mezcla se sometió a radiación UV para inducir la formación de enlaces covalentes en el complejo proteína-dNTP y se resolvió mediante electroforesis SDS-PAGE. EL resultado se reveló mediante autorradiografía.

En base a este resultado pudimos comprobar que la NDUFA10 presenta capacidad para unir el dGTP *in vitro*. Esta capacidad de unión es altamente específica y no se da con ningún otro dNTP analizado. Además, se comprueba que no existe interacción inespecífica entre los dNTPs y cualquiera de los componentes presentes en el tampón de elución o la albúmina.

Una vez descartada la interacción de la NDFUA10 con el dATP, dTTP o dCTP, realizamos otro ensayo de *UV-Crosslink* para caracterizar mejor la afinidad de la NDUFA10 por el dGTP. En este caso, la interacción entre ambos se estudió frente aun exceso de 100 veces de diferentes nucleótidos de guanina (dGTP, dGDP, dGMP, GTP), desoxiguanosina (dGuo) y el resto de dNTPs fríos. La mezcla se incubó para permitir la formación del complejo NDUFA10-dNTP y, a continuación, se sometió a radiación ultravioleta para fijar los enlaces generados. El complejo resultante se resolvió mediante electroforesis SDS-PAGE y el resultado fue comprobado por autorradiografía (Figura 56)

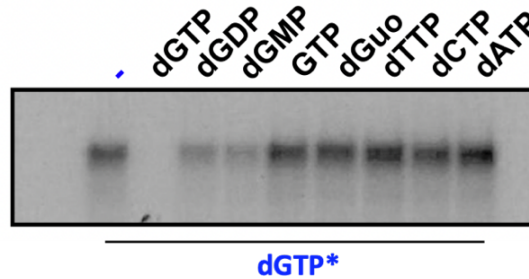


Figura 56: UV-Crosslink entre NDUFA10 y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$. Ensayo de selectividad por competencia. 30 ng de NDUFA10 se incubaron con 20 nM de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ y la interacción entre ambos se estudió frente a un exceso de 100 veces de diferentes nucleótidos de guanina (dGTP; dGDP; dGMP, GTP), desoxiguanosina y dATP; dTTP; dCTP fríos. La mezcla se resuelve por electroforesis SDS-PAGE y el resultado se revela por autorradiografía. Se muestra el resultado de autorradiografía tras 4 h de incubación.

El resultado mostró que únicamente los desoxirribonucleótidos de guanosina (dGTP, dGDP y dGMP) son capaces de competir y desplazar la unión NDUFA10-dGTP*. Además, la facilidad de esta competencia es proporcional al grado de fosforilación en el que se encuentran. Es importante destacar que el rNTP de guanina (GTP) y la propia dGuo no son capaces de competir la unión, así como tampoco lo son el resto de dNTPs (Figura 56) en las condiciones de incubación. Todos estos resultados sugieren que existe una elevada especificidad de unión entre la NDUFA10 y el dGTP, tal y como ya habíamos descrito en los experimentos de BN-PAGE y EMSA (Figura 40,41).

5.1 Aproximación a la estequiometría de unión NDFUA10-dGTP.

Una vez que demostramos la capacidad de la NDUFA10 para unir, al menos *in vitro*, el dGTP y que esta unión presenta una elevada especificidad, el siguiente paso fue determinar en qué proporción estequiométrica tiene lugar dicha interacción. Dado que ya habíamos cuantificado previamente la concentración de proteína de la que se disponía, esta se utilizó para generar

otra curva patrón que permitiese estimar la cantidad de NDUFA10 presente por cada mg de proteína mitocondrial de hígado de ratón.

Para esto, cargamos en un gel de poliacrilamida una recta de cantidad creciente de proteína correspondiente a un lisado de mitocondria de hígado de ratón junto con otra recta de cantidad creciente de proteína NDUFA10^{Flag} inmunopurificada. El conjunto se resolvió por electroforesis SDS-PAGE y se sometió a inmunodetección de la proteína NDUFA10 (Figura 57 izquierda). Las bandas resultantes se analizaron por densitometría para generar una recta patrón que correlacionase los ng de NDUFA10 por cada μ g de proteína mitocondrial (Figura 57 derecha).

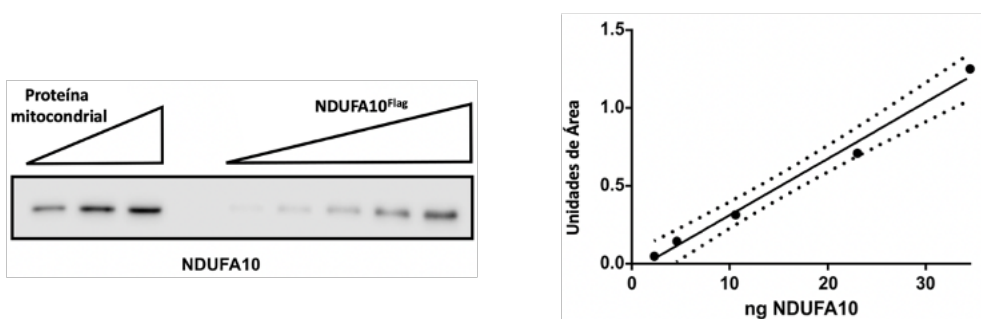


Figura 57: Estimación de la concentración de NDUFA10 por mg de proteína mitocondrial. Se generó una recta patrón de concentraciones crecientes (10, 20, y 30 μ g) de proteína procedente de un lisado de mitocondria de hígado de ratón y, por otro lado, se generó otra recta de concentraciones crecientes de proteína NDUFA10^{Flag} inmunopurificada (2,3, 4,6, 11,5, 23, y 34,5 ng). Ambas se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección frente a la proteína NDUFA10 (izquierda). Por extrapolación de la densitometría de bandas entre ambas rectas se obtuvo una recta de ecuación $Y=0,03324X-0,05030$; $R^2=0,99$; que permite correlacionar los ng de NDFUA10 por μ g de proteína mitocondrial.

En base a estos resultados se determinó que hay presentes $1,87 \pm 0,35$ μ g (media \pm SD) de NDUFA10 en 1 mg de proteína mitocondrial de hígado de ratón (Figura 55), lo cual corresponde a 44,5 pmol de NDUFA10 por mg de proteína mitocondrial, teniendo en cuenta su peso molecular (42.000 g/mol).

Según nuestros datos anteriores, determinamos que hay $28,2 \pm 6,5$ pmol de dGTP (media \pm SD) por mg de proteína mitocondrial (Figura 35). Teniendo en cuenta que previamente habíamos determinado que aproximadamente el 90% del dGTP mitocondrial está unido a la proteína NDUFA10 en mitocondria de hígado de ratón (Figura 37), pudimos estimar que hay 1 pmol de dGTP por cada 1,5 pmol de NDUFA10 en mitocondria de hígado de ratón. Estos datos junto con la información disponible actualmente sobre la estructura de la proteína NDUFA10, que muestran un lugar de unión a nucleótido, coincidiendo con el dominio desoxirribonucleósido quinasa, sugieren que la relación estequiométrica para la unión NDUFA10-dGTP más probable es de 1:1.

6. Caracterización molecular de líneas celulares *knock-out* para NDUFA10 o con mutaciones en su dominio dNK

6.1 La NDUFA10 comparte una alta homología de secuencia con algunas desoxirribonucleósido quinasas de la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs.

Para analizar en detalle la secuencia y estructura de la NDUFA10 y en base a la información de la que previamente disponíamos, decidimos realizar un alineamiento múltiple de secuencia con algunas de las proteínas incluidas en la familia dNK no TK1-similar con las que comparte una elevada identidad y que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs, como son la desoxiguanosina quinasa (dGK), la timidina quinasa 2 (TK2) y la desoxicitidina quinasa (dCK) o la DmdNK. Todas estas proteínas comparten el dominio dNK, según se recoge en la base de datos Pfam (PF01712). Sin embargo, a diferencia del resto de proteínas con las que se comparó la secuencia, en la NDUFA10 no se ha descrito actividad quinasa hasta la fecha. La mayoría de los aminoácidos que rodean el lugar de unión al nucleósido y al ATP donador de fosfatos están altamente conservados en la proteína NDUFA10 de ratón y humana. En el alineamiento, reconocemos varios motivos conservados dentro del dominio dNK, como el P-loop (GX₄GKS/T) y la región LID (RX₃RXR₂E) que juegan un papel importante en mediar la unión del nucleótido donador de fosfato y el motivo ERS (Glu-Arg-Ser), necesario para la unión del nucleósido substrato y la catálisis. Estos aminoácidos conservados incluyen los residuos en NDUFA10: E88, Y118, Q132, R161, D166 y E226, que en la dCK humana forman parte del sitio de unión a nucleósido (substrato), y el E160, que en la dCK se ha inferido como el sitio activo del aceptor de protones

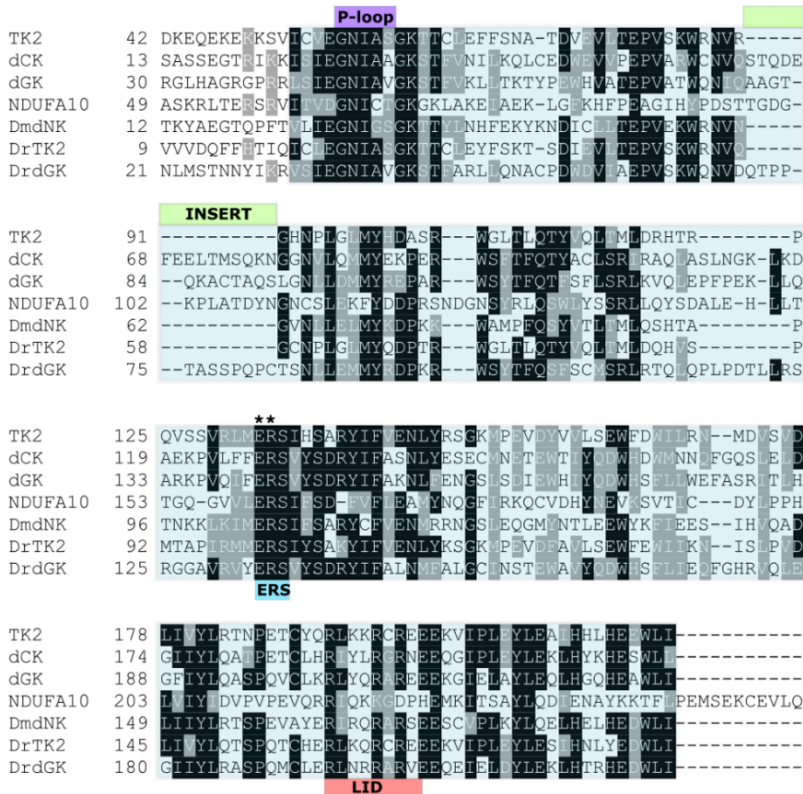


Figura 58: Alineamiento múltiple de secuencia entre la NDUFA10 humana y algunas proteínas de la familia dNK. Las secuencias FASTA se obtuvieron de la base de datos Uniprot (hTK2 (O00142-1); hdCK (P27707-1); hdGK (Q16854-1); hNDUFA10 (O95299-1); DmdNK (Q9XZT6-1); DrTK2 (AOA0R4IP35-1); DrdGK (A5WUY2-1)). El alineamiento múltiple se realizó con la herramienta T-coffe y posterior edición mediante el *software* boxshade. El sombreado azul define el dominio dNK (Pfam PF01712). En distintos colores se localizan los motivos conservados dentro del dominio (LID, ERS y P-loop).

Por otro lado, como ya se ha mencionado, recientemente estudios de Cryo-EM sobre la estructura de la NDUFA10 han sugerido la presencia de un nucleótido unido a su dominio dNK. En base a modelización computacional y su abundancia relativa en la mitocondria se ha propuesto el ADP como candidato. Sin embargo, nuestros resultados descartan la interacción NDUFA10-ADP y, por el contrario, apoyan claramente la interacción con el

dGTP mitocondrial. Por tanto, en base a todos los datos disponibles hasta el momento, postulamos el dominio dNK de la subunidad NDUFA10 como el lugar de unión más probable para la mayor parte del dGTP contenido en mitocondria.

6.2 Obtención de líneas celulares HEK-293T *knock-out* (NDUFA10^{KO}) y *knock-in* (NDUFA10^{KI}) para la NDUFA10.

Para estudiar más a fondo dónde y cómo interacciona el dGTP con la NDUFA10 y qué consecuencias moleculares puede tener la pérdida de dicha interacción, utilizamos dos modelos celulares previamente generados y cedidos por el Dr. M. T. Ryan (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Melbourne, Australia*). En concreto, las líneas celulares utilizadas han sido:

- HEK-293T-NDUFA10^{KO} (KO): *knock-out* para el gen *NDUFA10* humano obtenido mediante CRISPR-Cas9.
- HEK-293T-NDUFA10^{KI} (KI): línea transformada para la expresión estable del cDNA de *NDUFA10* humana con dos mutaciones en su dominio dNK (E160/R161). Generada sobre la línea HEK-293T-NDUFA10^{KO}. Incluye un tag Flag en su extremo C-terminal.
- HEK-293T-NDUFA10^{Flag} (FLAG): línea transformada para la expresión estable de la proteína de fusión *NDUFA10* humana con un péptido FLAG en su extremo C-terminal. Generada sobre la línea HEK-293T-NDUFA10^{KO}.

Todas las líneas mencionadas fueron seleccionadas previamente en el laboratorio del Dr. M. T. Ryan para tener niveles de expresión de la proteína *NDUFA10* similares a los niveles de la línea *NDUFA10*^{WT} (*WT, wild-type*), de cara a utilizarlas en futuros ensayos funcionales.

Dado que la NDUFA10 es una subunidad accesoria esencial para el ensamblaje del complejo I, es de esperar que la ausencia de NDUFA10 en la línea KO provoque también la pérdida del complejo I mitocondrial. Sin embargo, tanto en la línea KI como en la Flag, la expresión de la proteína está preservada y, por tanto, cabía esperar que el ensamblaje y la actividad del complejo I también (a falta de comprobar un posible efecto directo de las modificaciones introducidas sobre la actividad o estabilidad del complejo). Concretamente, en la línea KI se introdujeron dos mutaciones puntuales dentro de una de las zonas más conservadas del dominio dNK, el motivo ERS (E160A/R161A) de la proteína. Los modelos computacionales no predicen que estas mutaciones afecten la estabilidad de la proteína, pero indican que pueden tener potencial para distorsionar la estructura del dominio dNK lo suficiente como para dificultar o evitar la interacción con el dGTP. Por otro lado, en la línea FLAG se expresaba la proteína NDUFA10 *wild-type* conjugada a un *tag* Flag. La caracterización de todas las líneas celulares se llevó a cabo a diferentes niveles, según se detalla a continuación.

6.3 Análisis de la expresión de la proteína NDUFA10 en las líneas celulares KO y KI.

El primer paso para la caracterización de las diferentes líneas celulares fue estudiar, a nivel de proteína, la expresión de la NDUFA10 en cada una de ellas. Para ello, se realizó una extracción de proteína, partiendo de un *pellet* celular que se resolvió por electroforesis SDS-PAGE western-blot e inmunodetección de la proteína NDUFA10 (Figura 59).

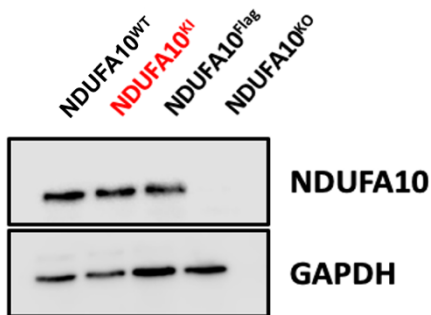


Figura 59: SDS-PAGE e inmunodetección de NDUFA10 en extractos de proteína de las líneas celulares utilizadas. La inmunodetección de GAPDH se utilizó para normalizar la carga de proteína.

El resultado confirmó que la línea KO carecía de NDUFA10 y el resto de las líneas tenían niveles de proteína similares entre si y a los de la línea WT.

6.4 Estudio del ensamble del complejo I mitocondrial en las líneas NDUFA10^{KO} y NDUFA10^{KI}.

A continuación, estudiamos la estabilidad del complejo I mitocondrial en cada una de las líneas mediante electroforesis BN-PAGE. Para esto, partimos de un *pellet* de proteína mitocondrial que se resolvió en un gel Bis-Tris nativo en gradiente de poliacrilamida del 4-16% (p/v). El resultado se comprobó mediante inmunodetección de la proteína NDUFA10 (Figura 60).

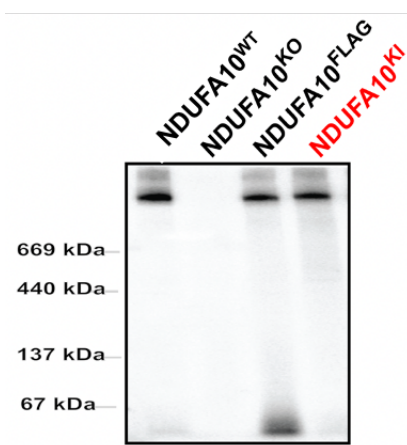


Figura 60: BN-PAGE e inmunodetección de complejo I. En todos los casos se cargan 30 µg de proteína mitocondrial. Inmunodetección utilizando anticuerpo anti-NDUFA10.

El resultado indica que, tal y como esperábamos, la línea KO carece de complejo I ensamblado dada la ausencia de proteína NDUFA10. Igualmente, comprobamos que las mutaciones introducidas en la línea KI no afectan de forma relevante al ensamblaje del complejo I (al menos en lo que se refiere a los niveles estacionarios del complejo I, que son similares a los detectados en las líneas WT y FLAG).

6.5 Determinación de la actividad del complejo I mitocondrial.

Una vez que comprobamos que el complejo I estaba correctamente ensamblado en la línea KI y FLAG y que no estaba presente en la línea KO, se analizó su actividad enzimática (NADH deshidrogenasa) en cada una de las líneas (Figura 61) mediante ensayo espectrofotométrico. Este aspecto resulta especialmente crítico, pues para estudiar el efecto de la interacción dGTP-complejo I necesitábamos un modelo celular que preferiblemente no presentase alteraciones importantes en la función enzimática principal del complejo I, ya que un déficit oxidativo importante se ha asociado a desbalances en el *pool* mitocondrial de dNTPs y, por tanto, el posible efecto que detectásemos no podría ser atribuido directamente a la disrupción de la interacción complejo I-dGTP, sino a la reducción, total o parcial, de complejo I o de su actividad.

Para ello, preparamos lisados mitocondriales de cada una de las líneas celulares y analizamos, mediante espectrofotometría, la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm debido a su oxidación durante la transferencia de electrones para la reducción de la ubiquinona, en la reacción catalizada por el complejo I mitocondrial. Los valores obtenidos se expresan en relación a la actividad citrato sintasa determinada como normalizador de masa mitocondrial. Como cabría esperar según los datos de BN-PAGE, el resultado mostró una clara disminución de la actividad del complejo I

mitocondrial en la línea celular KO, mientras que no aparecieron diferencias significativas entre la línea WT y la línea KI (Figura 61). En su conjunto, todos los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que las mutaciones introducidas en la línea KI no afectan a la expresión, la estabilidad o la actividad del complejo I mitocondrial.

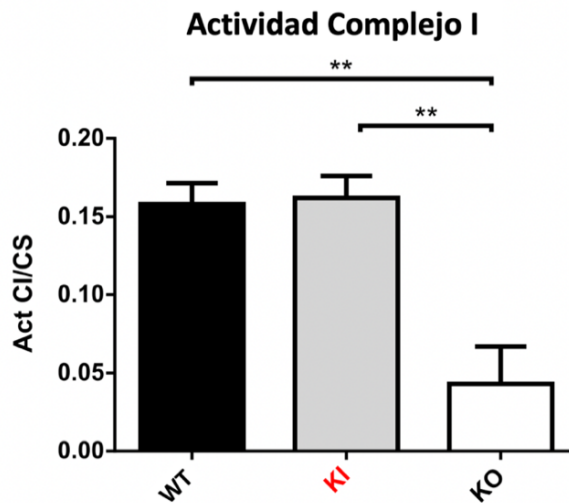


Figura 61: Determinación de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria. Determinación de la actividad NADH deshidrogenasa en base a los cambios de absorbancia del NADH a 340 nm durante su oxidación en la transferencia de electrones a la ubiquinona. WT: NDUFA10^{WT}; KI: NDUFA10^{KI}; KO: NDUFA010^{KO}. El resultado se normaliza en base a la actividad citrato sintasa. Las gráficas representan la media y las barras representan la desviación estándar (n= 5 para cada línea celular). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: **p < 0,01.

6.6 Análisis *in vitro* de la interacción NDUFA10^{KI}-dGTP.

6.6.1 Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10^{KI}.

La línea celular HEK-293T-NDUFA10^{KI} de la que se disponía expresa la proteína NDUFA10 con las dos mutaciones *missense* introducidas (E160A/R161A) conjugada a un *tag* Flag que se utilizó para inmunoprecipitarla y disponer de ella para el estudio *in-vitro* de la interacción NDUFA10-dGTP.

El proceso de inmunoprecipitación se llevó a cabo en paralelo utilizando las líneas FLAG y KI. Para esto, mitocondrias aisladas de ambas líneas se sometieron al proceso de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo frente a la secuencia *tag* Flag ANTI-FLAG M2 Magnetic BEADS (Sigma-Aldrich®). La elución se realizó en condiciones nativas, por desplazamiento competitivo utilizando el péptido comercial 3xFlag. El resultado de la inmunoprecipitación, en cada caso, se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección frente a la proteína NDUFA10 (Figura 62).

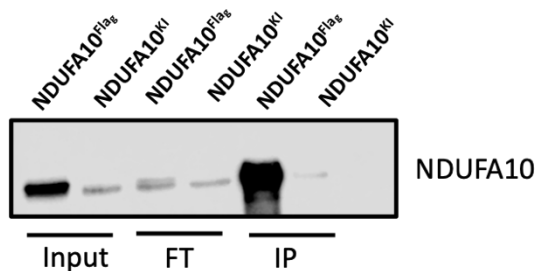


Figura 62: Inmunoprecipitación de la proteína NDUFA10^{KI} y NDUFA10^{FLAG}. Realizamos una elución de la proteína por competición con el péptido 3xFlag y, el resultado se comprobó mediante SDS-PAGE e inmunodetección frente a la proteína NDUFA10. Se carga un 15% del total de muestra obtenida. *Input*: Extracto previo a la inmunoprecipitación. *FT*: (*Flow-through*) Extracto resultante tras la inmunoprecipitación; *IP*: inmunoprecipitado.

Una vez que dispusimos de ambas proteínas inmunoprecipitadas, la concentración obtenida en cada caso se extrapoló utilizando una curva patrón de BSA, de igual manera que en el caso de la proteína NDUFA10^{FLAG} inmunoprecipitada de células HeLa (apartado 4.5 de esta sección).

6.6.2 Análisis de la afinidad de la NDFUA10KI por el dGTP *in-vitro*.

Una vez se disponía de la proteína NDUFA10^{FLAG} y NDUFA10^{KI} inmunopurificadas, se procedió a determinar si las mutaciones introducidas en la NDUFA10 afectaban de forma significativa a la capacidad de unión al dGTP mediante otro ensayo de UV-Crosslink como el realizado anteriormente para la proteína NDUFA10^{FLAG} inmunopurificada (cita la figura a la que te refieres aquí que así les ayudas).

El resultado mostró que, a diferencia de la proteína WT que puede unir dGTP a la concentración más baja empleada, la proteína KI pierde la capacidad de unión a dGTP *in-vitro* y no es capaz de unirlo ni a una concentración 100 veces superior a la empleada con la proteína WT (Figura 63). Esto indica que las dos mutaciones introducidas en la línea KI generan una distorsión suficiente en la estructura del dominio dNK de la NDUFA10 como para provocar la pérdida de la capacidad de unión *in vitro* al dGTP. Además, los datos corroboran la hipótesis de que este dominio es el lugar de unión al dGTP en la proteína.

Para confirmar la pérdida de afinidad por el dGTP en la línea celular KI que observamos *in vitro*, realizamos una nueva aproximación tratando de emular unas condiciones más próximas a lo que ocurriría *in vivo*. Para esto, llevamos a cabo un nuevo ensayo de cromatografía de afinidad a dGTP, utilizando agarosa conjugada a moléculas de dGTP (γ -amino-octil-dGTP), sobre las proteínas presentes en un lisado mitocondrial de las líneas celulares WT y KI.

Se partió de extractos mitocondriales de ambas líneas, que se lisaron en condiciones nativas. Las proteínas purificadas por afinidad se eluyeron de la resina por desplazamiento competitivo con un exceso de concentraciones crecientes de dGTP (Figura 64).

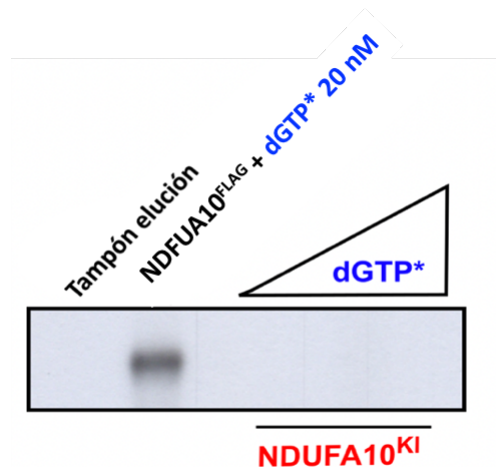


Figura 63: Resultado del UV-Crosslink entre la NDUFA10^{FLAG} y NDUFA10^{KI} inmunopurificadas y el [α -³²P]-dGTP. Se incubaron 30 ng de NDUFA10^{FLAG} con [α -³²P]-dGTP (20 nM) como control positivo de unión. Por otro lado, se incubaron 30 ng de NDUFA10^{KI} con concentraciones crecientes (20; 200; 2000 nM) de [α -³²P]-dGTP. La mezcla se sometió a radiación UV para inducir la formación de enlaces covalentes en el complejo proteína-dNTP y se resolvió mediante electroforesis SDS-PAGE. Se muestra el resultado de la autorradiografía.

El resultado de la elución reveló que la proteína WT se eluye de la resina a concentraciones de dGTP inferiores que la proteína KI, lo que sugiere que, aunque con menor afinidad, la proteína mutada retiene cierta capacidad de unión al nucleótido. Estos resultados parecen contradecir los obtenidos en el ensayo UV-Crosslink previamente realizado. Sin embargo, cabe destacar que en la cromatografía por afinidad realizada pueden entrar en juego otros factores o condicionantes fisicoquímicos que pueden darse en el extracto mitocondrial, de tal forma que estos podrían favorecer la unión proteína-nucleótido, al contrario de lo que sucede en el ensayo *in vitro* con proteína purificada, en el que dichos factores fisicoquímicos ya no estarían presentes.

Por lo tanto, la cromatografía realizada en estas condiciones está indicando que la mutación E160A/R161A en la proteína KI le permite mantener aún capacidad de interacción con el dGTP, aunque con menor afinidad de lo que lo puede hacer la proteína WT. Todos estos resultados sugieren que el dGTP se une a la proteína NDUFA10 a través del dominio dNK de esta y, que las mutaciones introducidas en dicho dominio provocan una disminución en la afinidad de la proteína por el dGTP.

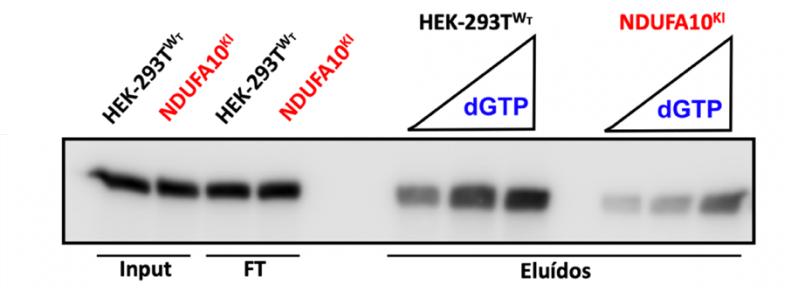


Figura 64: Análisis de la capacidad de unión de la NDUFA10^{WT} y NDUFA10^{KI} a dGTP mediante purificación por cromatografía de afinidad. La cromatografía se llevó a cabo sobre un lisado mitocondrial de ambas líneas celulares (100 µg de proteína mitocondrial) utilizando agarosa conjugada a dGTP (*immobilized γ-Amino-octyl-dGTP*). Se realizaron diferentes eluciones de las proteínas retenidas en la resina mediante un exceso a concentraciones crecientes de dGTP (0,1, 1 y 10 mM) (sobre la concentración aproximada de dGTP que provee la resina). Las proteínas eluïdas en cada condición se resuelven por electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección frente a la proteína NDUFA10; Input: lisado mitocondrial previo a la cromatografía; FT (*Flow-through*): Extracto resultante tras la cromatografía; Eluïdos: Extractos resultantes de la elución de las proteínas que quedan retenidas en el dGTP conjugado a la agarosa. Se muestra el resultado de la inmunodetección de NDUFA10.

6.7 Consecuencias de la disrupción del complejo NDUFA10-dGTP sobre el *pool* de dNTPs mitocondriales.

Una vez introducidas las mutaciones que disminuyen la capacidad de NDUFA10 por unir el dGTP, determinamos el impacto de dichas mutaciones sobre los niveles endógenos de dGTP mitocondrial. Para esto, en primer lugar, se realizó una cuantificación de los dNTPs mitocondriales en extractos procedentes de las líneas WT, KI y KO (Figura 65). La cuantificación mostró que no existen diferencias relevantes en cuanto a los niveles mitocondriales de dATP, dTTP y dCTP entre las tres líneas celulares estudiadas. Sin embargo, sí que aparecen diferencias claras en cuanto a los valores de dGTP obtenidos. En concreto, existe una reducción del 75% en el dGTP mitocondrial en la línea KO y una reducción de entorno al 50% en el caso de la línea KI (Figura 65).

Estos resultados están en concordancia con lo observado hasta el momento, corroborando la hipótesis de que las mutaciones introducidas en la línea KI provocan una disminución de la capacidad de interacción con el dGTP, pero no la pérdida completa de esta, lo que se traduce en un efecto evidente sobre el contenido mitocondrial en dGTP. De igual modo en la línea celular KO, que además carece de complejo I ensamblado, se aprecia un efecto mucho más acusado sobre el contenido mitocondrial de dGTP (Figura 65).

Por último, se estudió qué consecuencias tiene la alteración de la interacción entre el dGTP y la NDUFA10 sobre la presencia mayoritaria del dGTP en la fracción proteica de extractos mitocondriales. Para esto, realizamos una extracción utilizando el método de extracción de dNTPs anteriormente descrito en el apartado 10.1.3 (materiales y métodos) sobre mitocondria de las líneas celulares WT, KI y KO, separando la fracción proteica (*pellet*) y libre (sobrenadante) de dNTPs en cada caso. Cuantificamos los cuatro dNTPs en

cada fracción y analizamos la relación entre la fracción proteica y la libre (*pellet*/sobrenadante) (Figura 66).

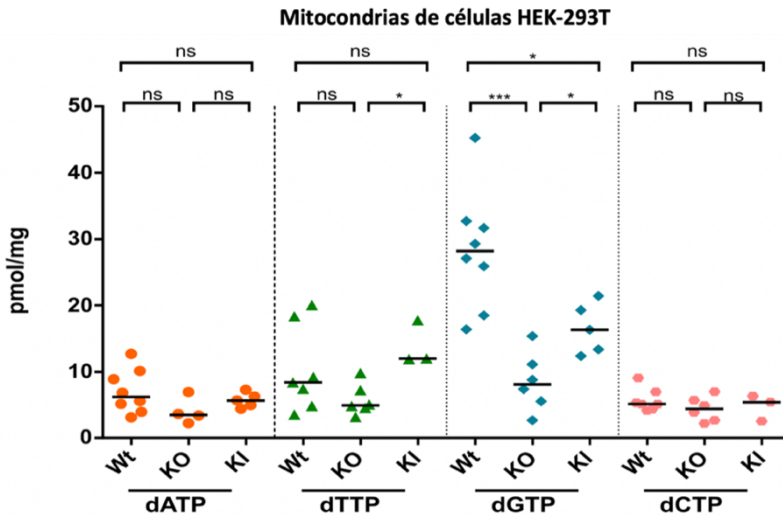


Figura 65: Cuantificación de dNTPs mitocondriales obtenidos en las diferentes líneas de células humanas HEK-293T. La extracción de dNTPs se realiza en medio ácido (TCA) a partir de un *pellet* fresco de 1 mg de proteína mitocondrial. Se representan los pmol de dNTPs obtenidos por mg de proteína utilizado. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal) (WT: n=7-8; KI: n= 3-5; KO n= 6-4). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: ***p < 0.001; *p < 0.05; ns: resultado no estadísticamente significativo (p > 0.05).

Igual que sucede con la cuantificación total de los dNTPs, no existen diferencias significativas en el *ratio* unido/libre para el dATP, dTTP y dCTP, estando este en todos los casos claramente por debajo de 1, indicando que el nucleótido se encuentra mayoritariamente libre en mitocondria. Sin embargo, en el caso del dGTP el *ratio* es claramente superior a 1 (19,8) en células WT, indicando que la práctica totalidad del dGTP presente en mitocondria se encuentra unido a proteína. En el caso de las líneas KO y KI se produce un descenso significativo del *ratio* (Figura 66). Concretamente, este

ratio se reduce un 81% en células KO y un 75% en células KI, aunque continúa estando por encima de 1 (3,66 y 4,93 respectivamente) (Figura 66). Estos resultados indican que el descenso que se observa en el dGTP mitocondrial total a consecuencia de las mutaciones introducidas en las líneas celulares afecta principalmente a la fracción de dGTP que se encuentra unido a proteína. Sin embargo, los ratios permanecen por encima de 1 tanto en la línea KI como en la KO, que carece totalmente de NDUFA10, sugiriendo que el dGTP detectado, aún siendo una muy pequeña proporción del inicial, permanece unido a proteínas distintas a NDUFA10.

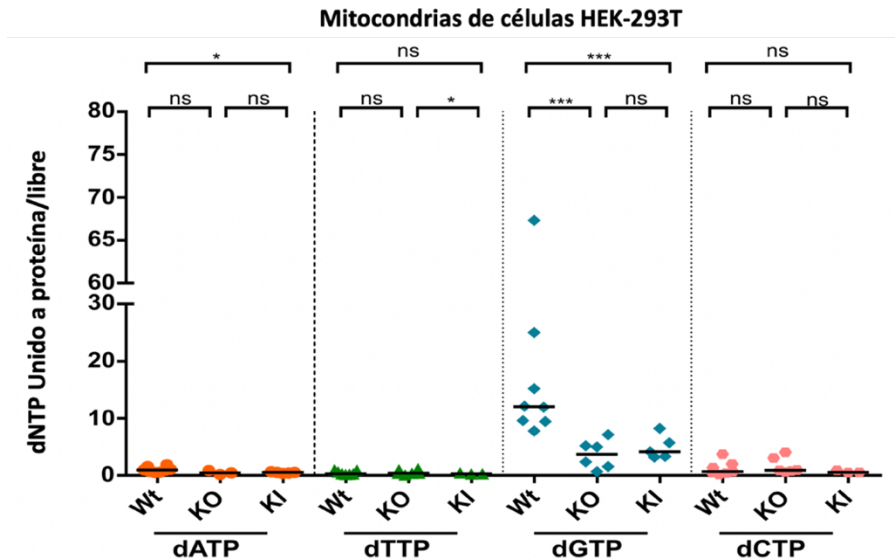


Figura 66: Ratios de dNTP unido a proteína vs libre en mitocondria de las líneas celulares HEK-293T WT; KI; KO. En todas las líneas, la extracción de dNTPs se realizó mediante precipitación con metanol, acoplada a desnaturalización con TCA, a partir de un extracto de 1 mg de proteína mitocondrial. El extracto se separó en fracción proteica (dNTP unido a proteína) y fracción soluble (dNTP libre). Se representa el resultado del *ratio* obtenido entre las cuantificaciones de la fracción proteica y soluble. Ratio <1 indica dNTP en fracción soluble; ratio > 1 indica dNTP en fracción proteica. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal) (WT: n=7-8; KI: n= 3-5; KO n= 6-4). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: ***p < 0.001; *p < 0.05; ns: resultado no estadísticamente significativo (p > 0.05).

6.8 Consecuencias de la pérdida de la unión NDUFA10-dGTP sobre la estabilidad del mtDNA.

Como último paso para caracterizar el efecto que tiene la pérdida de afinidad por el dGTP en las líneas KI y KO, estudiamos cómo esta afecta a la estabilidad del mtDNA en dichas líneas celulares. Para esto, extrajimos DNA de las líneas bajo estudio, junto con el DNA de la línea WT como control y analizamos el número de copias de mtDNA en cada una de ellas mediante rt-qPCR (Figura 67). El resultado de la cuantificación evidenció que no existen diferencias significativas en el número de copias de mtDNA (*ratio* mtDNA/nDNA) en las líneas KI y KO respecto a la línea WT, lo que indica que la pérdida de afinidad por el dGTP en estas líneas no se traduce en un efecto directo sobre la estabilidad del mtDNA.

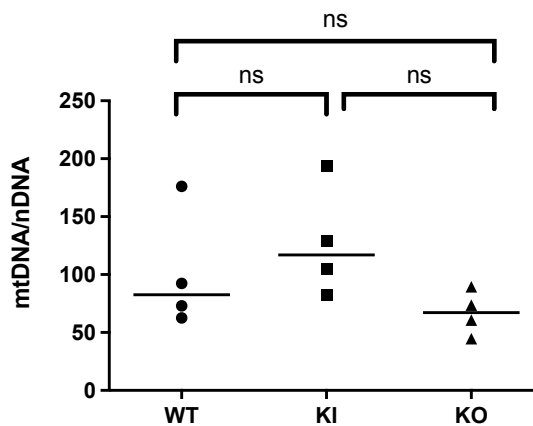


Figura 67: Número de copias de mtDNA en las líneas celulares WT, KI y KO mediante rt-qPCR. Se muestra el *ratio* entre el mtDNA y el nDNA en las líneas WT; KI y KO analizado mediante rt-qPCR y partiendo de 50 ng de DNA en cada caso. La gráfica representa la mediana del *ratio* mtDNA/nDNA ($n=4$ para cada línea celular). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0.05$).

6.9 Consecuencias sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Con el objetivo de conocer cuál es el estado energético de las mitocondrias en las líneas celulares con mutaciones en NDUFA10 (KI y KO), analizamos la producción de ROS, tanto mitocondrial como celular. Durante el funcionamiento normal y en correcto estado de acoplamiento de la cadena respiratoria, en torno al 1-3% del oxígeno que se consume se reduce de forma incompleta, generando con ello una serie de electrones “fugados” que interaccionan rápidamente con el oxígeno molecular (O_2), reduciéndolo a anión superóxido (O_2^-). Para estudiar la producción de ROS se analizó la fluorescencia emitida a 585 nm de la sonda comercial *MitoSOXTM* (*Molecular ProbesTM*) (Figura 68 izquierda). Para el estudio del ROS celular se utilizó la sonda H_2DCFDA (*invitrogenTM*) (Figura 68 derecha), analizando la fluorescencia emitida a 525 nm. La sonda MitoSOX tiene capacidad para penetrar en la matriz mitocondrial donde reacciona con el superóxido mitocondrial, dando cambios de fluorescencia proporcionales a la concentración de este. La sonda H_2DCFDA no penetra en la mitocondria y puede reaccionar con cualquier tipo de ROS que se encuentre en el citoplasma.

En el caso de las ROS mitocondriales, no encontramos diferencias entre las tres líneas celulares analizadas (Figura 68 izquierda). Sin embargo, en el caso de las ROS celulares si que aparecen diferencias significativas (Figura 68 derecha). En concreto, las líneas KI y KO presentan niveles significativamente más altos de ROS que la línea WT, mientras que no aparecen diferencias en cuanto a la producción entre las líneas KI y KO.

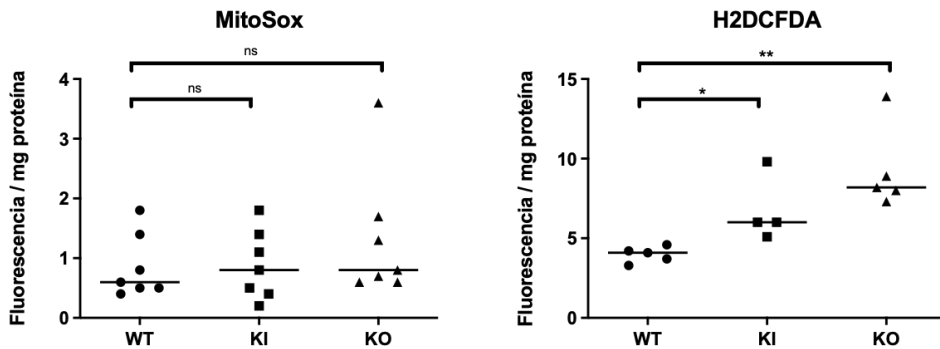


Figura 68: Producción de ROS en células HEK-293T $NDUFA10^{WT}$, $NDUFA10^{KI}$ y $NDUFA10^{KO}$. En todos los casos se partió de 600.000 células por condición. Los valores se normalizaron respecto a la fluorescencia basal de las células en cada condición y posteriormente se corrigieron en función de la cantidad de proteína presente en el ensayo. Las gráficas de dispersión representan la mediana de las determinaciones. (MitoSox, $n = 7$ para cada línea celular; H2DCFDA, $n = 5$ para cada línea celular). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

6.10 Consecuencias sobre el potencial de membrana mitocondrial.

Para continuar caracterizando el desempeño mitocondrial, decidimos analizar el potencial de membrana mitocondrial. En las mitocondrias activas, y en condiciones normales de funcionamiento, la cadena respiratoria acopla el transporte de electrones al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente de protones que se traduce en un potencial de membrana negativo. Cuando este potencial de membrana se está utilizando para otros fines independientes de la síntesis de ATP, el potencial negativo que se consume no se recupera y esto se traduce en una positividad del potencial de membrana.

El estudio del potencial de membrana mitocondrial se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente y con carga positiva TMRE (*Molecular ProbesTM*).

La sonda entra en la mitocondria de forma proporcional al gradiente electroquímico y, por tanto, la intensidad de fluorescencia detectada es indicativa del potencial de membrana. (Figura 69). El resultado reveló una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial tanto en células KI como en células KO (Figura 69). Además, encontramos que las células KI presentan un potencial de membrana más reducido que las células KO, lo que sugiere que en este caso el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial podría ser menor en células KI que en células KO.

En su conjunto, los resultados obtenidos con la determinación de ROS y potencial de membrana indican que, aunque las mutaciones introducidas en la línea KI no interfieren de forma significativa con el ensamblaje o la función del complejo I, estas podrían estar alterando de algún modo la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. En próximos estudios será preciso determinar si estas alteraciones pueden ser debidas a la relación del dGTP con la NDUFA10.

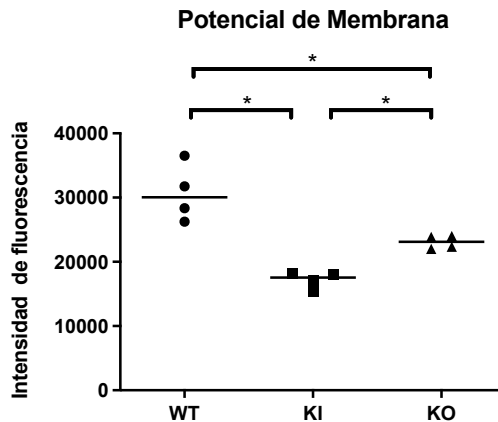


Figura 69: Potencial de membrana en células HEK-293T, NDUFA10^{WT}, NDUFA10^{KI} y NDUFA10^{KO}. Se realizó marcaje fluorescente con la sonda comercial TMRE a una concentración final de 200 nM, que posteriormente se analizó por citometría de flujo. Se analizaron 10.000 células por condición. La gráfica de dispersión representa la mediana de las determinaciones totales (n= 4 para cada línea celular). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: *p < 0,05.

7. Generación y estudio en un modelo experimental *in vivo* de la interacción NDUFA10-dGTP (modelo murino *knock-in* E160A/R161A para la subunidad mitocondrial NDUFA10).

7.1 Generación de un modelo murino *knock-in* para la proteína NDUFA10.

Hasta el momento hemos encontrado evidencias experimentales, *in vitro* e *in vivo*, que nos han conducido a determinar que el complejo I mitocondrial y, concretamente, la subunidad NDUFA10, está uniendo la mayor parte del dGTP mitocondrial en tejidos de ratón y células humanas. Sin embargo, desconocemos el papel fisiológico que esta interacción pueda tener. Como ya se ha comentado, disponemos de una línea celular HEK-293T en la que la interacción NDUFA10-dGTP se ve comprometida (NDUFA10^{KI}, KI). Como consecuencia, las células KI presentan alteraciones en el *pool* mitocondrial de dNTPs, concretamente, un importante descenso en el contenido de dGTP. Pese a esto, pensamos que las consecuencias de dicha interacción podrían ser más acentuadas en células no replicativas, donde el aporte de dNTPs hacia la mitocondria, procedentes del citoplasma celular, es mucho menor. Por esto, decidimos generar un modelo animal donde poder estudiar a fondo y en diferentes tejidos, el papel del dGTP en su interacción con la NDUFA10.

Como hemos comentado, en el modelo celular KI mostramos que las dos mutaciones *missense* introducidas en el dominio dNK de la proteína se traducen en una reducción significativa de la afinidad por el dGTP., Estas mutaciones no parecen afectar a la estabilidad de la proteína ni del complejo I mitocondrial, lo cual es importante en el marco de este estudio. Dado el alto porcentaje de identidad de secuencia (60%) existente entre la proteína humana y murina (Figura 70), decidimos introducir estas mismas mutaciones en el modelo murino que generamos.

Para el proceso de generación del modelo contamos con la empresa *Taconic Biosciences*, que fue la encargada de generar un modelo constitutivo *kncok-in* para la proteína NDUFA10 con un fondo genético C57BL/6NTaq (C57BL/6NTac-*Ndufa10*^{em6473(E160A, R161A)Tac}). El proceso de generación se basó en edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas-9 y regeneración con oligonucleótidos sintéticos portadores de las mutaciones de interés. Se introdujeron unas mutaciones en el exón 4 para provocar el cambio del ácido glutámico de la posición 160 por una alanina y de la arginina 161 por otra alanina (E160A/R161A) (Materiales y Métodos, apartado 2.1).

O95299-2	NDUAA_HUMAN	1	MALRLLKLAATSASARVVAAGAQRVGIHSSVQCKLRYGMWHFLGDKASKRLTERSRVI	60
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	1	MALRLLRLVPASAPARGLAAGAQRVGRHTSVHCKLRYGLLAAILGDKTTKRLHEYSRVI	60
			*****:* . : ** * :***** **:*:*****: :*****:*: * ****	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	61	TVDGNICTGKGLAKEIAEKLGFKHPPEAGIHYPDSTTGDGKPLATDYNGNCSLEKFYDD	120
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	61	TVDGNICSGKNLAKETIAQQLGMKHYPEAGIQSSTTTGDRPLDIEFSGSCSLEKFYDD	120
			*****:*: * *****: : **:*:*****:* . :*****:* : : * *****	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	121	FRSNDGNSYRLQSWLYSRLLQYSDALEHLLTTGQGVVLERSIFSDFVFLAMYNQGFIR	180
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	121	PKSNDGNSYRLQSWLYSRLLQYADALEHLLSTGQGVVLERSIYSDFVFLAMYNQGYIR	180
			*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	181	KQCESALQTHFWTGVAGASGKLESGSSEVLLINERGGRSKPGVDHYNEVKSVTICDYLP	240
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	181	KQC-----VDHYNEIKRRLTPEYLP	200
			*** *****:* : * : **	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	241	PHLVIIYIDVPVE-----PHEMKITSAYLQDIENAYKKTFLPEMSEKCEVLQYSA	290
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	201	PHAVIYIDVPVEVQSRIQKKGDPHEMKVTSAYLQDIENAYKKTFLPKMSEMCEVLVYDS	260
			** ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	291	REAQDSKVVEDIEYLKFDKGPWLKQDNRTLYHLRLLVQDKFEVLNYTISIPIFLPEVTIG	350
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	261	WEAEDPTKVVEDIEYLKYNKGPWLKQDDWTFHYLRMLVQDKTEVLNYTIPVYLPETIG	320
			:* . ***:*****: * : **:*:***** *****:*****:*****:*	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	351	AHQTRDLVHQFRERLWDVTCFGEESTEVKHKQHLLSVQPGTVALTVGSWLRSCLLGLHWK	410
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	321	AHQGSRIYNSFRELPGRKYAPGY-----NAEVGDKIWLK-----	355
			*** . * : : ** * . . . * * . . . * * . . . *	
O95299-2	NDUAA_HUMAN	411	LLFLFPESPMHTTAFMFLC	429
Q99LC3	NDUAA_MOUSE	356	-----	355

Figura 70: Alineamiento de las secuencias entre la proteína NDUFA10 humana y murina: El alineamiento de secuencias se llevó a cabo mediante la herramienta de alineamiento de secuencias provista por la base de datos UniProtKB utilizando el programa CLUSTAL Omega. El resultado del alineamiento evidencia un total de 246 posiciones idénticas y 63 posiciones similares del total de 355 residuos que presentan ambas proteínas. El resultado arroja una homología de secuencia del 56%. Ref Seq para NDUFA10: O95299-2 humana; Q99LC3 ratón.

Una vez que dispusimos del modelo animal, la presencia del alelo *knock-in Ndufa10*^{KI} se comprobó mediante PCR y secuenciación Sanger (Material y métodos, apartado 2.2).

Para agilizar el genotipado de los animales, introdujimos además de las mutaciones de interés, una mutación silente que genera una diana de restricción para *Nhe* I en la zona de interés. Esto habría de permitirnos diferenciar los animales a utilizar a partir de una RFLP. Así pues, el genotipado por PCR se ha realizado a partir de DNA genómico extraído a partir de biopsias de oreja de cada uno de los animales en cuestión. El proceso se detalla en el apartado 2.2 de materiales y métodos. Brevemente, este consta de una primera amplificación por PCR del exón 4 del gen *Ndufa10* (486 pb) (Figura 71 izquierda) y a continuación una digestión, con la enzima *Nhe*I, de los fragmentos amplificados (Figura 71 derecha). En el caso del alelo KI, la mutación introducida genera una diana de restricción para *Nhe*I que corta el exón 4 en dos fragmentos de 297 y 189 pb respectivamente (Figura 71 derecha).

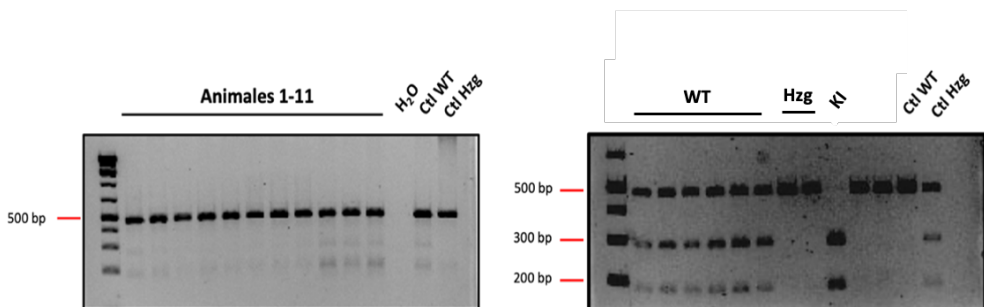


Figura 71: Ejemplo de genotipado por PCR y análisis de restricción (RFLP) de los animales *NDUFA10*^{KI}. En la PCR (izquierda) se amplifica el exón 4 del gen *Ndufa10* (amplificación de 486 pb). El alelo KI genera una diana de restricción que se reconoce por la enzima *Nhe*I para generar dos fragmentos de 297 y 189 pb (derecha). Ambos procedimientos se resuelven por electroforesis en gel de agarosa. WT: Animales con genotipo *Wild type* (*Ndufa10*^{WT/WT}); Hzg: Animales con genotipo heterocigoto (*Ndufa10*^{E160A;R161A/WT}); KI: Animales con genotipo homocigoto para el alelo *knock-in* (*Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}). Como marcador de peso molecular se utilizó el *Gene rules 1 Kb plus* (*ThermoFischer Scientific*)

7.2 Proporciones mendelianas: distribución por sexo y genotipo

Una vez obtenidos los animales heterocigotos para el alelo *knock-in* portador de las mutaciones E160A/R161A procedimos a analizar la viabilidad de los animales homocigotos para el alelo portador de las mutaciones. Para ello cruzamos animales heterocigotos y analizamos la descendencia. Para llevar a cabo esta primera caracterización estudiamos un total de 142 animales que se repartieron en cuanto a sexo y genotipo según se recoge en la siguiente tabla (Tabla 28).

Del total de animales estudiados, el 54% fueron machos y el 46% hembras, por lo que la distribución por sexos de la descendencia fue la esperada según las proporciones mendelianas.

<i>Genotipo</i>	Machos (♂)	Hembras (♀)	% ♂	% ♀
<i>WT/WT</i>	13	28	17	42
<i>WT/KI</i>	39	30	51	45
<i>KI/KI</i>	24	8	32	12
<i>Total</i>	76	66	100	

Tabla 28: Análisis de proporciones genotípicas y de sexo en la descendencia de cruces entre animales heterocigotos para el alelo *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}; *WT/WT*: *Ndufa10*^{+/+}; *WT/KI*: *Ndufa10*^{+/E160A;R161A}; *KI/KI*: *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}).

Tras analizar el porcentaje de animales *Ndufa10*^{+/+} (*WT/WT*); *Ndufa10*^{+/E160A;R161A} (*WT/KI*) y *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A} (*KI/KI*) obtenidos en función del sexo, encontramos que, en el caso de los machos, la descendencia parece seguir unas proporciones similares a las proporciones mendelianas esperadas (25/50/25).

Sin embargo, en el caso de las hembras encontramos una desviación significativa de las proporciones esperadas, encontrando muchas menos crías KI/KI de las esperadas. Este descenso se traduce en un aumento de casi el doble de los animales WT/WT que esperaríamos encontrar (Tabla 28).

7.3 Estudio de supervivencia.

El primer paso para analizar las consecuencias fisiológicas que tiene la presencia del alelo *Ndufa10*^{KI} (*Ndufa10*^{E160A/R161A}) fue estudiar la supervivencia de los animales para cada sexo y genotipo. El estudio de supervivencia se llevó a cabo analizando los animales, según se distribuyen por sexos y genotipos, que se recogen en la Tabla 28.

Para esto se utilizó el estimador de supervivencia Kaplan-Meier que permite una representación gráfica mediante una función escalonada. El análisis de la supervivencia se hizo en función del sexo de los animales, así como por sus genotipos (Figura 72).

En cuanto a la supervivencia de los animales machos, encontramos que no existen diferencias entre los animales WT/WT y WT/KI, presentando los animales de ambos genotipos una supervivencia y condición física normales hasta el punto final del estudio a las 35 semanas (Figura 72 izquierda). Sin embargo, en el caso de los KI/KI, empiezan a producirse bajas a partir de la semana 28, no logrando superar ninguno de ellos la semana 31 de vida, con una media de $27,7 \pm 2,2$ semanas (media \pm SD).

En el caso de las hembras encontramos un comportamiento muy similar, presentando en este caso una supervivencia media de $27,4 \pm 2,5$ semanas (media \pm SD) (Figura 72 derecha).

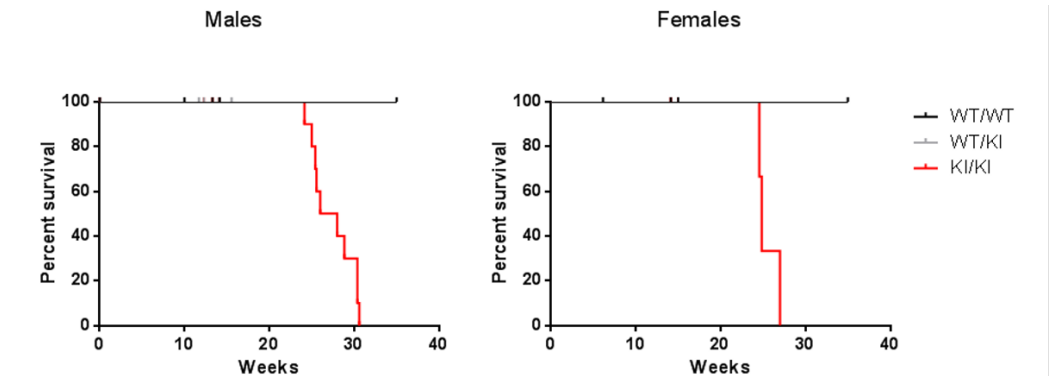


Figura 72: Curva de Kaplan-Meier para el estudio de la supervivencia. Se representa el porcentaje de supervivencia para cada genotipo en función de la edad en semanas para machos (izquierda) y hembras (derecha). Negro: WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; Gris: WT/KI, *Ndufa10*^{+/E160A;R161A}; Rojo: KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}.

7.4 Estudio de la evolución del peso.

El siguiente paso para caracterizar las consecuencias fisiológicas y funcionales que tiene la presencia del alelo *Ndufa10*^{KI}, fue estudiar la evolución de las curvas de ganancia de peso en machos y hembras según sus genotipos. Estudiamos la evolución del peso desde el momento del destete (semana 3) hasta alcanzar el punto final del estudio. El número y distribución de sexos y genotipos de animales utilizados se recogen en la Tabla 28.

Tras estudiar la evolución de las curvas no encontramos diferencias relevantes en cuanto a la ganancia de peso entre animales WT/WT y WT/KI, ni en el caso de machos ni en las hembras (Figura 73). Sin embargo, sí que pudimos encontrar diferencias significativas cuando se comparan estos grupos con los animales KI/KI. En el caso de los machos (Figura 73 panel izquierdo) encontramos una ralentización de la velocidad de ganancia de peso respecto a WT/WT y WT/KI a partir de la semana 12 de vida, que se hace mucho más evidente entre las semanas 15-20.

Finalmente, a partir de la semana 20 se produce una pérdida abrupta de peso que continua hasta la semana 29 de vida, momento en el cual la mayoría de los animales mueren.

En el caso de las hembras KI/KI ocurre algo similar a los machos (Figura 72 panel derecho). No aparecen diferencias evidentes de peso entre genotipos hasta la semana 15, cuando los animales KI/KI dejan de ganar peso y se estabilizan, hasta la semana 20, en un peso menor que los animales WT/WT y WT/KI, que continúan ganando peso normalmente. A partir de la semana 20 empieza a producirse un descenso abrupto y rápido del peso de los animales KI/KI que continua hasta la muerte de los animales.

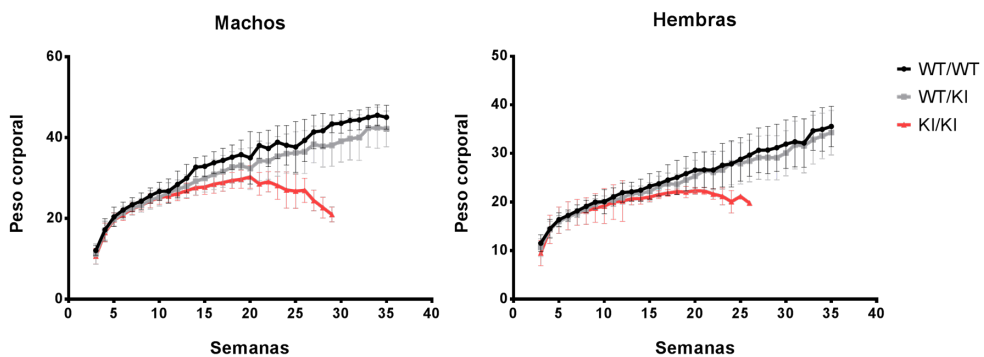


Figura 73: Evolución de la curva de pesos en machos (izquierda) y hembras (derecha). Se representan los mismos individuos descritos en la Tabla 28. Se representa la evolución del peso (g) frente al tiempo (semanas de vida). Línea negra: WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; Línea gris: WT/KI, *Ndufa10*^{+/E160A;R161A}; Línea roja: KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}

Estos resultados están en concordancia con lo que se refleja en la curva de supervivencia (Figura 72), en la que ya se mostraba que los animales KI/KI, tanto machos como hembras, empiezan a empeorar su condición física y a morir entre las 24 y 30 semanas de vida ($27,6 \pm 2,2$ semanas (media \pm SD)).

7.5 Análisis macroscópico de los órganos de interés.

Una vez que dispusimos de la información sobre la evolución del peso y supervivencia de los animales KI, decidimos estudiar cual podría ser la causa más probable de la muerte prematura de los animales KI/KI. Para esto, decidimos estudiar, a nivel macroscópico, el hígado, cerebro y corazón de animales WT/WT y KI/KI en busca de posibles alteraciones. Además de la observación macroscópica de la anatomía de los órganos, el parámetro en el que inicialmente nos hemos centrado ha sido el peso relativo de cada uno de los tejidos respecto al peso corporal total del animal.

Dado que los estudios de supervivencia y peso indicaban que el desarrollo de los animales es normal hasta la semana 15 de vida, decidimos inicialmente centrarnos en animales de esta edad para el estudio. Para ello, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los órganos de interés según se indica en los apartados 2.5 y 2.6 de Materiales y Métodos.

El resultado no mostró diferencias en el peso o aspecto general del hígado y el cerebro entre animales WT/WT y KI/KI (Figura 74). Sin embargo, en el caso del corazón, encontramos que el peso del órgano en los animales KI/KI era significativamente superior (aproximadamente 2 veces más) que el de los animales WT/WT (Figura 74). Las diferencias de peso se veían reflejadas en un aumento en las dimensiones del corazón, que eran mucho mayores sobre todo en las edades más próximas a la muerte del animal. Las paredes parecen engrosadas con conservación de los volúmenes de las cavidades internas, aunque estas observaciones deberán confirmarse en estudios posteriores de ecocardiografía y anatomía patológica. Por tanto, estos resultados nos hicieron pensar que la causa más probable de las alteraciones en el desarrollo que observamos a partir de la semana 15 de vida y,

posiblemente, de la muerte prematura de los animales KI sea la cardiomiopatía hipertrófica.

Para tener una visión longitudinal de la patología cardíaca en los animales KI/KI, decidimos analizar, a lo largo del tiempo, como evolucionaba el peso del corazón. Para esto, eutanasiamos y extrajimos el corazón de animales WT/WT y KI/KI a las 8, 15 y 23 semanas de edad. La curva de pesos mostró que en etapas tempranas (8 semanas) no existen diferencias entre ambos grupos. Esto está en consonancia con la evolución del desarrollo de estos animales, pues en edades tempranas no detectamos alteraciones relevantes (Figuras 72 y 73). Como se ha mencionado antes, a las 15 semanas, el corazón de animales KI/KI es ya 2 veces más grande que el de los WT/WT y sigue creciendo hasta el punto final del estudio, donde alcanza un peso más de 3 veces superior al de los animales WT/WT (Figura 75). La gráfica muestra la relación del peso del corazón respecto al peso del animal con el objetivo de normalizar datos entre animales que pueden diferir en peso y por tanto en su demanda cardiovascular. Sin embargo, las diferencias observadas entre genotipos no se deben a la pérdida de peso que los animales KIKI sufren hacia el final de su vida, ya que el peso del órgano aislado es también superior en estos animales, y aumenta con la edad, correlacionando con la evolución de la enfermedad.

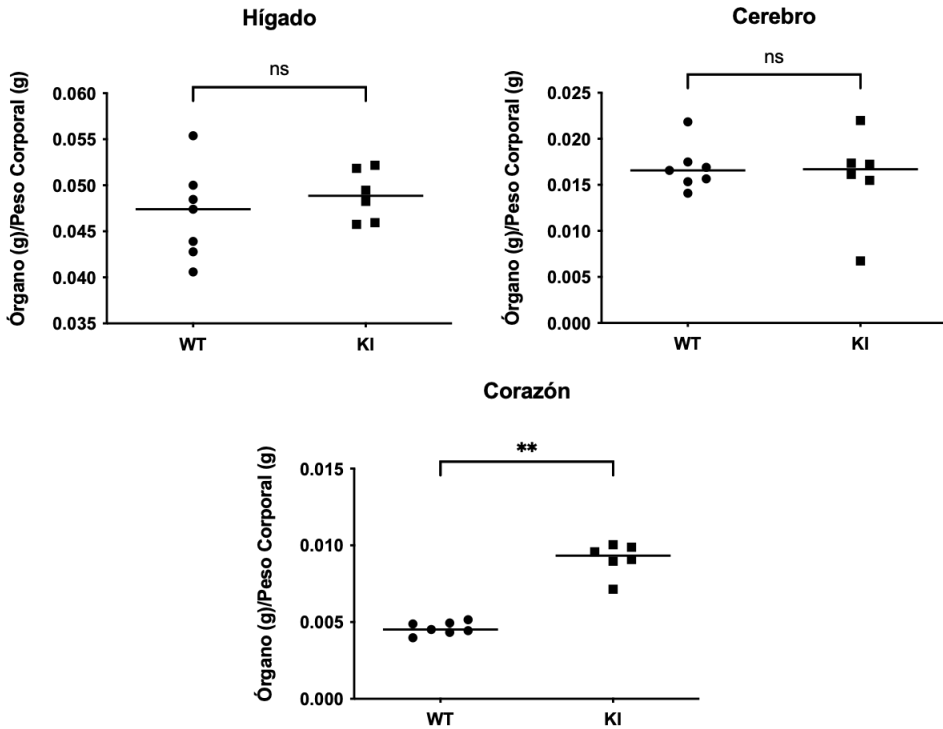


Figura 74: Comparativa de peso entre diferentes órganos de animales WT y KI. Se representa el *ratio* entre el peso (g) del órgano y el peso (g) corporal total de cada animal. Se analizaron un total de 13 animales de 15 semanas de edad. Las gráficas de barras representan la desviación estándar (n: 6-7). WT: Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; KI: Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}. P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*; **p < 0,01; ns: resultado no estadísticamente significativo (p > 0,05).

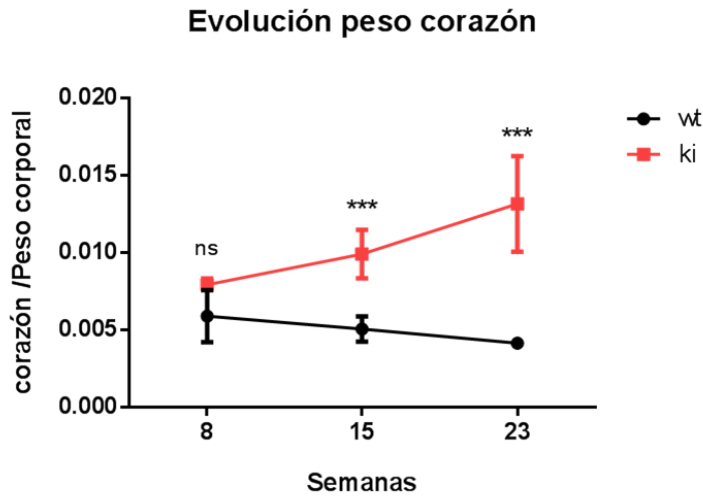


Figura 75: Evolución del peso del corazón a lo largo del tiempo en animales WT y KI. Se representa el *ratio* entre el peso (g) del órgano y el peso (g) corporal total de cada animal a las 8, 15 y 23 semanas de edad. La gráfica representa la desviación estándar. Tiempo 8 n=4; Tiempo 15 n=7-8; Tiempo 23 n=3. Línea negra (wt): Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; Línea roja (ki): Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}. P valor obtenido mediante test estadístico *Two-Way ANOVA*: (***) $p < 0,001$; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0,05$)).

7.6 Análisis de la estabilidad del complejo I mitocondrial.

A partir de los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del peso y la supervivencia de los animales KI/KI, que muestran una alteración significativa de ambos parámetros, y de la evidente afectación cardiaca en los animales KI/KI, decidimos analizar la estabilidad del complejo I mitocondrial en estos animales con el objetivo de determinar si las mutaciones introducidas en la *NDUFA10* de ratón afectan o no a la estabilidad de la proteína y, por tanto, a la estabilidad y ensamblaje del propio complejo I mitocondrial. Para este primer análisis analizamos la estabilidad del mRNA *Ndufa10*^{KI}, la estabilidad de la proteína *NDUFA10*^{KI} y la estabilidad del complejo I mitocondrial. Dado que se obtuvieron resultados similares en cuanto a supervivencia y ganancia

de peso entre animales WT/WT y WT/KI, decidimos usar únicamente como grupo control animales WT/WT y prescindir de los WT/KI y, dado que las alteraciones en el peso y la función cardíaca aparecen a las 15 semanas de edad, se utilizaron animales de esta edad para el estudio de estabilidad.

7.6.1 Estudio a nivel de expresión de mRNA en hígado.

En este punto, el objetivo fue identificar si las mutaciones introducidas en el alelo *Ndufa10^{KI}* afectaban a la maduración o estabilidad del mRNA de la proteína. Esto resultaba relevante debido a que, aunque los algoritmos utilizados durante el diseño de la estrategia de edición génica atendían a los posibles efectos adversos sobre el RNA e intentaban evitarlos, no podemos descartar totalmente que estos efectos adversos, aun así, se produzcan. Por ello, decidimos analizar el mRNA en hígado, como un tejido representativo de lo que pudiese ocurrir en el resto de tejidos.

Para ello, extrajimos el RNA total de hígado de ratones de 15 semanas de edad y lo retrotranscribimos hasta obtener el correspondiente cDNA. Finalmente cuantificamos la cantidad de cDNA en el tejido usando como gen calibrador *Ppia* (Ciclofilina A) (Figura 76). El resultado de la cuantificación no mostró diferencias en los niveles de mRNA entre los animales WT/WT y KI/KI.

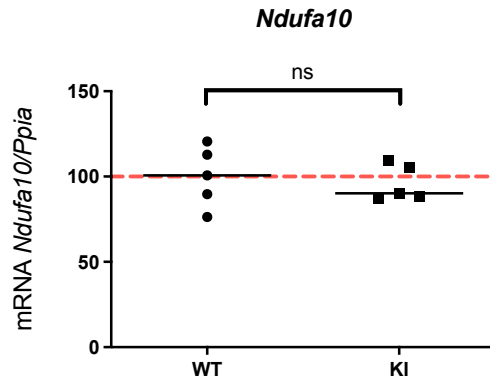


Figura 76: Expresión del mRNA *Ndufa10* en animales WT y KI. Se muestra el *ratio* de expresión del mRNA *Ndufa10* utilizando *Ppia* como gen calibrador. La gráfica de dispersión representa la mediana de las cuantificaciones; n=5; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos; WT: Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; KI: Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}; P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

7.6.2 Estudio de la estabilidad de la NDUFA10^{KI} y el Complejo I.

El estudio inicial de la estabilidad de la proteína en diferentes tejidos se basó en el análisis de las diferencias en cuanto a los niveles de proteína detectada entre animales WT/WT y KI/KI. Para esto, un extracto de proteína mitocondrial de hígado, cerebro y corazón de ratones de ambos genotipos se analizó mediante western blot e inmunodetección de la NDUFA10. Como control de carga del proceso se utilizaron anticuerpos específicos contra la proteína de membrana mitocondrial VDAC. El resultado se analizó por densitometría de bandas para su posterior cuantificación y representación (Figura 77).

El resultado reveló un descenso importante de los niveles detectados de NDUFA10 en todos los tejidos. Sin embargo, este descenso era más acusado

en hígado y corazón (86% y 98% menos respectivamente) que en cerebro (73% menos) (Figura 77). Estos resultados parecerían indicar que las mutaciones introducidas en el alelo *Ndufa10*^{E160A/R161A} afectan a la estabilidad de la proteína de ratón en todos los tejidos analizados, con especial incidencia en corazón e hígado y que en cerebro se produce una disminución menos acusada que nos permite detectarla en mayor cantidad que en los otros dos tejidos. Además, cabe destacar que, en el caso del corazón, encontramos un aumento muy importante (un aumento del 600% respecto a los niveles WT/WT) de VDAC en los animales KI/KI (Figura 77).

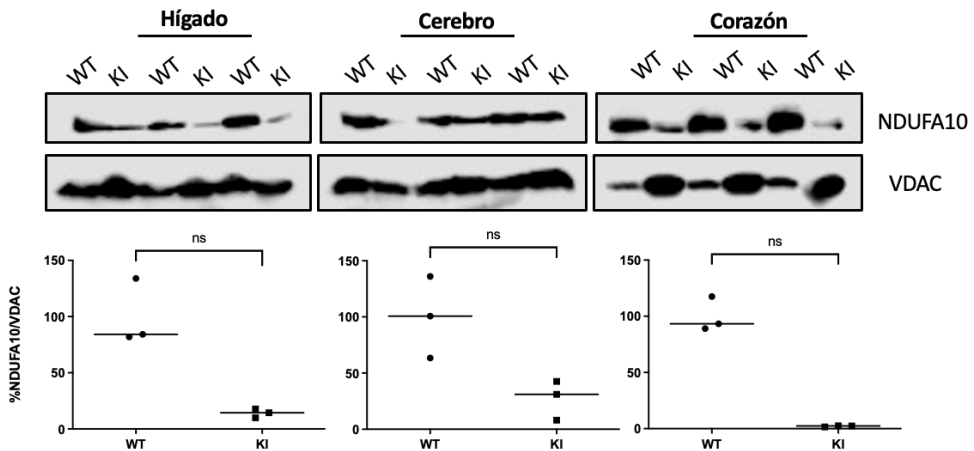


Figura 77: Inmunodetección (arriba) y cuantificación (abajo) de NDUFA10 en hígado, cerebro y corazón de ratón. Se cargaron 30 μ g de proteína mitocondrial que se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE, transferencia western-blot e inmunodetección de las proteínas indicadas. VDAC se utilizó como control de carga. La cuantificación se llevó a cabo por densitometría de bandas utilizando el *software Image Studio Lite V 5.2*. Las gráficas de dispersión representan la mediana del porcentaje medio normalizado respecto a VDAC y respecto a la media de las cuantificaciones de los animales WT; n=3; WT: WT: Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; KI: Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}. P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

Para comprobar si la disminución de NDUFA10 encontrada se traduciría también en una reducción del complejo I mitocondrial en estos animales, analizamos la estabilidad del complejo I mediante BN-PAGE. Para esto, igual que en el caso anterior, partimos de un *pellet* de proteína mitocondrial de hígado, cerebro y corazón de ratón que se solubilizó en condiciones nativas y resolvió mediante BN-PAGE. Tras transferencia western-blot realizamos la inmunodetección de varias proteínas representativas de cada uno de los complejos mitocondriales analizados (Figura 78 superior). El resultado se analizó por densitometría de bandas para su cuantificación (Figura 78 inferior).

En base a estos resultados, encontramos que la disminución de la cantidad de NDUFA10 detectada mediante western-blot e inmunodetección (Figura 77) se traduce en una disminución de la cantidad de complejo I detectado en todos los tejidos (Figura 78) lo que concuerda con su conocido papel esencial en la estabilidad del holoenzima completamente ensamblado [88]. Del mismo modo, no pudimos encontrar diferencias apreciables en cuanto a los niveles de complejo III, lo que podría sugerir un efecto específico sobre la estabilidad del complejo I a causa de las mutaciones introducidas en el alelo *Ndufa10^{KI}* (Figura 78).

Por otro lado, en el corazón si apreciamos cierta tendencia a aumentar la cantidad de complejo III en los animales KI/KI respecto a los WT/WT, lo que también podría sugerir un posible mecanismo compensatorio sobre la afectación del complejo. Sin embargo, esto deberá confirmarse en futuros experimentos que nos permitan aumentar el número de animales estudiado. Por otro lado, es importante recalcar que en hígado y corazón es donde encontramos un descenso más importante del complejo I (60% y 70% menos de complejo I, respectivamente).

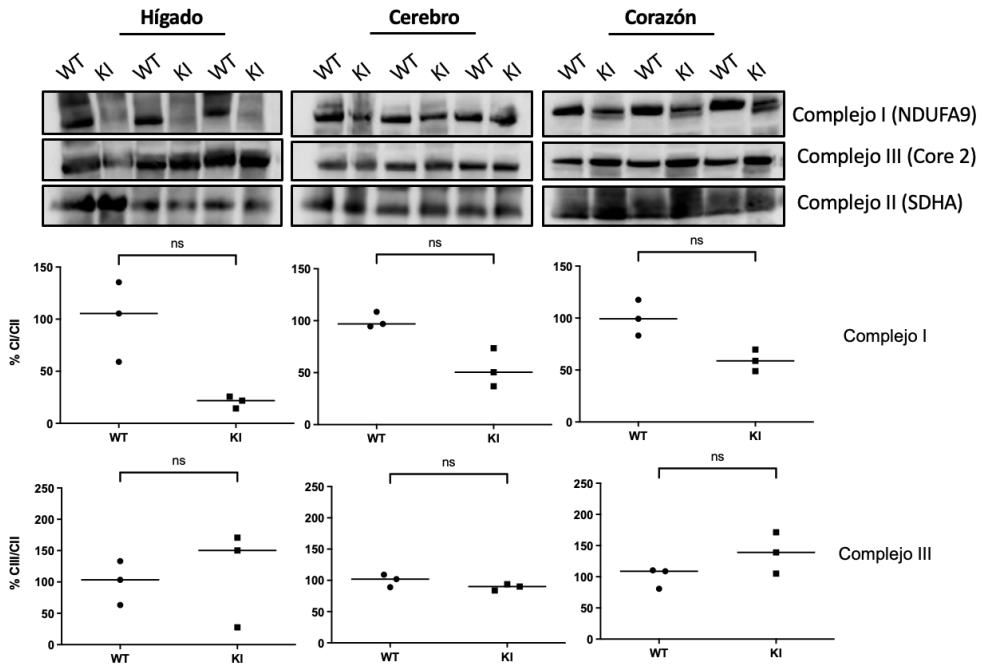


Figura 78: BN-PAGE e inmunodetección de proteínas representativas de diferentes complejos mitocondriales en hígado, cerebro y corazón de ratón. Se cargaron 30 μ g de proteína mitocondrial que se resolvieron mediante BN-PAGE e inmunodetección de las proteínas indicadas (superior). NDUFA9 se utilizó como marcador de complejo I; Core 2 como marcador del complejo III; SDHA como marcador de Complejo II que se utilizó como normalizador (control de carga). La cuantificación se llevó a cabo por densitometría de bandas utilizando el software *Image Studio Lite V 5.2*. Se cuantificaron los niveles de complejo I y de complejo III (parte inferior) respecto al control de carga SDHA (complejo II). Las gráficas representan la mediana del porcentaje medio normalizado respecto a la media de las cuantificaciones de los animales WT y; $n=3$; WT: Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; KI: Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A}. P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*; ns: resultado no estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

En el caso del corazón, parecería que en los animales KI/KI aparece una doble banda al realizar la inmunodetección del complejo I por BN-PAGE. Una de ellas corresponde a la altura esperada para el complejo I y otra es una banda

de un peso ligeramente inferior, que podría indicar la formación de subcomplejos o intermediarios de formación parcialmente ensamblados a consecuencia de las mutaciones introducidas.

7.7 Estudio del *pool* mitocondrial de dNTPs.

Como último paso importante en esta primera caracterización, estudiamos el efecto que las mutaciones introducidas en la *Ndufa10^{KI}* tienen sobre su capacidad de unión al dGTP. El efecto de las modificaciones en el dominio dNK de la proteína ya lo habíamos estudiado en un modelo *in vitro* y, ahora, el modelo *Ndufa10^{KI}* nos permitía estudiar estos efectos *in vivo*. Para esto, analizamos el *pool* mitocondrial de dNTPs en hígado, cerebro y corazón de animales WT/WT y KI/KI de edades comprendidas entre 12-16 semanas.

El análisis se llevó a cabo partiendo de un extracto equivalente a 1 mg de proteína mitocondrial del tejido correspondiente. Se realizó una extracción de dNTPs en medio ácido (TCA) y posteriormente los cuantificamos según se detalla en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en cuanto a los niveles cuantificados de dATP, dTTP y dCTP entre animales WT y KI en ninguno de los tejidos analizados (Figura 79). Sin embargo, encontramos claras diferencias en la cuantificación de los niveles de dGTP. Concretamente, encontramos una disminución del 95% en hígado, 90% en cerebro y 97% en corazón respecto al contenido total de dGTP en cada tejido en animales KI/KI (Figura 70). Estos resultados indican claramente que la pérdida de la afinidad por el dGTP en la subunidad *Ndufa10* se traduce en un descenso drástico del contenido mitocondrial en dGTP, de tal forma que esta mayoría de dGTP que no puede asociarse a la *Ndfua10* no puede ser detectado en forma libre, lo

que sugiere que este se degrada rápidamente una vez que se libera de la proteína.

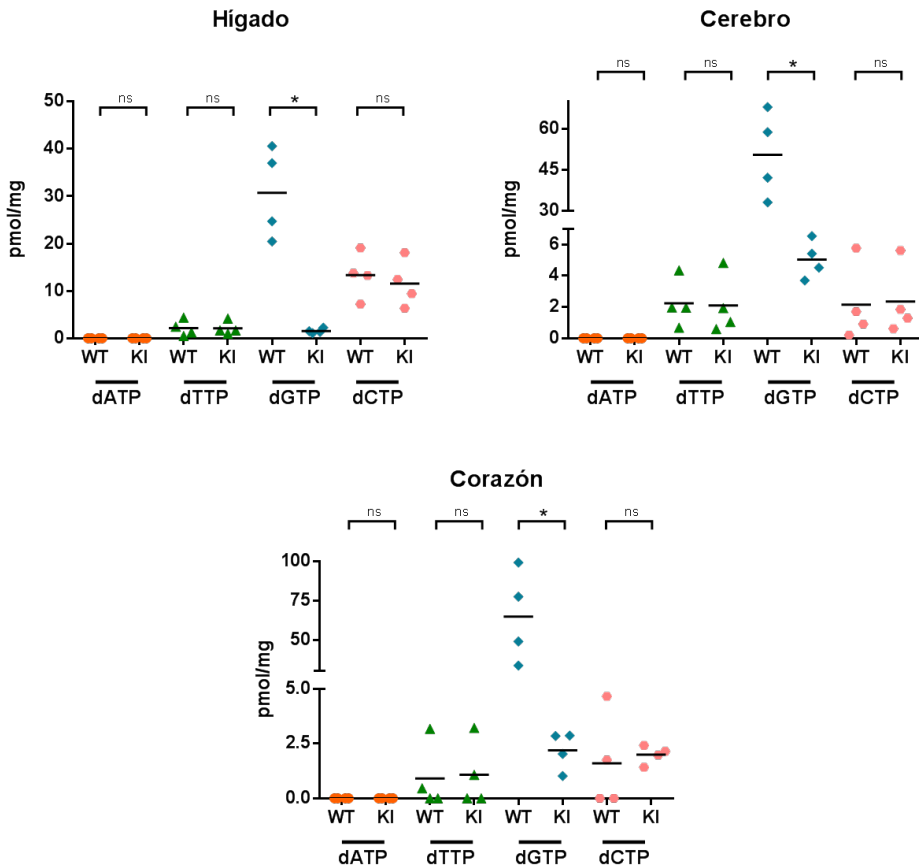


Figura 81: dNTPs mitocondriales en tejidos de ratón. La extracción de dNTPs se realizó en medio ácido (TCA) a partir de un *pellet* fresco de 1 mg de proteína mitocondrial para cada tejido. Se representan los pmol de dNTPs obtenidos por mg de proteína. Se utilizaron animales de entre 12-15 semanas de edad para cada genotipo. Las gráficas de dispersión representan la mediana (línea horizontal). WT: Animales con genotipo WT/WT, *Ndufa10*^{+/+}; KI: Animales con genotipo KI/KI, *Ndufa10*^{E160A;R161A/E160A;R161A} (WT: n=4-8; KI: n= 4;). P valor obtenido mediante test estadístico *Mann-Whitney U test*: *p < 0,05; ns: resultado no estadísticamente significativo (p > 0,05).

DISCUSIÓN

La composición del *pool* de dNTPs se encuentra estrechamente regulada en mitocondria. Para asegurar el balance y la disponibilidad de dNTPs, las células eucariotas disponen de dos vías anabólicas diferenciadas: la síntesis *de novo* y la ruta de salvamento de dNTPs¹¹¹. Además, enzimas catabólicas regulan la composición del *pool* a distintos niveles. De hecho, las alteraciones genéticas que dan lugar a una alteración de la homeostasis del *pool* de dNTPs se asocian a defectos en el mantenimiento de la integridad del genoma mitocondrial. Como ejemplo de esta dependencia cabe destacar que las mutaciones que afectan a enzimas implicadas en la ruta de salvamento (TK2, dGK), ruta *de novo* (RRM2B) o degradación de nucleósidos (TYMP) se traducen en la insuficiencia de uno o varios dNTPs en mitocondria, dando lugar a defectos cuantitativos (depleción) o cualitativos (mutaciones puntuales y/o deleciones múltiples) en la replicación del mtDNA en lo que se conoce como síndromes de depleción y deleciones múltiples del mtDNA (MDDS).

Sin embargo, pese a que cabría esperar que todas las especies de dNTPs se encuentren en proporciones similares, nuestros resultados indican que, en condiciones fisiológicas normales, el contenido de los cuatro dNTPs no está balanceado en mitocondria de hígado, cerebro y corazón de ratón. Concretamente, en estos tejidos encontramos un importante desbalance del *pool* de dNTPs, con el dGTP significativamente sobrerrepresentado respecto a los otros tres dNTPs (67%, 73% y 95% del total en hígado, cerebro y corazón respectivamente), mientras que los otros tres dNTPs sí que se encuentran en unas cantidades equiparables entre sí en todos los tejidos que hemos analizado. Además, hemos encontrado resultados similares en mitocondrias de células proliferativas humanas HEK-293T, donde el dGTP representa un 60% del contenido total de dNTPs. Estos resultados están en consonancia con los hallazgos previos de Song y colaboradores, en los que ya se describía un importante desbalance del *pool* mitocondrial de dNTPs en tejidos de rata

encontrándose el dGTP significativamente elevado respecto a los otros tres dNTPs¹⁷⁶. La elevada concentración de dGTP en mitocondria frente al resto de dNTPs se postuló como el mecanismo que contribuía al elevado *ratio* de mutagénesis del mtDNA respecto al nDNA, ya que este desbalance parecía ser responsable de un aumento de unas tres veces en la tasa de error de la polimerasa durante la replicación del mtDNA, contribuyendo así a la mutagénesis espontánea del mtDNA¹⁷⁶. Sin embargo, posteriormente estos resultados fueron rebatidos por Ferraro y colaboradores, y las asimetrías observadas se atribuyeron a posibles artefactos generados durante la cuantificación de dNTPs¹¹⁵. De acuerdo con esta interpretación, estos serían debidos a que la polimerasa *DNA Polymerase I Large (Klenow)*, utilizada en las primeras determinaciones, tiende a cometer errores de incorporación cuando la concentración de ribonucleótidos es significativamente superior a la de desoxirribonucleótidos¹¹⁵.

Para evitar este problema, se sustituyó esta enzima por la *Thermo Sequenase DNA Polymerase* en futuras cuantificaciones de dNTPs^{115,175}. Finalmente, Wheeler y Mathews volvieron a describir valores significativamente elevados de dGTP en mitocondrias de rata, descartando la hipótesis de Ferraro y colaboradores sobre artefactos durante la determinación enzimática de dNTPs en función del *ratio* GTP/dGTP¹⁸⁴. Esta controversia se ha mantenido hasta la fecha sin haberse encontrado una explicación satisfactoria que justifique las discrepancias encontradas por unos y otros autores. Además, teniendo en cuenta este importante desbalance en el *pool* de dNTPs mitocondriales, cabría esperar que pudiese ocurrir una alteración en la homeostasis del mtDNA en estos tejidos similar a la que podemos encontrar en ciertas situaciones patológicas, como la enfermedad de MNGIE. Concretamente, esta patología está causada por mutaciones en el gen *TYMP*, que codifica la proteína TP¹⁸⁹. Este defecto se traduce en un exceso del contenido mitocondrial dTTP que, a su vez, conlleva un descenso secundario

en la cantidad de dCTP mitocondrial. Todo ello se traduce en depleción, deleciones múltiples y mutaciones puntuales en el mtDNA en ciertos tejidos. Así pues, en el MNGIE, las alteraciones patológicas en el mtDNA están causadas, en definitiva, por una alteración en la homeostasis de dNTPs, y un desbalance del *pool* similar a la que describimos en nuestros resultados¹¹⁷. Por tanto, resulta bastante llamativo que este importante desbalance que encontramos en el contenido de dGTP mitocondrial sea tolerado en condiciones fisiológicas normales. Esto hace pensar que debe existir algún mecanismo, aún no descrito, que amortigüe en cierta manera el desbalance de dGTP, de forma que este incremento no resulte patológico.

Profundizando en el análisis de los diferentes métodos de extracción de dNTPs disponibles, hemos encontrado que las diferencias durante el proceso de deproteinización de las muestras tiene un impacto muy relevante en los niveles de dGTP que finalmente se pueden cuantificar, sin afectar en ningún caso a los niveles detectados del resto de dNTPs. Concretamente, hemos encontrado que únicamente los métodos de extracción que causan una desnaturalización completa de la proteína presente en los extractos, ya sea desnaturalización por ácido (TCA/PCA) o por ebullición, de manera previa a la eliminación de esta fracción proteica (PCA; TCA; MetOH+B+C) liberan niveles comparables de dGTP y claramente superiores al resto de dNTPs. Sin embargo, mediante los métodos de extracción que eliminan la fracción proteica del extracto de forma previa a su desnaturalización completa (MetOH+C+B), obtenemos niveles de dGTP prácticamente indetectables. Además, tras separar la fracción proteica y soluble de los extractos mitocondriales, hemos comprobado que el dGTP se encuentra de forma mayoritaria retenido en la fracción proteica de dichos extractos, mientras que el resto de dNTPs se encuentran prácticamente en su totalidad en la fracción soluble. Ambos hallazgos indican que el dGTP es el único, de los cuatro de dNTPs, que se encuentra interaccionando con la fracción proteica

de los extractos mitocondriales en una proporción significativa. Por tanto, la controversia en torno a los bajos valores de dGTP reportados por algunos investigadores puede explicarse en base a la pérdida del dGTP contenido en la fracción proteica del extracto previo a haber garantizado su desnaturalización completa y, por tanto, la liberación del dGTP hacia la fracción soluble. Sin embargo, es importante destacar que, una vez que conseguimos liberar el dGTP de la fracción proteica, este parece degradarse en su mayoría si el lisado no se procesa de manera inmediata, del mismo modo que sucede con el resto de dNTPs. Además, mediante los experimentos de BN-PAGE/EMSA con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ y extractos mitocondriales de hígado de ratón generados bajo condiciones nativas hemos demostrado que la unión dGTP-proteína existente puede ser desplazada por un exceso de dGTP exógeno y que, por tanto, esta interacción es dinámica y debe encontrarse en un cierto equilibrio de unión-liberación. Sin embargo, también se debe señalar que, pese a esto, esta interacción parece ser altamente estable, pues es capaz de resistir todos los procesos de solubilización, extracción de mitocondrias y deproteinización (con metanol) de los extractos, hasta la cuantificación final de dNTPs.

Por tanto, todos estos resultados indican que, aunque en el *pool* mitocondrial de dNTPs el dGTP se encuentra claramente sobrerrepresentado, la gran mayoría de dGTP que se encuentra unido a proteína no está contribuyendo al *pool* total de dNTPs que se encuentra disponible para polimerasas y el resto de enzimas implicadas en la replicación y reparación del mtDNA. Este hecho podría explicar la ausencia de alteraciones en la integridad del mtDNA bajo condiciones normales, aunque exista un evidente desequilibrio del *pool* mitocondrial a favor del dGTP, similar a lo que puede ocurrir en situaciones patológicas como en el MNGIE, en el caso del dTTP.

Los experimentos previos de tipo BN-PAGE/EMSA con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dGTP}$ indicaban que podían formarse complejos proteína-dGTP de elevado peso molecular en mitocondria de hígado de ratón, compatibles con el complejo I de la cadena respiratoria. Posteriormente, hemos podido corroborar que en tejido de ratón prácticamente todo el dGTP endógeno mitocondrial co-inmunoprecipita y co-sedimenta en gradiente de densidad de sacarosa, bajo condiciones nativas, con el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (70% del total detectado), indicando que la interacción con la fracción proteica del dGTP se estaría produciendo a nivel del complejo I.

Sin embargo, cuando en este tipo de aproximaciones, que conllevan largos tiempos de procesamiento del extracto, no precipitamos la fracción proteica de manera inmediata con TCA, no somos capaces de detectar la fracción de dGTP libre. Teniendo en cuenta que hemos encontrado que los diferentes métodos de deproteinización disponibles no resultan del todo eficientes para eliminar la actividad enzimática residual, esta fracción, presumiblemente, se estaría degradando como consecuencia de esta actividad enzimática que permanece en el extracto, del mismo modo que nos sucede con el resto de dNTPs, que también se encuentran en la fracción libre del extracto mitocondrial y no están protegidos por la unión a proteína.

Pese a esto, no podemos descartar que una parte del dGTP que no somos capaces de detectar se encuentre asociado a otras proteínas independientes del complejo I, pero del total que somos capaces de detectar, podemos afirmar que la gran mayoría sí se encuentra asociado a este, en función de los datos de los que disponemos sobre inmunoprecipitación del CI, gradiente de sacarosa o determinaciones del *pool* mitocondrial en animales KI. Son necesarias otro tipo de aproximaciones experimentales que permitan mantener estable y cuantificar el máximo del dGTP presente en mitocondria, tanto libre como unido a proteína.

Por otro lado, aprovechando que esta interacción dGTP-complejo I mitocondrial parecía ser dinámica, pudimos identificar, mediante purificación por cromatografía de afinidad, la subunidad del complejo I NDUFA10 como la responsable de dicha interacción. Esta es una de las subunidades accesorias del complejo I que únicamente está presente en metazoos. No se han descrito funciones específicas para esta subunidad dentro del complejo, más allá de ser necesaria para el ensamblaje total de este⁴⁶. Sin embargo, es relevante que la NDUFA10 sea una de las subunidades del complejo I que se encuentran fosforiladas en varios puntos, entre ellos la Ser250. La fosforilación en este residuo depende de la actividad de la proteína serina/treonina quinasa PINK1⁷⁷. Esta quinasa participa en la activación de las rutas de autofagia y se ha descrito su implicación en ciertas formas tempranas de la enfermedad de Parkinson¹⁹⁰. Además, en células mutantes que carecen de actividad PINK1 se ha descrito una disfunción mitocondrial que se ha asociado a una desestabilización de la NDUFA10 que a su vez tiene como consecuencia una desestabilización del complejo I¹⁹¹. Dicha disfunción mitocondrial puede ser revertida en células humanas carentes de actividad PINK1 mediante transfección estable con la proteína NDUFA10 fosfomimética (NDUFA10^{S250D})⁷⁷. Por otro lado, estudios llevados a cabo en *Drosophila melanogaster* carentes de PINK1 han demostrado que la disfunción mitocondrial es el mecanismo principal que subyace a la patogénesis del Parkinson en estas moscas¹⁹¹. Además, en estos mismos estudios se ha descrito un aumento de la expresión génica de las dNKs implicadas en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs como un posible mecanismo compensatorio de la deficiencia mitocondrial presente en neuronas de mosca carentes de PINK1 y, del mismo modo, se ha demostrado que la suplementación a través de la dieta de estas moscas con una mezcla de los cuatro dNs o ácido fólico rescata la pérdida de neuronas dopaminérgicas que causa el Parkinson en estas moscas¹⁹¹.

Por tanto, estos resultados muestran una clara implicación del déficit de complejo I en la patogénesis del Parkinson y sugieren una posible implicación del metabolismo de nucleótidos en la enfermedad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la disfunción mitocondrial que subyace a la patogénesis del Parkinson en esta situación parece debida a la desestabilización del complejo I como consecuencia de la defosforilación de la Ser250 en la NDUFA10. Se ha demostrado que la deficiencia severa de complejo I se traduce en una alteración del metabolismo de dNTPs¹⁹², de tal manera que esta alteración podría ser consecuencia y no causa primaria de la enfermedad del Parkinson. Igualmente, teniendo en cuenta que la desestabilización de la NDUFA10 parece ser la causa tras la disfunción mitocondrial en células carentes de PINK1 y que la disfunción mitocondrial suele ser una causa común en el desarrollo de la enfermedad del Parkinson, son necesarios futuros estudios sobre cómo afecta la fosforilación de la NDUFA10 en su Ser250 a su capacidad para unir el dGTP y cómo esta interacción puede tener implicaciones en la estabilidad del complejo I y en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Las alteraciones en la interacción de la NDUFA10 y el dGTP mitocondrial podrían representar un nuevo modelo de estudio de la patogénesis de formas tempranas del Parkinson y una posible diana terapéutica en el futuro.

Por otro lado, la NDUFA10 comparte el dominio funcional dNK (dominio dNK, pfam PF01712) con varias de las desoxirribonucleósido quinasas que participan en la ruta de salvamento para la síntesis de dNTPs, como son la TK2, dCK o dGK. Todas estas enzimas catalizan la fosforilación secuencial del desoxirribonucleósido correspondiente usando nucleósidos trifosfato como donadores de fosfato¹¹⁸. Además, cabe destacar que todos los residuos clave que forman el dominio dNK en las desoxirribonucleósido quinasas también están presentes en la NDUFA10 y, en base a los estudios de su estructura, el sitio activo que forman quedaría accesible a posibles sustratos en solución¹⁹³.

Recientemente, Agip y colaboradores realizaron estudios de Cryo-EM sobre la estructura del complejo I de ratón en estado activo que sugieren la presencia de un nucleótido unido al dominio dNK de NDUFA10. Concretamente, los autores proponen que se trata de ADP, en base a la modelización computacional, que sugiere la presencia de un nucleótido de purina con dos fosfatos y, también, dada la abundancia relativa del ADP en la matriz mitocondrial¹⁹³. Estos resultados están parcialmente en consonancia con los resultados que proponemos en este trabajo, pues nosotros describimos la capacidad de la NDUFA10 para interactuar con un desoxirribonucleótido de purina, en este caso dGTP y también, con una estequiometría de unión predicha de 1:1. Sin embargo, el ADP se muestra incapaz de competir con el dGTP en su unión a la proteína en nuestros ensayos de afinidad realizados con extractos mitocondriales nativos y dGTP conjugado a resina. Nuestros resultados indican que, al menos en nuestras condiciones, el dGTP es el nucleótido que ocupa el dominio dNK en NDUFA10. Pese a todo, no podemos descartar que el ADP pueda unirse en ciertas condiciones, aunque con una afinidad considerablemente inferior. Igualmente, los resultados de nuestros ensayos de fotoafinidad y *pull-down* indican que la capacidad de interacción es específica para los nucleótidos de desoxiguanosina, con afinidad creciente de forma proporcional al grado de fosforilación en el que se encuentra y, por tanto, siendo máxima para el dGTP.

Además, basándose en la información estructural de la que se dispone acerca de la familia de las desoxirribonucleósido quinasas, Agip y colaboradores han postulado que la unión del ADP a la NDUFA10 se lleva a cabo simulando el modo de unión de un inhibidor por retroalimentación negativa en la que este se dispone con el residuo de adenosina en el sitio de unión al nucleósido y los dos fosfatos dispuestos hacia el *P-loop* del domino dNK¹⁹³.

Este tipo de regulación de la actividad quinasa por retroalimentación negativa es común en otras desoxirribonucleósido quinasas de la ruta de salvamento, cuya actividad suele estar regulada por el trifosfato final de su sustrato preferencial. Además, esta unión es altamente estable y fuerte, pues varias de estas proteínas han sido purificadas a partir de tejido unidas a sus respectivos inhibidores, como es el caso de la TK2, la cual ha sido purificada unida al dTTP como sustrato inhibidor^{194,195}.

Así pues, se podría postular la hipótesis de que NDUFA10 podría tener una actividad desoxirribonucleósido quinasa. Teniendo en cuenta que nuestros datos previos, basados en una predicción de estequiometría de unión 1:1, indican que un 62% de la NDUFA10 disponible en mitocondria de tejido de ratón se encuentra unida de forma estable al dGTP, cabe esperar que esta proporción mayoritaria se encuentre en estado inhibido, lo que podría explicar porque hasta la fecha no se ha descrito actividad quinasa para el complejo I mitocondrial y, específicamente, para la subunidad NDUFA10. En base a esta hipótesis, cabría esperar que el dGTP actuase como el producto final inhibidor de la actividad quinasa en la NDUFA10 y, por tanto, es lógico pensar que sería la dGuo el sustrato preferente sobre el que actuase. Además, los residuos del dominio dNK que, por homología con el resto de quinasas de la familia TK1-no similar, serían responsables de otorgar la especificidad de sustrato, son más similares a los que encontramos en la dGK y no a los de la TK2. Para analizar si existe o no actividad quinasa en la NDUFA10, realizamos un ensayo de actividad con la proteína inmunopurificada en el que previamente esta fue incubada con un exceso de dGuo con el objetivo de desplazar, de forma competitiva, el dGTP del sitio de unión al sustrato. Sin embargo, en nuestro ensayo no pudimos detectar actividad quinasa para ninguno de los cuatro dNs. Estos resultados parecer descartar que NDUFA10 posea actividad desoxirribonucleósido quinasa, aunque para descartarlo de manera definitiva deberíamos asegurar que no

existe una actividad por debajo del límite de detección de nuestra técnica, o que sea necesaria la presencia de determinados cofactores no presentes en la fracción de proteína inmunopurificada, o, incluso, que sea necesario el ensamblaje total o parcial de la NDUFA10 dentro del complejo I para que se den las condiciones necesarias para llevar a cabo la reacción.

Alternativamente, el dGTP podría también estar actuando como un estabilizador de la estructura de la propia NDFUA10 o, incluso, del complejo I mitocondrial. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo con la línea celular KI, que expresa la forma mutada NDUFA10^{E160A/R161A}, muestran una reducción entorno al 50% de la capacidad de unión al dGTP en la NDUFA10 sin alterar la estabilidad y actividad del complejo I mitocondrial, lo que sugiere una función diferente para el dGTP en la NDUFA10. Sin embargo, no podemos descartar que, en unas condiciones metabólicas diferentes a las analizadas en el modelo celular KI, el dGTP sí tenga un impacto relevante en el estado de activación o en el ensamblaje del complejo I. Pese a esto, sí que hemos encontrado una disminución del potencial de membrana mitocondrial junto con un aumento en la producción de ROS celular en la línea KI, mientras que, resultados obtenidos por nuestros colaboradores (Monash University, Melbourne, Australia) indican que no existen diferencias en cuanto a la tasa de consumo de oxígeno.

El hecho de encontrar un aumento del ROS total (H2DCFDA) pero no encontrar diferencias en cuanto a la producción de ROS mitocondrial (MitoSoX) podría explicarse debido a la elevada inestabilidad del anión superóxido que se produce a nivel mitocondrial. Este podría convertirse rápidamente en otras formas más estables, como el H₂O₂, que escaparía de la mitocondria y estaría siendo cuantificado como ROS total. Por tanto, el hecho de que se produzca una disminución en el potencial de membrana mitocondrial puede representar un mecanismo protector contra el

incremento en la producción de ROS que encontramos en las células KI. Se ha planteado la hipótesis de que la disipación parcial del potencial de membrana mitocondrial por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa tiene efectos relevantes en la atenuación de la producción mitocondrial de ROS^{196,197}. Además, la modulación del *Proton Leak* se ha postulado como un objetivo terapéutico para muchas enfermedades asociadas a la producción excesiva de ROS, como podrían ser la obesidad, diabetes o enfermedades neurodegenerativas¹⁹⁷. De esta manera, el descenso del potencial de membrana que detectamos podría producirse como un mecanismo compensatorio que no llega a ser totalmente efectivo en la línea KI. En este punto, resultaría interesante analizar si existen cambios a nivel de expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de ROS, como son la catalasa o la superóxido dismutasa y analizar marcadores de daño oxidativo (proteína oxidadas) y su relación con las mutaciones en el dominio dNK de la NDUFA10.

Por tanto, estos cambios en el potencial de membrana y en la producción de ROS podrían estar causados por las mutaciones introducidas en el dominio dNK de la NDUFA10 y los efectos que estas puedan tener sobre la estabilidad de la proteína y el propio complejo I. Sin embargo, estos también podrían producirse como consecuencia de alterar el equilibrio de unión dGTP: NDUFA10, de forma que esto se pueda traducir en un incremento del *ratio* de electrones fugados a nivel del complejo I, sin que la actividad NADH deshidrogenasa propia de este se vea alterada. Además, teniendo en cuenta que las subunidades accesorias no son necesarias para la actividad catalítica, que a muchas de estas se les han atribuido funciones alternativas en el complejo I y que las mutaciones introducidas en el dominio dNK parecen repercutir en cierta manera en la funcionalidad del complejo I, parecería posible que la NDUFA10 y su interacción con el dGTP estén jugando un papel importante en otros procesos fisiológicos.

Son necesarias futuras investigaciones que analicen la implicación del dGTP en la transferencia de electrones a nivel del complejo I.

Sin embargo, pese a estos efectos en el potencial de membrana y producción de ROS, no parece que existan grandes diferencias en cuanto a la actividad del complejo I en las células KI. Esto resulta esencial para poder estudiar de forma aislada las consecuencias que estas mutaciones tienen sobre el *pool* mitocondrial de dNTPs, sin que exista un sesgo a causa de las posibles alteraciones que pudiesen ocurrir en el *pool* mitocondrial como consecuencia de la disfunción del complejo I y de la actividad mitocondrial.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos afirmar que las células KI presentan una disminución del 50% en el contenido total de dGTP mitocondrial, sin que exista una alteración de la funcionalidad del complejo I. Por lo tanto, una posible hipótesis es que este descenso tan acusado del dGTP pueda repercutir en la estabilidad y el mantenimiento del mtDNA. Sin embargo, nuestros resultados indican que no hay alteraciones detectables en cuanto al número de copias del mtDNA en las células KI. Pese a esto, debe tenerse en cuenta el hecho de que el modelo celular KI es un modelo de células altamente replicativas (HEK-293T) y, en estas condiciones, la ruta de síntesis *de novo* de dNTPs se supone altamente activa como para cubrir las necesidades de dNTPs tanto a nivel nuclear como mitocondrial, lo cual podría justificar la ausencia de alteraciones en mtDNA. La hipótesis que puede justificar esta ausencia de alteraciones es que el dGTP unido a la NDUFA10 tendrá un impacto relevante cuando el *pool* de dNTPs esté más reducido, en células o tejidos quiescentes, donde la mitocondria dependerá casi exclusivamente de la ruta de salvamento para el mantenimiento del *pool* de dNTPs. En estas condiciones, la elevada proporción de dGTP unido podría liberarse de la NDUFA10 y contribuir al *pool* total de dNTPs solubles en la matriz que serán los que tengan efecto sobre la replicación.

La NDUFA10 estaría en estas condiciones actuando a modo de reservorio mitocondrial de dGTP.

Por tanto, para caracterizar el impacto real que pueda tener la mutación en las células KI y la reducción del *pool* de dGTP, sería deseable utilizar un modelo de células quiescentes en el que la síntesis *de novo* no sea activa y la concentración de dNTPs sea por tanto más limitante. Además, debemos tener en cuenta que la reducción del 50% del contenido total de dGTP mitocondrial observada en las células KI se traduce también en una reducción del 75% del *ratio* unido/libre de este. Sin embargo, pese a esta reducción tan significativa del *ratio*, este continúa siendo mayor que 1, lo que evidencia que el que continúa presente permanece unido a proteína, en concordancia con la observación de que la NDUFA10 mutada mantiene cierta capacidad de unión al dGTP.

Por otro lado, la reducción del 50% del total de dGTP encontrada es debida mayoritariamente a la reducción de la cantidad de dGTP que se encontraba unido a proteína y no tanto a consecuencia del dGTP que se encuentra libre. Por lo tanto, cabría esperar que no se produzca una alteración evidente de la homeostasis de dNTPs en estas condiciones, pues las proporciones de dNTPs libres y accesibles a enzimas mitocondriales no se ve alterada y, por tanto, tampoco la integridad del genoma mitocondrial.

Así pues, teniendo en cuenta que toda la evidencia de la que disponemos hasta el momento indica que la mayor parte del dGTP presente en mitocondria de tejidos de ratón y células humanas se encuentra estable y específicamente unida al dominio dNK de la subunidad NDUFA10 del complejo I, resultaba especialmente relevante estudiar como esta interacción puede regular la disponibilidad y el contenido del dGTP en mitocondria e, incluso, como esta pueda afectar en la regulación de otros

procesos fisiológicos *in vivo*. Para profundizar en esta cuestión, decidimos generar un modelo animal de ratón *knock-in* que porta la mutación E160A/R161A mediante la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9.

Tras una primera caracterización del modelo, encontramos que los animales homocigotos para el alelo *knock-in Ndufa10*^{E160A/R161A; E160A/R161A} (KI/KI) nacen según las proporciones mendelianas esperadas (25% WT/WT; 50% WT/KI; 25% KI/KI) y se desarrollan sin alteraciones evidentes (peso, desarrollo motor, comportamiento...) hasta las 15 semanas de vida. Sin embargo, a partir de este momento se produce un retraso en el crecimiento (dejan de ganar peso) que se acentúa a partir de la semana 20 cuando se inicia una pérdida abrupta de peso que, finalmente, se traduce en una esperanza de vida no superior a las 31 semanas en estos animales (28,5 semanas de media). Cuando analizamos las proporciones de genotipos en los nacimientos en función del sexo, encontramos que nacen un 52% menos de animales KI de los esperados en el caso de las hembras y, esto se traduce en un incremento del número hembras WT, que deberá confirmarse mediante nuevos datos y análisis estadísticos correspondientes. No obstante, todo esto parece indicar una cierta influencia del sexo, fundamentalmente durante la espermatogénesis, debido al exceso de animales WT que encontramos. Además, no observamos mortalidad perinatal que pueda explicar las diferencias detectadas. De los 58 genes implicados en la biogénesis del complejo I mitocondrial, únicamente 9 se han asociado con las variaciones sexo-dependientes de la presentación y progresión de enfermedades mitocondriales. Concretamente, dos de estos (*Ndufa1* y *Ndufa11*) se encuentran en el cromosoma X y el resto se localizan en el mtDNA (ND1-6 y 4L)¹⁹⁸. Sin embargo, estos resultados hacen pensar que el gen *Ndufa10* podría verse incluido entre aquellos en los que las mutaciones parecen verse moduladas, en cierta manera, por la espermatogénesis.

Como hemos mencionado anteriormente, los resultados obtenidos en la línea celular humana KI indican que las mutaciones E160A/R161A introducidas no interfieren en la estabilidad o actividad del complejo I. Además, la proteína humana y de ratón comparten un alto porcentaje de identidad de secuencia, con la mayoría de los residuos que conforman el dominio dNK que interacciona con el nucleótido altamente conservados. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en células, nuestros resultados en la primera caracterización del modelo animal KI indican que la NDUFA10^{KI} murina y, en consecuencia, el complejo I mitocondrial no es estable en todos los tejidos estudiados. Concretamente, en nuestro modelo hemos encontrado que las mutaciones introducidas en el dominio dNK se traducen en una disminución, en proporciones variables, de la cantidad de NDUFA10 en diferentes tejidos, lo que a su vez se traduce en una disminución de la cantidad de complejo I ensamblado.

En hígado y corazón hemos encontrado los niveles más bajos de NDUFA10 y complejo I ensamblado. Además, en corazón hemos observado signos de especies moleculares que podrían corresponder a subcomplejos parcialmente ensamblados a consecuencia de la desestabilización de la NDUFA10. Por otro lado, a diferencia de en estos tejidos, hemos encontrado que en cerebro los niveles de NDUFA10 no padecen un descenso tan acusado y, en consecuencia, no encontramos una reducción evidente en la cantidad de complejo I en los animales KI. Hemos comprobado, mediante rt-qPCR, que la disminución de los niveles de NDUFA10 en tejidos no es debida a alteraciones en el procesamiento o maduración del mRNA de la proteína. Por tanto, esta alteración podría estar causada por una disminución de la estabilidad de la propia NDUFA10 a consecuencia de las dos mutaciones introducidas en el dominio dNK.

Sin embargo, no podemos descartar que la pérdida de estabilidad sea debida a que el dGTP unido al dominio dNK esté actuando como un factor estabilizador de la Ndufa10 y que este sea necesario para su ensamblaje total en el complejo I.

Por otro lado, hemos encontrado que los animales KI desarrollan una cardiomiopatía hipertrófica grave que se evidencia entre las semanas 15-20 de vida. Esta podría estar causada por la disfunción mitocondrial encontrada en los animales KI y parece ser la causa más probable de la muerte de estos animales, ya que presentan un corazón de un peso un 50% mayor que sus hermanos de la misma camada a partir de las 15 semanas de vida. Aunque las afectaciones comunmente asociadas a patologías derivadas de mutaciones en el complejo I mitocondrial son principalmente de carácter neurodegenerativo, la cardiomiopatía es un fenotipo que acompaña frecuentemente este tipo de dolencias¹⁹⁹. Además, debemos tener en cuenta que, debido a sus particularidades metabólicas, el corazón es un tejido muy rico en mitocondria y, por tanto, presenta mayor cantidad de complejo I que el hígado o el cerebro. Por tanto, cabrá esperar que este sea un tejido mucho más sensible a la disfunción del complejo I. Esto podría explicar el marcado aumento de la cantidad de proteína VDAC que detectamos en este tejido, pues podría indicar un incremento de masa mitocondrial, que probablemente esté ocurriendo en respuesta a la deficiencia oxidativa en este tejido. Por tanto, a falta de realizar una exploración más exhaustiva del fenotipo de los animales KI, creemos que nuestro modelo podrá servir para ahondar en la fisiopatología de la cardiomiopatía asociada a déficit en complejo I y explorar en un futuro posibles dianas terapéuticas.

Únicamente se ha descrito un modelo animal con déficit de complejo I que presente una hipertrofia cardiaca severa que desencadene en una esperanza de vida reducida (en ese caso de 4-8 semanas) similar a nuestro modelo

Ndufa10^{KI}. Se trata de un animal *knock-down* para el gen *Ndufs6* generado vía *gene-trap*²⁰⁰. En este modelo se describe una drástica disminución del complejo I ensamblado en corazón y una disminución variable en el resto de tejidos analizados, atribuida a las diferencias de procesamiento del mRNA de *Ndufs6* en cada uno. Sin embargo, a pesar de encontrar un fenotipo similar en cuanto a la cardiomiopatía hipertrófica, en nuestro modelo parece que la alteración a nivel de proteína y complejo I en corazón y cerebro es menos acentuada. De forma que, aunque encontramos una reducción de los niveles de NDUFA10, esta cantidad de proteína parece ser suficiente para estabilizar, en cierto grado, el complejo I en estos tejidos. Cabe destacar que, según nuestros resultados previos en experimentos 2D-SDS-PAGE con mitocondrias de tejidos de ratón y células humanas no toda la NDUFA10 disponible se encuentra ensamblada en el complejo I, ya que una parte de esta parece ser NDUFA10 libre²⁰¹. Por tanto, pese a que exista una reducción de la NDUFA10 disponible, es posible que gran parte de esta reducción sea a consecuencia de la que se encuentra libre y, por tanto, pueda mantenerse en cierta medida el ensamblaje del complejo I. Esta estabilización también podría ser debida a mecanismos intrínsecos de cada tejido que puedan estabilizar la NDUFA10, o el complejo I mutados, con mayor o menor eficacia, como chaperonas o elementos reguladores del *turnover* de la proteína. Por tanto, resultaría interesante estudiar si existen diferencias en la expresión de chaperonas entre diferentes tejidos de los animales KI que puedan ser responsables de la estabilización que encontramos en tejidos como el cerebro.

Por otro lado, se sabe que los complejos III y IV juegan un papel importante en el ensamblaje y estabilidad del complejo I y, a su vez, desempeñan un papel importante en la formación de supercomplejos^{54,55}. De hecho, se ha comprobado que los supercomplejos presentan actividad respiratoria. Teniendo en cuenta que por el momento no hemos detectado ninguna alteración a nivel del complejo III en el modelo KI, sería interesante explorar

la relación entre los complejos I, III y IV en la formación de supercomplejos ($I + III_2$ y $I + III_2 + IV_{1-4}$) que pudiesen estabilizar el complejo I y, además, determinar si existe un incremento en la formación de intermediarios del ensamblaje del complejo que interaccionen con los complejos III y IV para compensar la posible pérdida de actividad respiratoria a nivel del complejo I. En este sentido, será necesario estudiar en nuestro modelo el impacto que las mutaciones tienen sobre la actividad del complejo y si este correlaciona directamente con las alteraciones que encontramos a nivel de proteína y complejo I ensamblado.

Algo similar se ha observado en el modelo *gene-trap Ndufs6* en tejidos como cerebro y músculo, donde la cantidad residual de proteína disponible parece ser suficiente para estabilizar el complejo I en estos tejidos, pero no en corazón. Estas diferencias podrían ser las responsables de la variabilidad en cuanto a esperanza de vida, pues nuestro modelo presenta una supervivencia media de 28,5 semanas frente a las 6 semanas del modelo *Ndufs6*.

También hay que destacar que en dicho modelo se ha descrito un fenotipo sexo-dependiente, siendo en este caso la progresión fenotípica más severa en machos²⁰⁰. Se ha descrito cierta influencia del sexo en la evolución de las patologías cardíacas, siendo el fenotipo considerablemente más acusado en hombres que en mujeres²⁰². Estas diferencias pueden ser atribuidas al efecto de las diferentes hormonas sexuales, dado que es conocido el papel cardioprotector de los estrógenos²⁰³, así como su papel como estimuladores de la biogénesis mitocondrial²⁰⁴. Sin embargo, los andrógenos se han asociado a un claro factor de riesgo para la hipertrofia cardíaca y la fibrosis asociada por mecanismos relacionados con el receptor de angiotensina II tipo 1A (AT1A)²⁰⁵.

Pese a todo esto, en nuestro modelo, no hemos encontrado diferencias relevantes en cuanto al tamaño del corazón o la progresión de la enfermedad entre machos y hembras, aunque el número de animales estudiados es todavía limitado y debería seguir expandiéndose en el futuro para poder asegurarlo.

La gran mayoría de modelos murinos de deficiencias de complejo I que se han generado hasta la fecha tienen como diana la subunidad NDUFS4. El modelo *knock-out* para el gen *Ndufs4* desarrolla un fenotipo similar al síndrome de Leigh con muerte prematura a las 7 semanas de vida²⁰⁶. También existe un modelo *knock-out* para la proteína NDUFS4 específico de neuronas y glía que muestra un fenotipo similar al *knock-out* completo²⁰⁷. En este modelo, la pérdida neuronal a nivel del sistema nervioso central afecta al control respiratorio a consecuencia de una disminución importante de la actividad del complejo I mitocondrial en cerebro, contribuyendo así a la muerte temprana del animal. Paradójicamente, existe un modelo *knock-in* para una mutación en *Ndufs4* que desarrolla un fenotipo más grave y, de hecho, muere en estadio embrionario. Posiblemente esto se debe a que el mutante podría tener interferida la formación del complejo, mientras que la ausencia total de la proteína permitiría la formación de un complejo que, aún no siendo completo, mantendría cierta funcionalidad.

Curiosamente, en nuestro modelo animal, los niveles basales de NDUFA10 y complejo I en cerebro no parecen verse muy afectados. Se debe tener en cuenta que el *turnover* de proteínas se encuentra estrechamente regulado a nivel de tejido. Este *turnover* es generalmente más bajo en cerebro respecto a otros tejidos como hígado o sangre²⁰⁸. Concretamente, proteínas que se encuentran presentes en los tres tejidos tienen un tiempo de vida media cinco veces mayor en cerebro²⁰⁹.

Estas diferencias son debidas, en gran medida, a las peculiaridades del propio tejido cerebral, pues se encuentra formado por una mezcla de células en su mayoría quiescentes, a diferencia de lo que ocurre en hígado o sangre, donde la mayoría de células presentan una alta capacidad replicativa o son producto de un *turnover* celular constante. De esta manera, la presencia de células no replicativas es un factor determinante que incrementa la estabilidad de proteínas del propio tejido²¹⁰. Así pues, las diferencias en el turnover proteico podrían explicar, al menos en parte, las variaciones en cuanto a la cantidad de complejo I detectadas en los distintos tejidos. Finalmente cabe destacar que, pese a encontrar una disminución importante de la cantidad de NDUFA10 y complejo I en hígado, este no parece ser uno de los tejidos más afectados en estos animales, a nivel macroscópico, en el momento de la muerte. Es necesario profundizar en el análisis bioquímico, molecular e histológico del hígado y otros tejidos a fin de encontrar posibles alteraciones que puedan influir en la evolución fenotípica de la cardiomiopatía hipertrófica que, hasta ahora, consideramos la principal causa de la reducida esperanza de vida del animal.

Estos resultados muestran la existencia de una correlación directa entre la presencia de mutaciones en la NDUFA10 y el descenso del dGTP endógeno mitocondrial, lo que demuestra la interacción del nucleótido con la proteína *in vivo*. Esta pérdida de interacción no se traduce en un aumento de los niveles de dGTP libres, muy probablemente debido a una rápida degradación. Cabe destacar que en hígado y cerebro la reducción del *pool* de dGTP coincide con un descenso muy acusado en la cantidad de complejo I, como consecuencia de la desestabilización de la proteína NDUFA10^{KI}. Curiosamente, la reducción en el contenido mitocondrial de dGTP es igualmente muy marcada en cerebro, órgano donde la NDUFA10^{KI} y en consecuencia el complejo I, parecen estar más estabilizados. Esto refuerza la hipótesis de que las mutaciones introducidas inciden directamente en la

capacidad de unión de la proteína al nucleótido y evidencian que la mayor parte del dGTP está unido a NDUFA10 en mitocondria de tejido. En futuros estudios será necesario abordar el papel fisiológico de esta interacción para lo que la generación de este modelo animal ha de ser clave.

Hasta la fecha no se ha establecido una relación clara entre el metabolismo de dNTPs y la actividad del complejo I mitocondrial más allá del hallazgo de un paciente con una mutación puntual en el gen *mtND1* del mtDNA que presenta además deleciones en el propio mtDNA²¹¹. Por tanto, uno de los principales objetivos de la generación de nuestro ratón KI para NDUFA10 ha sido disponer de un modelo que nos permita investigar las consecuencias funcionales que presenta la alteración de la relación NDUFA10-dGTP en el metabolismo de nucleótidos, tanto mitocondriales como celulares y en la homeostasis del mtDNA o, incluso del nDNA. Como ya se ha mencionado, la estabilidad del complejo I en nuestro modelo animal KI parece ser diferente dependiendo del tejido en cuestión. Estos resultados podrían sugerir que el dGTP por si mismo desempeña una función relevante en el ensamblaje del complejo I mitocondrial, cuestión que debería ser estudiada en el futuro. Sin embargo, en este punto no podemos descartar que la estabilidad de la proteína KI de ratón se vea afectada a consecuencia de las mutaciones introducidas y dependa del *ratio* metabólico y de las chaperonas que se expresan de forma específica en cada uno de los tejidos, ya que en el caso de la proteína humana no encontramos diferencias en la estabilidad o actividad del complejo I pero sí encontramos un claro descenso en la capacidad de unir dGTP. Sin embargo, a pesar de las diferencias en cuanto a niveles de complejo I detectadas en los distintos tejidos, hemos confirmado que existe una reducción muy importante de la cantidad de dGTP en mitocondria de todos los tejidos analizados, sin afectar al contenido del resto de dNTPs, independientemente del grado de estabilidad del complejo I mitocondrial que presentan, ya que en el cerebro los niveles de NDUFA10 correlacionan

con los niveles de complejo I, lo que sugiere que el problema de fondo es la falta de la propia NDUFA10. Estas observaciones parecen contradecir la idea de que la disfunción mitocondrial causa importantes alteraciones del metabolismo de nucleótidos como parte de la respuesta fisiológica al estrés que se produce, y que esto se traduce en un efecto reseñable sobre el *pool* mitocondrial de dNTPs²¹², aunque debemos analizar el *pool* citosólico y tener en consideración la activación de posibles mecanismos compensatorios en nuestro modelo. Más aún, si comparamos los resultados obtenidos en cerebro, donde parece mantenerse más de la mitad del complejo I estable, con los obtenidos en hígado, encontramos una alteración prácticamente idéntica en el *pool* de dNTPs, por lo que podríamos atribuir el efecto sobre el contenido en dGTP exclusivamente a las mutaciones introducidas en la NDUFA10, en cerebro y, a la falta de NDUFA10 en hígado, pero descartando un efecto del complejo I sobre el *pool* mitocondrial de dNTPs. Por ello, el cerebro podría ser el órgano diana en el que estudiar específicamente las consecuencias moleculares y el papel de la relación NDUFA10-dGTP en el complejo I y en la fisiología general de este tejido, ya que es el único órgano en el que hemos encontrado una cantidad significativa de complejo I ensamblado.

Por último, debemos tener en cuenta que Agip y colaboradores describieron que la fosforilación del residuo de Ser36 en la NDUFA10 bovina y ovina parece tener un papel inhibitorio de la unión al ligando, que ellos identifican como ADP, pero que nuestro trabajo demuestra que es dGTP. Este residuo está sustituido por Asn o Gly en la proteína humana o de ratón, lo que las habilita para unir el nucleótido¹⁹³. Teniendo en cuenta esto y, que el complejo I en bovino/ovino es perfectamente activo, no parece evidente que la unión del dGTP a la NDUFA10 tenga implicaciones sobre la modulación de la actividad del complejo I.

De esta manera, teniendo en cuenta que la unión encontrada entre el dGTP y la NDUFA10 es estable, ya que se mantiene durante el procesamiento de las muestras, que involucra a la gran mayoría del dGTP en todos los tejidos analizados, que el dGTP que no encontramos unido a NDUFA10 no puede ser detectado en la fracción libre y supuestamente es rápidamente degradado, y que la pérdida de dGTP en células y el modelo animal KI es específica y no responde a deficiencias oxidativas graves y que mitocondria y núcleo comparten componentes entre sí, una hipótesis para esta relación nucleótido-proteína sería considerar que la NDUFA10 actúa en mitocondria como un reservorio de dGTP. De esta manera, la NDUFA10 estaría protegiendo al dGTP de su degradación enzimática y actuando como un mecanismo que permitiría expandir su disponibilidad en función de las necesidades metabólicas en cada momento del ciclo celular, posiblemente para asegurar la integridad del genoma mitocondrial o regular su síntesis. Incluso, dada la elevada proporción de dGTP que se encuentra “retenido” este podría tener un impacto en el *pool* celular tras la liberación del dGTP desde la mitocondria a través de transportadores específicos de membrana²¹³, pudiendo tener un impacto relevante sobre la síntesis de DNA nuclear, especialmente en tejidos formados por células quiescentes donde la síntesis *de novo* de nucleótidos está muy reducida. Por tanto, dada la importante disminución de la cantidad de dGTP que hemos encontrado en tejidos de nuestro modelo, sería esperable encontrar algún tipo de alteración en el mtDNA, ya sea a nivel de cantidad (depleción) o calidad (deleciones múltiples) e incluso, esta alteración podría afectar también al propio genoma nuclear, lo que, de confirmarse, podría considerarse como la primera evidencia directa que relaciona el metabolismo oxidativo con la homeostasis de dNTPs y la estabilidad del DNA. Estos aspectos serán explorados en futuras investigaciones con los modelos animal y celular generados.

Además, dado que, aproximadamente, la mitad de los pacientes con deficiencias de complejo I presentan un amplio rango de actividad complejo I en diferentes tejidos, el modelo KI generado en este trabajo constituye una excelente oportunidad para ahondar en los mecanismos moleculares y fisiológicos que subyacen al desarrollo de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

1. El contenido mitocondrial en dNTPs es marcadamente asimétrico en tejidos de ratón y células humanas. El dGTP se encuentra ampliamente sobrerrepresentado respecto al resto de especies, y constituye como mínimo un 70% del total de dNTPs mitocondriales en las muestras analizadas. En algunos tejidos de ratón, este porcentaje alcanza valores del 90% o incluso superiores.
2. La mayor parte del dGTP se encuentra unido a proteína en las mitocondrias. La asociación del nucleótido con la fracción proteica es estable durante los procesos habituales de extracción, salvo en los casos en que estos implican la desnaturalización completa de las proteínas en la muestra. Este hecho explica las discrepancias en los valores de dGTP mitocondriales previamente publicados por distintos grupos de investigación.
3. La gran mayoría del dGTP mitocondrial está unida al complejo I de la cadena respiratoria a través de la subunidad NDUFA10. En tejidos de ratón esta proporción alcanza la práctica totalidad del nucleótido.
4. El dGTP se encuentra asociado a la NDUFA10 a través de su dominio dNK, común con desoxinucleósido quinasas, en una proporción estequiométrica 1:1.
5. Las mutaciones E160A/R161A introducidas en la NDUFA10 de ratón conllevan el desarrollo de una cardiomiopatía hipertrófica que conduce a la muerte prematura de los animales hacia los 6 meses de edad. Dichas mutaciones afectan a la estabilidad de la proteína NDUFA10 y, en consecuencia, al complejo I de ratón, en grado variable en los distintos tejidos.

6. Las mutaciones E160A/R161A en las proteínas humana y murina dan lugar a una reducción drástica en el contenido total de dGTP mitocondrial sin alterar el resto de dNTPs. Esta reducción se debe a la disminución en la afinidad por el dGTP de la proteína mutada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vafai, S. B. & Mootha, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374–383 (2012).
2. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics* **39**, 359–407 (2005).
3. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159 (2012).
4. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 872–884 (2010).
5. Jayashankar, V. & Rafelski, S. M. Integrating mitochondrial organization and dynamics with cellular architecture. *Current opinion in cell biology* **26**, 34–40 (2014).
6. Schon, E. A., DiMauro, S. & Hirano, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature reviews. Genetics* **13**, 878–890 (2012).
7. Zeviani, M. & di Donato, S. Mitochondrial disorders. *Brain* **127**, 2153–2172 (2004).
8. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**, 314–318 (2006).
9. Reichert, A. S. & Neupert, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in Genetics* **20**, 555–562 (2004).
10. Scheffler, I. E. Mitochondria make a come back. *Advanced Drug Delivery Reviews* **49**, 3–26 (2001).
11. Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W. & Nagley, P. 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 (2003).
12. Mohamed Yusoff, A. A. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **11**, 535–544 (2015).
13. Garesse, R. & Vallejo, C. G. Animal mitochondrial biogenesis and function: A regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1–16 (2001).
14. Morgenstern, M. *et al.* Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports* **19**, 2836–2852 (2017).
15. Ye, F., Carrodeguas, J. A. & Bogenhagen, D. F. The γ subfamily of DNA polymerases: Cloning of a developmentally regulated cDNA encoding

- Xenopus laevis mitochondrial DNA polymerase γ . *Nucleic Acids Research* **24**, 1481–1488 (1996).
16. Maldonado, A. & Quintanilla, B. Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. 1–9 (2013).
 17. Holt, I. J. *et al.* Mammalian mitochondrial nucleoids: Organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* **7**, 311–321 (2007).
 18. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13534–13539 (2011).
 19. Morozov, Y. I. *et al.* A model for transcription initiation in human mitochondria. *Nucleic acids research* **43**, 3726–3735 (2015).
 20. Young, M. J. & Copeland, W. C. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Current opinion in genetics & development* **38**, 52–62 (2016).
 21. Zinovkina, L. A. DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochemistry. Biokhimiia* **84**, 884–895 (2019).
 22. Milenkovic, D. *et al.* Twinkle is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Human Molecular Genetics* **22**, 1983–1993 (2013).
 23. Graziewicz, M. A., Longley, M. J. & Copeland, W. C. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical reviews* **106**, 383–405 (2006).
 24. Falkenberg, M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway. *Essays in Biochemistry* **62**, 287–296 (2018).
 25. Zhang, H. *et al.* Human mitochondrial topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10608–10613 (2001).
 26. Sobek, S. & Boege, F. DNA topoisomerases in mtDNA maintenance and ageing. *Experimental Gerontology* **56**, 135–141 (2014).
 27. Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology* **88**, 41–56 (2003).
 28. Reyes, A. *et al.* Mitochondrial DNA replication proceeds via a “bootlace” mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic acids research* **41**, 5837–5850 (2013).

29. Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V. & Zeviani, M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1793**, 200–211 (2009).
30. Fontanesi, F., Soto, I. C. & Barrientos, A. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB life* **60**, 557–568 (2008).
31. Zara, V., Conte, L. & Trumpower, B. L. Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc₁ complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *The FEBS journal* **276**, 1900–1914 (2009).
32. Koopman, W. J. H., Distelmaier, F., Smeitink, J. A. M. & Willems, P. H. G. M. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO journal* **32**, 9–29 (2013).
33. Murray, J. *et al.* The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 13619–13622 (2003).
34. Carroll, J. *et al.* Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 32724–32727 (2006).
35. Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. & Walker, J. E. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2**, 117–126 (2003).
36. Grigorieff, N. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) at 2.2 Å in ice. *Journal of Molecular Biology* **277**, 1033–1046 (1998).
37. Rodenburg, R. J. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochimica et biophysica acta* **1857**, 938–945 (2016).
38. Janssen, R. J. R. J., Nijtmans, L. G., van den Heuvel, L. P. & Smeitink, J. A. M. Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **29**, 499–515 (2006).
39. Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J. & Walker, J. E. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1604**, 135–150 (2003).
40. Carroll, J., Shannon, R. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E. & Hirst, J. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I: Identification of two new subunits. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 50311–50317 (2002).

41. Yip, C., Harbour, M. E., Jayawardena, K., Fearnley, I. M. & Sazanov, L. A. Evolution of respiratory complex I: “supernumerary” subunits are present in the alpha-proteobacterial enzyme. *The Journal of biological chemistry* **286**, 5023–5033 (2011).
42. Angerer, H. *et al.* A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *The Biochemical journal* **437**, 279–288 (2011).
43. Abdrakhmanova, A., Dobrynin, K., Zwicker, K., Kerscher, S. & Brandt, U. Functional sulfurtransferase is associated with mitochondrial complex I from *Yarrowia lipolytica*, but is not required for assembly of its iron-sulfur clusters. *FEBS Letters* **579**, 6781–6785 (2005).
44. Dobrynin, K. *et al.* Characterization of two different acyl carrier proteins in complex I from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1797**, 152–159 (2010).
45. Fearnley, I. M. *et al.* GRIM-19, a Cell Death Regulatory Gene Product, Is a Subunit of Bovine Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38345–38348 (2001).
46. Stroud, D. A. *et al.* Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* **538**, 123–126 (2016).
47. Elurbe, D. M. & Huynen, M. A. The origin of the supernumerary subunits and assembly factors of complex I: A treasure trove of pathway evolution. *Biochimica et biophysica acta* **1857**, 971–979 (2016).
48. Stiburek, L. *et al.* Knockdown of Human Oxa1l Impairs the Biogenesis of F1Fo-ATP Synthase and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase. *Journal of Molecular Biology* **374**, 506–516 (2007).
49. Hangen, E. *et al.* Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Molecular Cell* **58**, 1001–1014 (2015).
50. Formosa, L. E., Dibley, M. G., Stroud, D. A. & Ryan, M. T. Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **76**, 154–162 (2018).
51. Perales-Clemente, E. *et al.* Five Entry Points of the Mitochondrially Encoded Subunits in Mammalian Complex I Assembly. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 3038–3047 (2010).

52. Antonicka, H. *et al.* Identification and Characterization of a Common Set of Complex I Assembly Intermediates in Mitochondria from Patients with Complex I Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 43081–43088 (2003).
53. Busch, K. B., Bereiter-Hahn, J., Wittig, I., Schagger, H. & Jendrach, M. Mitochondrial dynamics generate equal distribution but patchwork localization of respiratory Complex I. *Molecular Membrane Biology* **23**, 509–520 (2006).
54. Li, Y. *et al.* An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 17557–17562 (2007).
55. Moreno-Lastres, D. *et al.* Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell metabolism* **15**, 324–335 (2012).
56. Friedrich, T. & Weiss, H. Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *Journal of Theoretical Biology* **187**, 529–540 (1997).
57. Tuschen, G. *et al.* Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits. *Journal of molecular biology* **213**, 845–857 (1990).
58. Guerrero-Castillo, S. *et al.* The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell metabolism* **25**, 128–139 (2017).
59. Vartak, R. S., Semwal, M. K. & Bai, Y. An update on complex I assembly: the assembly of players. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **46**, 323–328 (2014).
60. Babot, M., Birch, A., Labarbuta, P. & Galkin, A. Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex i. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**, 1083–1092 (2014).
61. Kotlyar, A. B., Sled, V. D. & Vinogradov, A. D. Effect of Ca²⁺ ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochimica et biophysica acta* **1098**, 144–150 (1992).
62. Blaza, J. N., Vinothkumar, K. R. & Hirst, J. Structure of the Deactive State of Mammalian Respiratory Complex I. *Structure* **26**, 312–319.e3 (2018).
63. Galkin, A. *et al.* Identification of the mitochondrial ND3 subunit as a structural component involved in the active/deactive enzyme

- transition of respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 20907–20913 (2008).
64. Efremov, R. G. & Sazanov, L. A. Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature* **476**, 414–421 (2011).
 65. Sarzi, E. *et al.* A novel recurrent mitochondrial DNA mutation in ND3 gene is associated with isolated complex I deficiency causing Leigh syndrome and dystonia. *American journal of medical genetics. Part A* **143A**, 33–41 (2007).
 66. Nesbitt, V. *et al.* The clinical spectrum of the m.10191T>C mutation in complex I-deficient Leigh syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology* **54**, 500–506 (2012).
 67. Babot, M. & Galkin, A. Molecular mechanism and physiological role of active-deactive transition of mitochondrial complex I. *Biochemical Society Transactions* **41**, 1325–1330 (2013).
 68. Galkin, A. & Moncada, S. Modulation of the conformational state of mitochondrial complex I as a target for therapeutic intervention. *Interface Focus* **7**, 1–8 (2017).
 69. Bai, Y. *et al.* Lack of Complex I Activity in Human Cells Carrying a Mutation in MtDNA-encoded ND4 Subunit Is Corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-Quinone Oxidoreductase (ND11) Gene. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38808–38813 (2001).
 70. Hofhaus, G. & Attardi, G. Corrigendum: Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product (The EMBO Journal (1993) 12 (3043-3048)). *EMBO Journal* **13**, 5794 (1994).
 71. Bai, Y. *et al.* Genetic and functional analysis of mitochondrial DNA-encoded complex I genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1011**, 272–283 (2004).
 72. Pätsi, J. *et al.* LHON/MELAS overlap mutation in ND1 subunit of mitochondrial complex I affects ubiquinone binding as revealed by modeling in *Escherichia coli* NDH-1. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1817**, 312–318 (2012).
 73. Fiedorczuk, K. & Sazanov, L. A. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends in cell biology* **28**, 835–867 (2018).
 74. Muñoz, J. *et al.* Mass spectrometric characterization of mitochondrial complex I NDUFA10 variants. *Proteomics* **8**, 1898–1908 (2008).

75. Dang, Q.-C. L. *et al.* Analysis of Human Mutations in the Supernumerary Subunits of Complex I. *Life (Basel, Switzerland)* **10**, (2020).
76. Sabini, E., Hazra, S., Ort, S., Konrad, M. & Lavie, A. Structural Basis for Substrate Promiscuity of dCK. *Journal of Molecular Biology* **378**, 607–621 (2008).
77. Morais, V. A. *et al.* PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science* **344**, 203–207 (2014).
78. Sun, F. *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell* **121**, 1043–1057 (2005).
79. Papa, S. *et al.* *The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 942 (2012).
80. Bentinger, M., Tekle, M. & Dallner, G. Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**, 74–79 (2010).
81. Hüttemann, M. *et al.* The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* **11**, 369–381 (2011).
82. Pedersen, P. L. Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 349–355 (2007).
83. CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* **176**, 250–254 (1955).
84. CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *The Journal of biological chemistry* **217**, 409–427 (1955).
85. Hackenbrock, C. R., Chazotte, B. & Gupte, S. S. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **18**, 331–368 (1986).
86. Schägger, H. & Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO Journal* **19**, 1777–1783 (2000).

87. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. & Enriquez, J. A. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell* **32**, 529–539 (2008).
88. Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. v. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**, 418–426 (2014).
89. Eubel, H., Heinemeyer, J. & Braun, H. P. Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiology* **134**, 1450–1459 (2004).
90. Heinemeyer, J., Braun, H. P., Boekema, E. J. & Kouřil, R. A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12240–12248 (2007).
91. Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J. L. & Kühlbrandt, W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I 1 III 2 IV 1. *EMBO Journal* **30**, 4652–4664 (2011).
92. Lobo-Jarne, T. & Ugalde, C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **76**, 179–190 (2018).
93. Davies, K. M., Blum, T. B. & Kühlbrandt, W. Conserved in situ arrangement of complex I and III(2) in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 3024–3029 (2018).
94. Hirst, J. Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC biology* **16**, 111 (2018).
95. Protasoni, M. *et al.* Respiratory supercomplexes act as a platform for complex III-mediated maturation of human mitochondrial complexes I and IV. *The EMBO journal* **39**, e102817 (2020).
96. Lopez-Fabuel, I. *et al.* Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 13063–13068 (2016).
97. Erecińska, M. & Wilson, D. F. Regulation of cellular energy metabolism. *The Journal of membrane biology* **70**, 1–14 (1982).
98. Kunz, W. *et al.* Relations between Extramitochondrial and Intramitochondrial Adenine Nucleotide Systems ATP and ADP are the

- most important reactants of energy-transferring enzymes in the cell . Under aerobic conditions the largest portion of ATP is formed within the mitoc. **209**, 219–229 (1981).
99. Halestrap, A. P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **973**, 355–382 (1989).
 100. Groen, A. K., Wanders, R. J., Westerhoff, H. v, van der Meer, R. & Tager, J. M. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *The Journal of biological chemistry* **257**, 2754–2757 (1982).
 101. Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M. & Rodenburg, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **35**, 211–225 (2012).
 102. Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. & Brand, M. D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry* **47**, 53–67 (2010).
 103. Bray, D. & Adams, R. J. Cell Biology International EFFECTS OF THE UNCOUPLING AGENTS FCCP AND CCCP ON THE SALTATORY MOVEMENTS OF CYTOPLASMIC ORGANELLES MRC Cell Biophysics Unit , 26 Drury Lane , London WC2B 5RL , LJR Two potent uncoupling agents , oxyphenylhydrazone (FCCP) and . **9**, (1985).
 104. Porter, C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue. *Adipocyte* **6**, 167–174 (2017).
 105. Cadenas, E. & Davies, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* **29**, 222–230 (2000).
 106. Brand, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **100**, 14–31 (2016).
 107. Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L. & Yu, Z. bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **44**, 3–15 (2019).
 108. Muller, F. L., Liu, Y. & van Remmen, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 49064–49073 (2004).
 109. Ercińska, M. & Wilson, D. F. The effect of antimycin A on cytochromes b561, b566, and their relationship to ubiquinone and

- the iron-sulfer centers S-1 (+N-2) and S-3. *Archives of biochemistry and biophysics* **174**, 143–157 (1976).
110. Rampazzo, C. *et al.* Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **703**, 2–10 (2010).
 111. Wang, L. Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **35**, 578–594 (2016).
 112. Young, J. D. The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: A 30-year collaborative odyssey. *Biochemical Society Transactions* **44**, 869–876 (2016).
 113. Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S. Emerging roles of nucleoside transporters. *Frontiers in Pharmacology* **9**, 1–8 (2018).
 114. di Noia, M. A. *et al.* The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 33137–33148 (2014).
 115. Ferraro, P., Nicolosi, L., Bernardi, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18586–18591 (2006).
 116. Krishnan, S. *et al.* Transgene expression of *Drosophila melanogaster* nucleoside kinase reverses mitochondrial thymidine kinase 2 deficiency. *The Journal of biological chemistry* **288**, 5072–5079 (2013).
 117. González-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A. L. & Martí, R. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genetics* **7**, (2011).
 118. Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K. & Ecklund, H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1327–1346 (2002).
 119. Wang, L. Deoxynucleoside salvage enzymes and tissue specific mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **29**, 370–381 (2010).

120. Xu, Y., Johansson, M. & Karlsson, A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1563–1571 (2008).
121. Besse, A. *et al.* The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell metabolism* **21**, 417–427 (2015).
122. Kowluru, A., Tannous, M. & Chen, H. Q. Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic β cell: Evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **398**, 160–169 (2002).
123. Clausen, A. R. *et al.* Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS journal* **279**, 3889–3897 (2012).
124. Johansson, M. & Karlsson, A. Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8454–8458 (1997).
125. Johansson, M. & Karlsson, A. Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7258–7262 (1996).
126. Sherleys, J. L., Kelly, T. J. & An, R. Human Cytosolic Thymidine Kinase. (1988).
127. Chottiner, E. G. *et al.* Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1531–1535 (1991).
128. Ke, P.-Y. & Chang, Z.-F. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Molecular and cellular biology* **24**, 514–526 (2004).
129. Slot Christiansen, L., Munch-Petersen, B. & Knecht, W. Non-Viral Deoxyribonucleoside Kinases--Diversity and Practical Use. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* **42**, 235–248 (2015).
130. Welin, M. *et al.* Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17970–17975 (2004).
131. Cámara, Y., González-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J. & Martí, R. Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to

- rescue mitochondrial DNA. *Drug Discovery Today* **18**, 950–957 (2013).
132. Park, I. & Ives, D. H. Kinetic mechanism and end-product regulation of deoxyguanosine kinase from beef liver mitochondria. *Journal of biochemistry* **117**, 1058–1061 (1995).
 133. Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 681–706 (2006).
 134. Bourdon, A. *et al.* Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics* **39**, 776–780 (2007).
 135. Jones, M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annual review of biochemistry* **49**, 253–279 (1980).
 136. Chimploy, K., Song, S., Wheeler, L. J. & Mathews, C. K. Ribonucleotide reductase association with mammalian liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 13145–13155 (2013).
 137. Anderson, D. D., Quintero, C. M. & Stover, P. J. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 15163–15168 (2011).
 138. Kamath, V. G., Hsiung, C. H., Lizenby, Z. J. & McKee, E. E. Heart mitochondrial TTP synthesis and the compartmentalization of TMP. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 2034–2041 (2015).
 139. Torres, R. J. & Puig, J. G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2**, 1–10 (2007).
 140. Villa, E., Ali, E. S., Sahu, U. & Ben-Sahra, I. Cancer cells tune the signaling pathways to empower de novo synthesis of nucleotides. *Cancers* **11**, 1–20 (2019).
 141. Murray, A. W. The biological significance of purine salvage. *Annual review of biochemistry* **40**, 811–826 (1971).
 142. Vergis, J. M., Bullock, K. G., Fleming, K. G. & Beardsley, G. P. Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7727–7733 (2001).

143. French, J. B. *et al.* Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria. *Science (New York, N.Y.)* **351**, 733–737 (2016).
144. Ben-Sahra, I., Howell, J. J., Asara, J. M. & Manning, B. D. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science (New York, N.Y.)* **339**, 1323–1328 (2013).
145. Pedley, A. M. & Benkovic, S. J. A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in biochemical sciences* **42**, 141–154 (2017).
146. Evans, D. R. & Guy, H. I. Mammalian pyrimidine biosynthesis: Fresh insights into an ancient pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 33035–33038 (2004).
147. Huang, M. & Graves, L. M. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 321–336 (2003).
148. Moreno-Morcillo, M. *et al.* Structural Insight into the Core of CAD, the Multifunctional Protein Leading De Novo Pyrimidine Biosynthesis. *Structure* **25**, 912-923.e5 (2017).
149. Lane, A. N. & Fan, T. W. M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research* **43**, 2466–2485 (2015).
150. Baldwin, S. A. *et al.* The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **447**, 735–743 (2004).
151. Chabes, A. L., Pflieger, C. M., Kirschner, M. W. & Thelander, L. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: A new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3925–3929 (2003).
152. Melo, S. P., Yoshida, A. & Berger, F. G. Functional dissection of the N-terminal degron of human thymidylate synthase. *Biochemical Journal* **432**, 217–226 (2010).
153. Franzolin, E. *et al.* The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 14272–14277 (2013).

154. Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T. & Sjöberg, B. M. DNA building blocks: Keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **47**, 50–63 (2012).
155. Ji, X. *et al.* Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E4305–E4314 (2014).
156. Graves, L. M. *et al.* Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* **403**, 328–332 (2000).
157. Mannava, S. *et al.* Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **7**, 2392–2400 (2008).
158. Liu, Y. C. *et al.* Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-myc. *PLoS ONE* **3**, (2008).
159. Kollareddy, M. *et al.* Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nature communications* **6**, 7389 (2015).
160. Carter, C. W. J. The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution. *Biochimie* **77**, 92–98 (1995).
161. Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F. & Walker, J. E. The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2284–2288 (2001).
162. Palmieri, F. Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **37**, 565–575 (2014).
163. Barnes, K. *et al.* Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circulation research* **99**, 510–519 (2006).
164. Baldwin, S. A. *et al.* Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15880–15887 (2005).
165. Lai, Y., Tse, C.-M. & Unadkat, J. D. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in

- enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *The Journal of biological chemistry* **279**, 4490–4497 (2004).
166. Govindarajan, R. *et al.* Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **296**, G910-22 (2009).
167. Engel, K., Zhou, M. & Wang, J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *The Journal of biological chemistry* **279**, 50042–50049 (2004).
168. Davidson, M. B. *et al.* Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO Journal* **31**, 895–907 (2012).
169. Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. & Merrill, G. F. Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism that Preserves Basal dNTP Pools. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 223–230 (2004).
170. Gupta, A. *et al.* Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. *Genetics* **193**, 1095–1105 (2013).
171. López, L. C. *et al.* Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Human Molecular Genetics* **18**, 714–722 (2009).
172. Wang, L. & Eriksson, S. Tissue specific distribution of pyrimidine deoxynucleoside salvage enzymes shed light on the mechanism of mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **29**, 400–403 (2010).
173. Martí, R., Nishigaki, Y. & Hirano, M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 14–18 (2003).
174. Lee, M.-H., Wang, L. & Chang, Z.-F. The contribution of mitochondrial thymidylate synthesis in preventing the nuclear genome stress. *Nucleic acids research* **42**, 4972–4984 (2014).
175. Ferraro, P., Franzolin, E., Pontarin, G., Reichard, P. & Bianchi, V. Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic acids research* **38**, e85 (2010).
176. Song, S. *et al.* DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4990–4995 (2005).

177. DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and cellular biology* **7**, 379–387 (1987).
178. Fernández-Vizarra, E., López-Pérez, M. J. & Enriquez, J. A. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods (San Diego, Calif.)* **26**, 292–297 (2002).
179. Fernández-Vizarra, E. *et al.* Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion* **10**, 253–262 (2010).
180. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
181. Einarson, M. B., Pugacheva, E. N. & Orlinick, J. R. Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione-S-Transferase (GST) Fusion Proteins. *CSH protocols* **2007**, pdb.top11 (2007).
182. Sambrook, J. & Russell, D. W. Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique. *CSH protocols* **2006**, (2006).
183. Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H. Blue native PAGE. *Nature protocols* **1**, 418–428 (2006).
184. Wheeler, L. J. & Mathews, C. K. Nucleoside triphosphate pool asymmetry in mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **286**, 16992–16996 (2011).
185. Sherman, P. A. & Fyfe, J. A. Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Analytical biochemistry* **180**, 222–226 (1989).
186. Alsudir, S., Iqbal, Z. & Lai, E. P. C. Competitive CE-UV binding tests for selective recognition of bisphenol A by molecularly imprinted polymer particles. *Electrophoresis* **33**, 1255–1262 (2012).
187. Mapuskar, K. A. *et al.* Persistent increase in mitochondrial superoxide mediates cisplatin-induced chronic kidney disease. *Redox biology* **20**, 98–106 (2019).
188. Kumar, D. *et al.* Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic acids research* **39**, 1360–1371 (2011).
189. Filosto, M. *et al.* Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE-MTDPS1). *Journal of clinical medicine* **7**, (2018).

190. Pickrell, A. M. & Youle, R. J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* **85**, 257–273 (2015).
191. Pogson, J. H. *et al.* The complex I subunit NDUFA10 selectively rescues *Drosophila* pink1 mutants through a mechanism independent of mitophagy. *PLoS genetics* **10**, e1004815 (2014).
192. Desler, C. *et al.* Mitochondria as determinant of nucleotide pools and chromosomal stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **625**, 112–124 (2007).
193. Agip, A.-N. A. *et al.* Cryo-EM structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically defined states. *Nature structural & molecular biology* **25**, 548–556 (2018).
194. Barroso, J. F., Elholm, M. & Flatmark, T. Tight binding of deoxyribonucleotide triphosphates to human thymidine kinase 2 expressed in *Escherichia coli*. Purification and partial characterization of its dimeric and tetrameric forms. *Biochemistry* **42**, 15158–15169 (2003).
195. Mikkelsen, N. E. *et al.* Structural basis for feedback inhibition of the deoxyribonucleoside salvage pathway: studies of the *Drosophila* deoxyribonucleoside kinase. *Biochemistry* **42**, 5706–5712 (2003).
196. Brand, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology* **35**, 811–820 (2000).
197. Brookes, P. S. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free radical biology & medicine* **38**, 12–23 (2005).
198. Kim, C. *et al.* An X-chromosome linked mouse model (*Ndufa1*(S55A)) for systemic partial Complex I deficiency for studying predisposition to neurodegeneration and other diseases. *Neurochemistry international* **109**, 78–93 (2017).
199. Forte, M., Palmerio, S., Bianchi, F., Volpe, M. & Rubattu, S. Mitochondrial complex I deficiency and cardiovascular diseases: current evidence and future directions. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **97**, 579–591 (2019).
200. Ke, B. *et al.* Tissue-specific splicing of an *Ndufs6* gene-trap insertion generates a mitochondrial complex I deficiency-specific cardiomyopathy. **109**, 6165–6170 (2012).
201. D Molina-Granada, Y. Cámara. Purificación y caracterización de las proteínas de unión a dNTPs mitocondriales. Trabajo Final de Máster. Universidad Autónoma de Barcelona, 2016. 2016 (2016).

202. de Simone, G., Devereux, R. B., Daniels, S. R. & Meyer, R. A. Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **26**, 979–983 (1995).
203. Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England journal of medicine* **340**, 1801–1811 (1999).
204. Mattingly, K. A. *et al.* Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **22**, 609–622 (2008).
205. Li, Y. *et al.* Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* **145**, 951–958 (2004).
206. Kruse, S. E. *et al.* Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell metabolism* **7**, 312–320 (2008).
207. Quintana, A., Kruse, S. E., Kapur, R. P., Sanz, E. & Palmiter, R. D. Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. **107**, 4–9 (2010).
208. LAJTHA, A. Amino acid and protein metabolism of the brain. V. Turnover of leucine in mouse tissues. *Journal of neurochemistry* **3**, 358–365 (1959).
209. Price, J. C., Guan, S., Burlingame, A., Prusiner, S. B. & Ghaemmaghami, S. Analysis of proteome dynamics in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14508–14513 (2010).
210. McClatchy, D. B., Bartolomé, S. M., Gao, Y., Adam, M. L. & Iij, J. R. Y. Quantitative analysis of global protein stability rates in tissues. *Scientific Reports* 1–12 (2020) doi:10.1038/s41598-020-72410-y.
211. Mezghani, N. *et al.* The mitochondrial ND1 m.3337G>A mutation associated to multiple mitochondrial DNA deletions in a patient with Wolfram syndrome and cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications* **411**, 247–252 (2011).
212. Nikkanen, J. *et al.* Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Article Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. 1–14 (2016).

213. Priego, E.-M. *et al.* Recent advances in thymidine kinase 2 (TK2) inhibitors and new perspectives for potential applications. *Current pharmaceutical design* **18**, 2981–2994 (2012).