



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](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>

**CONFIGURACIÓN DE UNA ESTRATEGIA PARA LA  
IDENTIFICACIÓN GENÉTICO-MOLECULAR DE  
PACIENTES CON ENFERMEDAD MITOCONDRIAL**

**Lidia Carreño Gago**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2017**

**Tesis Doctoral**

Configuración de una estrategia para la identificación  
genético-molecular de pacientes con enfermedad  
mitocondrial

**Lidia Carreño Gago**

Tesis adscrita al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la  
Universitat Autònoma de Barcelona

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de Patología Neuromuscular y Mitocondrial del  
Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron

Directora

**Dra. Elena García Arumí**

Tutora

**Dra. Anna Mesequer Navarro**

Universitat Autònoma de Barcelona

2017

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos hereditarios de metabolismo caracterizados por la alteración de la función mitocondrial, que en la mayor parte de los casos derivan en una disfunción en el sistema de fosforilación oxidativa. Este grupo de enfermedades es muy heterogéneo tanto clínica como genéticamente, debido a su implicación multiorgánica y a su origen genético dual. Debido a que por lo general no hay correlación entre fenotipo y genotipo en los pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, en la mayor parte de los casos es difícil realizar un diagnóstico molecular definitivo. La integración de las técnicas de secuenciación masiva en este diagnóstico permite mejorar su eficacia, así como asociar nuevos fenotipos a genes ya descritos como implicados en estas enfermedades o incluso asociar nuevos genes a fenotipos clínicos.

Durante el desarrollo de este trabajo, se ha integrado la secuenciación masiva en el diagnóstico de pacientes con fenotipo clínico de enfermedad mitocondrial. En primer lugar, se ha puesto a punto la secuenciación del ADNmt completo, así como se ha diseñado y validado un panel de genes a la carta incluyendo aquellos genes implicados en el mantenimiento del ADNmt, para su posterior uso en el diagnóstico; además, junto a dos aproximaciones, se ha aplicado el exoma clínico y el exoma completo a este diagnóstico. Finalmente, se han caracterizado variantes potencialmente patogénicas no descritas anteriormente, y se han estudiado posibles variables modificadoras del fenotipo en pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica portadores de la variante homoplasmica m.1555A>G.

Se ha obtenido un alto rendimiento diagnóstico incluyendo diferentes técnicas de secuenciación masiva en la rutina diagnóstica de pacientes con enfermedad mitocondrial, sobretodo en pacientes bien caracterizados clínicamente. La secuenciación del ADNmt ha permitido la detección de variantes patogénicas en muy bajo porcentaje de heteroplasmia, así como el diagnóstico de pacientes con variantes no asociadas comúnmente a sus fenotipos. La aplicación del panel de genes a la carta ha permitido realizar el diagnóstico genético de pacientes con deleciones múltiples en el ADNmt. Con la aplicación del exoma clínico y el exoma completo, hemos identificado variantes potencialmente patogénicas asociadas a pacientes con síndrome de Leigh y defectos en la actividad enzimática de los complejos OXPHOS; además, una de las variantes se ha encontrado en un gen donde no se han asociado mutaciones previamente a un fenotipo clínico, abriendo nuevas líneas de investigación. Además, se ha podido caracterizar la patogenicidad de las variantes patogénicas estudiadas, asociándolas a los fenotipos clínicos de los pacientes.



The mitochondrial disorders (MD) are a group of inherited metabolic diseases characterized by an alteration in the correct function of the mitochondria, mainly due to deficiencies of the oxidative phosphorylation system. These diseases are genetically and clinically heterogeneous, due to their dual genetic origin (they can be caused due to mutations in the nuclear and in the mitochondrial genome) and their great phenotypic variability (the disease can affect only one organ or it can be multisystemic). Many times this group of disorders lacks of a genotype-phenotype correlation, since the same mutation can generate different phenotypes, and one specific phenotype can be caused by mutations in different genes, and this fact hampers the genetic diagnose of these disorders.

The hypothesis of this thesis proposes that the use of the next generation sequencing (NGS) technologies in the genetic diagnostic of the MD will improve its performance. The use of the NGS in the diagnostic of these diseases will allow the detection of new point mutations in genes already described. Furthermore, the diagnostic through NGS also will allow to associate genes related with a specific MD to new phenotypes, or even to discover new genes causing MD, thus expanding the genetic and phenotypic spectrum of MD and improving the performance of the genetic diagnostic.

In the present work we have integrated massive sequencing analysis of mitochondrial and nuclear genes to the diagnostic of patients with MD. We have set up and validated the complete mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing that has enabled us to detect low levels of mtDNA heteroplasmy. Furthermore, the covering homogeneity of the complete mtDNA molecule has been optimized. This methodology has allowed us to precisely determine the concrete deleted sequences in single mtDNA deletions. Additionally, we have designed *à la carte* and validated a panel of genes directly related to mtDNA maintenance for diagnostic purposes. In patients with MD the clinic (n=8) and complete (n=9) exomes have been studied and analyzed. In this regard, new potentially mutagenic variants in both nuclear and mitochondrial DNA genes have been completely characterized, as well as potential phenotypic modulator variants in Non-Syndromic Sensoryneural Hearing Loss patients carrying the homoplasmic m.1555A>G mutation in the MTRNR1 gene.

The application of the massive sequencing analysis technique in the diagnosis of these MD has represented an increase in the diagnosis efficiency, specially in those patients that had been well characterized clinically. MtDNA sequencing has allowed the detection in peripheric blood samples of pathogenic variants with a very low degree of heteroplasmy that were not previously detected by the classic Sanger sequencing, reducing the necessity of performing a muscle biopsy. In the complete mtDNA sequencing study, we have detected pathogenic variants that had not been previously associated to the phenotype of the patients. Additionally, the application of the genes panel related with mtDNA maintenance has proven to be very efficient, specially in those patients with multiple mtDNA deletions, being the POLG and TK2 the most representative in those patients. The clinic exome study in patients with Leigh syndrome has allowed us to genetically diagnose 2 out of 6 patients studied. Finally, in two patients with multi-enzymatic deficit of the oxidative phosphorylation system, we have found new potentially pathogenic variants, one in a gene previously associated with the YARS2 clinical phenotype, while the other in a mitochondrial gene previously not associated to any MD.



# **1 ÍNDICE**





<b>2- ABREVIACIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>3- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1- La mitocondria .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2- ADN mitocondrial (ADNmt) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3- Genética mitocondrial .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4- Expresión del ADNmt .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4.1- Replicación .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4.2- Transcripción .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3- Traducción .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.4- Mantenimiento del proteoma mitocondrial.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5- Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS).....</b>	<b>32</b>
<b>3.6- Enfermedades mitocondriales (EM).....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.1- Clasificación de las EM .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6.1.1- EM debidas a defectos en el ADNmt .....</b>	<b>37</b>
<i>3.6.1.1.1- Mutaciones puntuales.....</i>	<i>37</i>
<i>3.6.1.1.2- Grandes deleciones únicas del ADNmt.....</i>	<i>40</i>
<b>3.6.1.2- EM debidas a defectos en el ADNn. ....</b>	<b>41</b>
<i>3.6.1.2.1- Defectos en subunidades estructurales y factores de ensamblaje del sistema OXPHOS .....</i>	<i>41</i>
<i>3.6.1.2.2- Defectos en el mantenimiento del ADNmt.....</i>	<i>42</i>
<i>3.6.1.2.3- Defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales .....</i>	<i>45</i>
<i>3.6.1.2.4- Alteración de la fusión y fisión mitocondrial.....</i>	<i>45</i>
<i>3.6.1.2.5- Otras alteraciones que afectan al sistema OXPHOS.....</i>	<i>45</i>
<b>3.6.2- Diagnóstico de las EM .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6.2.1- Diagnóstico genético .....</b>	<b>47</b>
<i>3.6.2.1.1- Análisis del ADNmt.....</i>	<i>47</i>
<i>3.6.2.1.2- Análisis de genes nucleares.....</i>	<i>47</i>
<i>3.6.2.1.3- Técnicas de secuenciación masiva .....</i>	<i>48</i>
<i>3.6.2.1.4- Interpretación de variantes no descritas .....</i>	<i>51</i>
<i>3.6.2.1.5- Estudio de variantes potencialmente patogénicas .....</i>	<i>52</i>
<i>3.6.2.1.6- Caracterización de variantes patogénicas .....</i>	<i>53</i>
<b>4- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1- Hipótesis .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2- Objetivos.....</b>	<b>57</b>
<b>5- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1- Pacientes .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.1- Pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial de origen en el ADNmt</b>	<b>61</b>
<b>5.1.2- Pacientes con sospecha de EM de origen en el ADNn .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.3- Pacientes portadores de la variante m.1555A&gt;G en el gen <i>MTRNR1</i>.....</b>	<b>63</b>

<b>5.2- Técnicas generales .....</b>	<b>64</b>
5.2.1- Extracción de ADN.....	64
5.2.2- Cuantificación de ADN mediante fluorometría.....	64
5.2.3- Amplificación PCR .....	64
5.2.3.1- Amplificación con la enzima Taq ADN polimerasa .....	64
5.2.3.2- Amplificación con la enzima Expand High Fidelity .....	65
5.2.4- Secuenciación convencional o Sanger .....	66
5.2.4.1- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	66
5.2.4.2- Purificación del producto de PCR.....	66
5.2.4.3- Reacción de secuencia.....	66
5.2.4.4- Purificación y secuenciación del producto de la reacción de secuencia .....	66
5.2.5- PCR larga del ADNmt (LPCR) .....	67
5.2.6- Estudio del número de copias de ADNmt mediante PCR a tiempo real (RT-PCR)..	68
5.2.7- Estudio de la secuencia del ADNmt mediante el array de resecuenciación de Affymetrix Mitochip V2.0 .....	68
5.2.8- Western blot .....	69
5.2.8.1- Preparación de las muestras.....	69
5.2.8.2- Preparación de los geles.....	69
5.2.8.3- Electroforesis.....	69
5.2.8.4- Transferencia .....	69
5.2.8.5- Inmunodetección .....	70
5.2.8.6- Análisis estadístico .....	70
<b>5.3- Secuenciación mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS).....</b>	<b>70</b>
5.3.1- Estudio del ADNmt.....	70
5.3.1.1- LPCR .....	70
5.3.1.2- Secuenciación mediante la plataforma Ion PGM .....	71
5.3.1.3- Análisis de datos .....	71
5.3.2- Secuenciación mediante la plataforma MiSeq (Illumina) .....	72
5.3.2.1- Preparación de librerías de ADNmt con el kit Nextera XT ADN Library Preparation .	72
5.3.2.2- Preparación de librerías de ADNmt con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina	72
.....	72
5.3.2.3- Preparación del pool de librerías para secuenciar en la plataforma MiSeq .....	73
<u>5.3.2.3.1- Librerías preparadas con el kit Nextera XT .....</u>	<u>73</u>
<u>5.3.2.3.2- Librerías preparadas con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina .....</u>	<u>74</u>
5.3.2.4- Secuenciación en la plataforma MiSeq.....	74
5.3.2.5- Análisis de datos .....	74
5.3.3- Estudio de genes nucleares involucrados en la replicación y mantenimiento del ADNmt	74
.....	74
5.3.3.1- Diseño de GeneRead ADNseq Targeted Panel con la tecnología GeneRead NGS System (QIAGEN) .....	75
5.3.3.2- Secuenciación en la plataforma MiSeq.....	75

5.3.3.3- Análisis de datos .....	75
5.3.3.4- Amplificación de las regiones no cubiertas.....	76
<b>5.3.4- Exoma clínico (Trusight One) .....</b>	<b>77</b>
5.3.4.1- Validación y preparación de la librería para la secuenciación.....	77
5.3.4.2- Secuenciación en la plataforma MiSeq.....	77
5.3.4.3- Análisis de datos .....	78
5.3.5- Exoma completo .....	78
5.3.5.1- Secuenciación en la plataforma NextSeq500 .....	78
5.3.5.2- Análisis de datos .....	79
5.3.6- Estudio del efecto de nuevas variantes en el ADNmt .....	79
<b>5.3.6.1- Caracterización de la variante m.3634A&gt;G en el gen <i>MTND1</i>.....</b>	<b>79</b>
<u>5.3.6.1.1- Descripción clínica del paciente .....</u>	<u>80</u>
<u>5.3.6.1.2- Generación de cíbridos transmitocondriales .....</u>	<u>80</u>
<u>5.3.6.1.3- Selección de cíbridos .....</u>	<u>83</u>
<u>5.3.6.1.4- Crecimiento celular en medio glucolítico y oxidativo.....</u>	<u>83</u>
<u>5.3.6.1.5- Determinación del potencial de membrana mitocondrial .....</u>	<u>84</u>
<u>5.3.6.1.6- Determinación de proteínas del sistema OXPHOS mediante Western Blot.....</u>	<u>84</u>
<u>5.3.6.1.7- Actividad de los complejos OXPHOS.....</u>	<u>86</u>
<b>5.3.6.2- Estudio de la variante m.4440G&gt;A en el gen <i>MTTM</i> .....</b>	<b>89</b>
<u>5.3.6.2.1-Descripción clínica del paciente .....</u>	<u>89</u>
<u>5.3.6.2.2-Microdissección por captura láser (LCM) .....</u>	<u>90</u>
<u>5.3.6.2.3-Extracción de ADN.....</u>	<u>90</u>
<u>5.3.6.2.4-Análisis de variante m.4440G&gt;A con PCR- RFLP .....</u>	<u>90</u>
<b>5.3.6.3-Estudio de las variantes en el gen <i>RNASEH1</i>.....</b>	<b>91</b>
<u>5.3.6.3.1-Descripción clínica del paciente .....</u>	<u>91</u>
<u>5.3.6.3.2-Obtención de fibroblastos a partir de biopsia de pie .....</u>	<u>92</u>
<u>5.3.6.3.3-Síntesis de la proteína <i>RNASEH1</i> humana salvaje y mutada .....</u>	<u>92</u>
<u>5.3.6.3.4-Ensayo enzimático de la proteína <i>RNASEH1</i> .....</u>	<u>96</u>
<u>5.3.6.3.5-Inducción de la depleción del ADNmt en fibroblastos y estudio de la recuperación....</u>	<u>97</u>
<u>5.3.6.3.6-Crecimiento celular en medio glucolítico y oxidativo.....</u>	<u>97</u>
<b>5.3.6.4- Caracterización de factores modificadores del fenotipo en sujetos con la variante m.1555A&gt;G en el gen <i>MTRNR1</i>.....</b>	<b>97</b>
<u>5.3.6.4.1-Secuenciación del ADNmt de pacientes con m.1555A&gt;G.....</u>	<u>97</u>
<u>5.3.6.4.2-Estudio del polimorfismo c.28C&gt;T en el gen <i>TRMU</i> .....</u>	<u>98</u>
<b>6- RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>6.1- Secuenciación masiva del ADNmt con la plataforma MiSeq. ....</b>	<b>101</b>
6.1.1- Validación de la secuenciación masiva del ADNmt .....	101
6.1.2-Confirmación de variantes patogénicas .....	101
6.1.3-Detección de variantes totales.....	102
6.1.4- Análisis de la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt .....	103
6.1.5- Optimización de la cobertura en la secuenciación del ADNmt .....	104

6.1.6- Aplicación de la secuenciación masiva del ADNmt al estudio de deleciones únicas del ADNmt .....	105
6.2- Diseño y validación de un panel de genes a la carta implicados en mantenimiento y la biogénesis del ADNmt.....	105
6.2.1- Validación del panel de genes a la carta V1.....	106
6.2.1.1- Confirmación de las variantes patogénicas .....	106
6.2.1.2- Detección de variantes totales .....	106
6.2.1.3- Análisis de la cobertura del panel .....	106
6.2.2- Optimización del panel de genes a la carta .....	107
6.2.2.1- Confirmación de las variantes .....	108
6.2.2.2- Análisis de la cobertura del panel .....	108
6.3- Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de pacientes con EM .....	109
6.3.1- Estudio del ADNmt en pacientes con EM .....	109
6.3.2- Aplicación del panel de genes en el diagnóstico de pacientes con EM y deleciones múltiples o depleción del ADNmt.....	109
6.3.3- Aplicación del exoma clínico en el diagnóstico de pacientes con EM .....	110
6.3.4- Aplicación del exoma completo en el diagnóstico de pacientes con EM.....	112
6.4- Caracterización de variantes no descritas.....	113
6.4.1- Estudio in silico de las variantes potencialmente patogénicas .....	113
6.4.2- Caracterización de la patogenicidad de la mutación m.3634A>G en el gen <i>MTND1</i> .....	114
6.4.2.1- Conservación filogenética y análisis in silico de la variante .....	114
6.4.2.2- Proliferación celular .....	115
6.4.2.3- Número de copias de ADNmt.....	115
6.4.2.4- Contenido de proteínas OXPHOS .....	116
6.4.2.5- Actividades de los complejos de la CTE .....	116
6.4.2.6- Potencial de membrana mitocondrial .....	116
6.4.3- Estudio de la mutación m.4440G>A en el gen <i>MTTM</i> .....	116
6.4.4- Estudio de las variantes c.487T>C y c.259_261del en la proteína RNASEH1. ...	118
6.4.4.1- Estudio de la actividad de la proteína RNASEH1 .....	118
<u>6.4.4.1.1- Síntesis de la proteína humana recombinante RNASEH1 salvaje y mutada.....</u>	<u>118</u>
<u>6.4.4.1.2- Ensayo enzimático de la proteína RNASEH1 .....</u>	<u>122</u>
6.4.4.2- Inducción de la depleción y recuperación del ADNmt en fibroblastos .....	122
6.4.4.3- Proliferación celular .....	123
6.5- Caracterización de variantes modificadoras del fenotipo en pacientes con la variante m.1555A>G en gen <i>MTRNR1</i> .....	124
6.5.1- Secuenciación del ADNmt de pacientes con la variante m.1555A>G .....	124
6.5.2- Estudio de la variante c.28G>T en el gen <i>TRMU</i> .....	124
6.5.3- Estudio del número de copias de ADNmt.....	125

<b>7- DISCUSIÓN .....</b>	<b>126</b>
<b>8- CONCLUSIONES .....</b>	<b>144</b>
<b>9- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>148</b>
<b>10-ANEXO .....</b>	<b>166</b>

## **2 ABREVIACIONES**





ADNg: ADN genómico  
ADNmt: ADN mitocondrial  
ADNn: ADN nuclear  
ADP: Adenina difosfato  
AGK: Acilglicerol quinasa mitocondrial  
APS: Persulfato de amonio  
ARNm: ARN mensajero  
ARNPmt: ARN polimerasa mitocondrial  
ARNr: ARN ribosomal  
ARNt: ARN de transferencia  
ATP: Adenina trifosfato  
CI: Complejo I  
CII: Complejo II  
CIII: Complejo III  
CIV: Complejo IV  
CV: Complejo V  
ADNc: ADN codificante  
CH: Cadena pesada del ADN mitocondrial  
CL: Cadena ligera del ADN mitocondrial  
CoQ<sub>10</sub>: Coenzima Q10  
COX: Citocromo C oxidasa  
CSB1,2,3: Bloque de secuencia conservada I, II o III  
CTE: Cadena de transporte de electrones  
dAMP: Deoxiadenosina monofosfato  
dCMP: Deoxicitidina monofosfato  
DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol  
DMEM: Medio modificado Dulbecco's  
dGMP: Deoxiguanosina monofosfato  
dNDPs: Deoxinucleósidos difosfato  
dNTPs: Deoxinucleósidos trifosfato  
DMEM: Medio esencial mínimo de Dulbecco  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
dTMP: Deoxitimidina monofosfato  
DTNB: Ácido 5,5' ditiobis 2 nitrobenzoico  
DTT: Ditioneitol  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
EFG1mt: Factor de elongación G1  
EFTumt: Factor de elongación mitocondrial  
EFTsmt: Factor de intercambio de nucleótidos  
EM: Enfermedad mitocondrial  
ESI: Espacio intermembrana  
FADH<sub>2</sub>: Dinucleótido de flavina y adenina reducido  
FBS: Suero bovino fetal

Fe-S: Centros hierro-azufre  
FMN: Flavin mononucleótido  
FRR: Fibra muscular rojo-rasgada  
GDP: Guanosina difosfato  
GTP: Guanosina trifosfato  
HEPES: Ácido hidroxietil piperazinetansulfónico  
IF2mt: Factor de inicio de la traducción mitocondrial 2  
IPS: Célula madre pluripotente inducida  
IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido  
KCN: Cianuro de potasio  
KSS: Síndrome Kearns-Sayre  
LB: Medio Luria Bertani  
LCR: Líquido cefalorraquídeo  
LHON: Neuropatía óptica de Leber  
LSUmt: subunidad grande del mitorribosoma  
MELAS: Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ictus  
MEMSA: Epilepsia mioclónica, miopatía y ataxia sensorial  
MERRF: Epilepsia mioclónica asociada con fibras rojas rasgadas  
MIDDS: Diabetes y sordera de herencia materna  
MILS: Síndrome de Leigh mitocondrial  
MLASA: Miopatía, acidosis láctica y anemia sideroblástica  
MM: Matriz mitocondrial  
MME: Membrana mitocondrial externa  
MMI: Membrana mitocondrial interna  
MNGIE: Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial  
NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido  
NARP: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa  
NCR: Región no codificante o región control  
NDPK: Enzima nucleósido difosfato quinasa  
NDPs: Ribonucleósidos difosfato  
NGS: Secuenciación de segunda generación  
NMPK: Enzima nucleósido monofosfato quinasa  
OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa  
PAPmt: Polimerasa polyA mitocondrial  
Pb: pares de bases  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PEG: Polietilenglicol  
PEO: Oftalmoplejía externa progresiva  
Poly: Polimerasa gamma  
POLRmt: ARN polimerasa mitocondrial  
PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RF1amt: Factor de liberación 1a  
RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica  
RNR: Enzima ribonucleótido reductasa  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RRF1mt: Factor de reciclaje del mitoribosoma 1  
RRF2mt: Factor de reciclaje del mitoribosoma 2  
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real  
SANDO: Neuropatía sensorial atáxica, disartria y oftalmoplejía  
SCAE: Ataxia espinocerebral y epilepsia  
SDM: Modelo de replicación por desplazamiento de cadena  
SDS: Sodio dodecil sulfato  
SNC: Sistema nervioso central  
SSBmt: Proteína de unión a ADN de cadena simple  
SSUmt: Subunidad pequeña del mitoribosoma  
SUCL: Enzima succinil CoA ligasa  
TA: Temperatura ambiente  
TAS: Secuencia asociada a la terminación  
TBE: Tampón tris borato con ácido etilendiaminotetraacético  
TBS: Tapón tris salino  
TE: Solución Tris 10 mM - EDTA 1 mM  
TEFM: Factor de elongación de la transcripción mitocondrial  
TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A  
TFB2M: Factor de transcripción mitocondrial B2  
TGS: Secuenciación de tercera generación  
TIM: Transportador de membrana mitocondrial interna  
TMRM: Tetrametil rodemina metil ester  
TNB: Ácido 2 nitro-5-benzoico  
TOM: Transportador de membrana mitocondrial externa  
TOP1mt: Topoisomerasa I mitocondrial  
Tris: Tris-hidroximetil-aminometano  
VDAC: Canales de aniones dependientes de voltaje



## **3 INTRODUCCIÓN**



### 3.1 La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular dinámico y muy compartimentado, presente en todas las células de los organismos eucariotas a excepción de los eritrocitos; contienen su propio genoma que codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales, el resto de las proteínas son codificadas por el genoma nuclear, sintetizadas en el citosol y transportadas a su interior por un complejo de proteínas tipo translocasas (1). El proteoma mitocondrial de mamíferos está compuesto por unas 1.500 proteínas de las cuales aproximadamente 1.100 se han podido identificar (2). En las células, las mitocondrias forman una red tubular dinámica que las mantiene interconectadas, lo que las hace más eficientes a la respuesta de señales celulares (3). El número de mitocondrias presentes en las células, dependerá de su demanda energética, variando de entre decenas a cientos.

Se han formulado diferentes teorías del origen de la mitocondria, siendo la de Lynn Margulis la más aceptada. En 1967 postuló el origen endosimbiótico de las mitocondrias (4); según esta teoría, hace 2 billones de años, células eucariotas primordiales fueron infectadas por bacterias ( $\alpha$ -proteobacterias (5) (6)) adaptadas a una atmosfera rica en oxígeno, estableciéndose entre ellas una relación de endosimbiosis, que después de miles de años se volvió permanente, haciendo que la bacteria evolucionara dentro de la célula eucariota hasta dar lugar a la mitocondria. Este proceso hizo que muchos de los genes del genoma bacteriano se perdieran o fueran traspasados al genoma nuclear, dotando al organismo eucariota del metabolismo aeróbico.

Las mitocondrias son orgánulos celulares formados por dos membranas celulares, separadas por un espacio intermembrana (ESI), que envuelven en su interior la matriz mitocondrial (MM) (7). La membrana mitocondrial externa (MME) es porosa, ya que contiene proteínas de membrana que forman poros o canales (porinas) de tipo VDAC (canales de aniones dependientes de voltaje), que la hace permeable a iones y pequeñas moléculas cargadas, el resto de moléculas más grandes, pasan al interior mediante diferentes sistemas de transporte (TOM: transportador de MME). La membrana mitocondrial interna (MMI), es rica en cardiolipina y coenzimaQ, además, permite la difusión de iones y contiene transportadores específicos de membrana (TIM: transportador de MMI) que permiten el intercambio de moléculas entre la MM y el citoplasma; la MMI forma invaginaciones (crestas mitocondriales) hacia la matriz aumentando su superficie, y en ella se integran los diferentes complejos del sistema de fosforilación oxidativa. El ESI contiene citocromo C, que además de participar en la fosforilación oxidativa, es un marcador apoptótico. En la MM se localiza el genoma mitocondrial (próximo a la MMI) y es el lugar donde se producen un gran número de procesos enzimáticos.

Las mitocondrias juegan un papel fundamental en el metabolismo celular, debido a que son la mayor fuente de producción de ATP, e integran el metabolismo intermedio de varias rutas metabólicas celulares como son la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de la urea entre otras (8); también intervienen en procesos de biosíntesis de macromoléculas como nucleótidos, lípidos, grupos hemo y centros hierro-azufre (Fe-S). Además, participa en otras funciones como la señalización celular, ya que mitocondria y citosol están en constante comunicación para coordinar la producción de energía, mediante moléculas de señalización como el calcio o las especies reactivas de oxígeno (ROS); otra de sus funciones es participar en la apoptosis celular, ya que una de las vías de activación de la apoptosis es mitocondrial, cuando hay un aumento de factores

apoptóticos en la MME, esta aumenta su permeabilidad y libera citocromo c y factores activadores de las caspasas, que acaban desencadenando el proceso de apoptosis (9).

### **3.2 ADN mitocondrial (ADNmt)**

El ADNmt o genoma mitocondrial, es una molécula circular de doble cadena formada por 16.569 pares de bases. Este genoma no contiene intrones, prácticamente toda la molécula se transcribe. Las dos cadenas del dúplex de ADNmt se diferencian en el contenido de nucleótidos de guanina o citosina, llamándose cadena pesada ( $C_H$ ) la cadena rica en guaninas y ligera ( $C_L$ ) la rica en citosinas, basándose en su separación en gradientes desnaturizantes de cloruro de cesio (10).

El ADNmt contiene 37 genes (Figura 1), de los cuales 13 codifican subunidades esenciales de 4 de los 5 complejos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), 7 son subunidades del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), 1 del complejo III (citocromo b), 3 del complejo IV (COXI, COXII y COXIII) y 2 del complejo V (ATP6 y ATP8); además codifica 2 subunidades del ribosoma mitocondrial (12S y 16S) y los 22 ARN de transferencia (ARNt) necesarios para la traducción de las 13 proteínas mitocondriales (10).

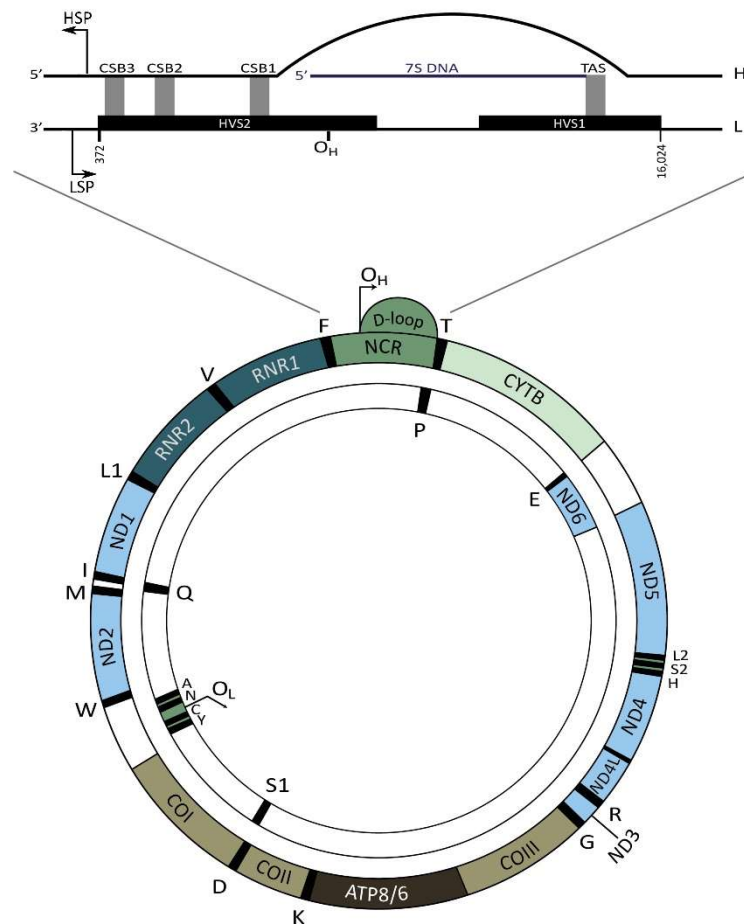
Hay dos regiones del ADNmt que no se transcriben, una de unos 30 nucleótidos que contiene el origen de replicación de la cadena L ( $O_L$ ), y otra de 1.1kb llamada región no codificante o región control (NCR); la NCR está situada entre los genes del ARNt prolina y fenilalanina y contiene los promotores de la transcripción de las dos cadenas del ADNmt (HSP para la cadena pesada y LSP para la ligera), el origen de replicación de la cadena H ( $O_H$ ), tres bloques de secuencias muy conservadas asociadas con el inicio de replicación CSB1, CSB2 y CSB3, y la secuencia asociada a la terminación (TAS) (11). La NCR incorpora una tercera cadena lineal de ADN de 650 nt, llamada 7S, que forma una estructura estable conocida como D-loop, que se extiende desde  $O_H$  hasta TAS (situado al lado del ARNt prolina); se cree que esta estructura se origina por una prematura terminación de la replicación de la cadena pesada, y se podría utilizar como posible cebador de la misma (12, 13) (Figura 1).

El número de copias de ADNmt por célula varía entre cientos y miles (14)(entre 2 y 10 moléculas de ADNmt por mitocondria). El ADNmt está organizado en complejos ADN-proteína llamados nucleoides, anclados en la cara interna de la MMI, próximos a las crestas mitocondriales (15, 16); cada nucleoide está formado por una molécula de ADNmt empaquetada con varias proteínas multifuncionales, de las cuales la mejor caracterizada es la proteína TFAM (17); TFAM además de desarrollar la función de empaquetar el ADNmt, es el factor de transcripción mitocondrial. Cada nucleoide forma un sistema autónomo de replicación del ADNmt, que se está sintetizando continuamente durante todo el ciclo celular (18).

El genoma mitocondrial presenta una tasa de mutación unas diez veces mayor que el genoma nuclear (19). Esto se debe en parte, a que se replica más a menudo que el genoma nuclear; además el ambiente intracelular donde se encuentra es más mutagénico, ya que, al estar localizado en la cara interna de la MMI, queda muy próximo al sistema OXPHOS y por tanto está más expuesto a las ROS producidas como consecuencia de su actividad. Además, se ha descrito que los mecanismos mitocondriales de reparación del ADN son menos eficientes (20) (21).



Figura 1 - Estructura del ADNmt



### 3.3 Genética mitocondrial

El ADNmt presenta características únicas que hacen que la genética mitocondrial difiera de la genética mendeliana.

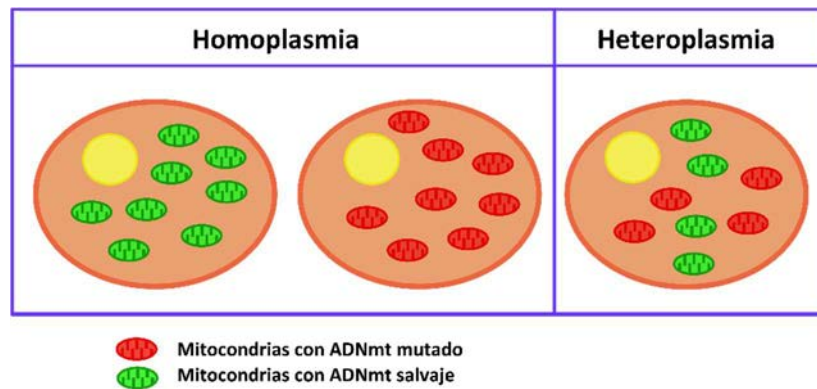
Herencia materna

Únicamente las mitocondrias (y por tanto el ADNmt) de los oocitos pasan al cigoto, lo que implica que solo las madres son capaces de transmitirlo (22). Esto sucede debido a que los oocitos contienen un elevado número de mitocondrias, y a que las mitocondrias paternas se eliminan selectivamente por ubiquitinación en el oocito fecundado, por procesos activos en los primeros estadios de división celular (23).

#### Poliplasmia

A diferencia del genoma nuclear, las células contienen muchas copias del genoma mitocondrial. Por lo general, todas las células de los individuos sanos contienen moléculas ADNmt idénticas (homoplasmia), pero pueden coexistir con moléculas ADNmt mutadas (heteroplasmia) (Figura 2) (24).

Figura 2 - Poliplasmia del ADNmt

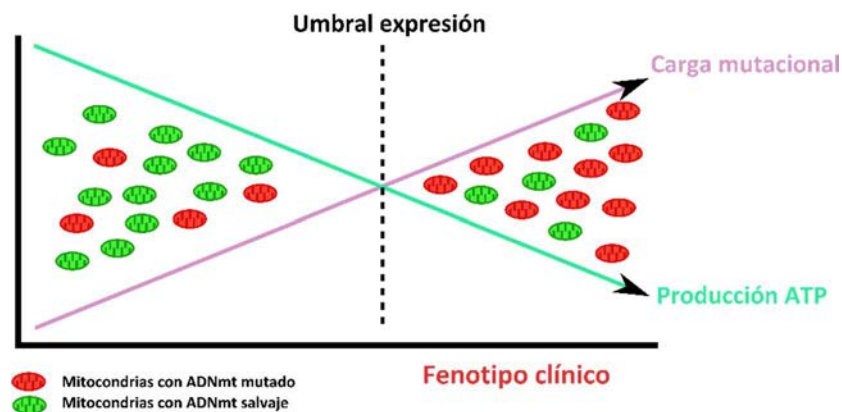


### Efecto umbral

El efecto de las variantes patogénicas en el ADNmt se manifestará cuando un tejido no pueda producir suficiente energía para su funcionamiento. Cuando el número de moléculas de ADNmt con la variante patogénica supera un cierto umbral en un tejido, la producción de ATP por el sistema OXPHOS se ve comprometida. Cuando la producción de ATP está por debajo de las necesidades del tejido, aparecen las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Figura 3).

No todos los tejidos tienen los mismos requerimientos energéticos, por lo que no se verán afectados por igual. Los tejidos más afectados son el sistema nervioso y el tejido muscular, aunque cualquier tejido puede verse perjudicado.

Figura 3 - Efecto umbral de las variantes patogénicas del ADNmt



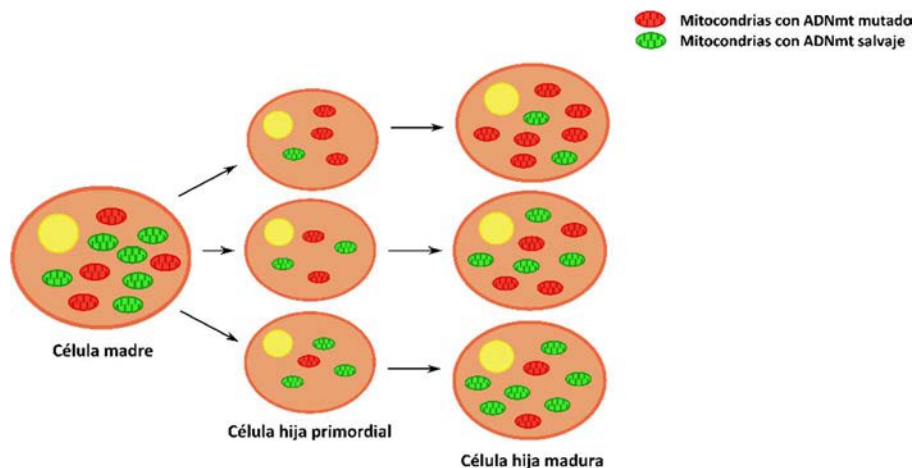
Por otro lado, los niveles de heteroplasmia pueden variar entre tejidos, siendo en general más altos en los tejidos postmitóticos, como el cerebro o el músculo, y más bajos en los tejidos mitóticos, como la sangre. Además, el hecho de que el ADNmt se esté dividiendo continuamente, incluso en tejidos postmióticos, hace que la proporción de moléculas de mtDNA salvajes y mutadas en las células, pueda variar a lo largo de la vida de un individuo, influyendo en su fenotipo.

### Segregación mitótica

Durante la división celular, las mitocondrias se reparten al azar entre las células hijas. Si hay dos poblaciones de ADNmt en las células en división, la proporción que reciban las células hijas puede ser diferente. Además, de las miles de moléculas de ADNmt presentes en las células progenitoras, solo

una pequeña proporción pasa a la descendencia, provocando el efecto de cuello de botella (25, 26); esta reducción hace que se pueda favorecer la población de moléculas de ADNmt salvaje o mutado dependiendo de la población original y del azar (Figura 4).

Figura 4 - Segregación mitótica del ADNmt



### 3.4 Expresión del ADNmt

El ADNmt contiene 13 genes que codifican subunidades que forman parte de los complejos I, III, IV y V del sistema OXPHOS, por lo que la expresión del ADNmt es esencial para su correcto funcionamiento. De las 1.500 proteínas que se estima que se encuentran en las mitocondrias, unas 250 están involucradas en la replicación del ADNmt.

La expresión del genoma mitocondrial se realiza con un grupo de proteínas diferentes de las de la maquinaria de expresión del genoma nuclear. La regulación de la expresión del ADNmt está controlada a diferentes niveles por los procesos de replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial (27).

#### 3.4.1 Replicación

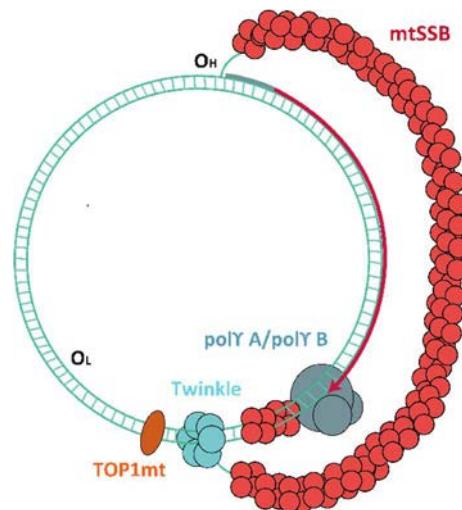
La replicación del ADNmt es el proceso mediante el cual se forman moléculas nuevas de ADNmt a partir de las moléculas molde existentes en la mitocondria. Este proceso es necesario durante la división celular o cuando las células aumentan su demanda energética. La replicación del ADNmt se produce de forma bidireccional y asincrónica.

Para llevar a cabo la síntesis de ADNmt durante la replicación, son indispensables el grupo de enzimas que forman la maquinaria de replicación o replisoma mitocondrial. Las proteínas que forman el replisoma son: la ADN polimerasa gamma (polY), helicasa mitocondrial Twinkle, ARN polimerasa mitocondrial (ARNPmt), topoisomerasa I mitocondrial (TOP1mt) y proteínas mitocondriales de unión a ADN de cadena simple (SSBmt) (Figura 5).

La enzima polY compone el núcleo de la maquinaria de replicación; polY es un heterodímero formado por una subunidad catalítica p140, codificada por el gen *POLG*, con actividad 5'-3' ADN polimerasa (con una tasa de error menor a  $1 \times 10^{-6}$  por nucleótido) (28), 3'-5' exonucleasa (necesaria para corregir los errores de replicación) y 5'dioxiribosa fosfato liasa (contribuye a la reparación por escisión de base) (29, 30) y una subunidad accesoria formada por dos proteínas p55 codificadas por el gen *POLG2*, que

se unen de manera asimétrica a la subunidad catalítica; la subunidad proximal incrementa la afinidad por la unión al ADN, y la distal acelera la incorporación de nucleótidos (31). PolY por sí sola no puede utilizar ADN de doble cadena como molde para iniciar la replicación, para ello necesita la acción de las demás enzimas de la maquinaria de replicación. Twinkle (codificada por el gen *TWINK*) tiene actividad 5'-3' ADN helicasa, lleva a cabo la rotura de los puentes de hidrogeno formados entre las dos cadenas del ADNmt, consiguiendo su desnaturalización y separación (32). La enzima TOP1mt (codificada por el gen *TOP1MT*) disminuye la tensión del superenrollamiento y la torsión del ADNmt por delante de la horquilla de replicación, haciéndolo accesible para la maquinaria de replicación (33); la ARNPmt (codificada por el gen *POLRMT*) crea el cebador de ARN necesario para que la enzima polY pueda iniciar la replicación (34); y por último, las SSBmt son proteínas de 16 kDa (codificadas por el gen *SSBP1*) que se unen a la cadena de ADN simple complementaria a la cadena molde formando un tetrámero, estabilizando durante la replicación.

Figura 5 - Maquinaria de replicación del ADNmt



El modelo de replicación del ADNmt aceptado hasta la fecha, es el de replicación por desplazamiento de cadena (SDM) (35). En este modelo, el proceso de replicación del ADNmt se inicia en el O<sub>H</sub>; durante la síntesis de la C<sub>H</sub>, la maquinaria de replicación va avanzando a medida que Twinkle va separando las dos cadenas de ADN y polY va incorporando los deoxinucleótidos complementarios a la C<sub>H</sub> molde, y la cadena complementaria a la molde va siendo cubierta por las proteínas mtSSB, para evitar que se inicie la transcripción o que se formen cebadores de ARN de manera aleatoria. Cuando se ha producido la síntesis de más o menos dos tercios de la C<sub>H</sub>, la maquinaria de replicación llega a O<sub>L</sub>; debido a la separación de las cadenas, el O<sub>L</sub> queda expuesto y adopta una conformación de horquilla o "stem loop", en ese momento es reconocido por la enzima ARNPmt que sintetiza el cebador necesario para iniciar la síntesis de la C<sub>L</sub> en sentido contrario. La replicación de las dos cadenas está interconectada, ya que es necesario que se lleve a cabo la síntesis de la C<sub>H</sub> para que se pueda iniciar la de la C<sub>L</sub>. Cuando la replicación de las dos cadenas se completa, es necesario terminar la replicación en los dos orígenes de replicación, ya que polY continuaría alargando la cadena de ADN, pero se encuentra con los cebadores de ARN que se unieron al inicio de la replicación; en este momento el cebador de ARN se desplaza y se forman intermediarios flap. En este punto, la enzima RNaseH1 elimina el cebador de ARN, con el soporte de otras enzimas como DNA2, FEN1 y MGME1, ya que RNaseH1 no es capaz de eliminar los dos últimos ribonucleótidos de los intermediarios que se han formado y solo elimina la

cadena de ARN del cebador (13). Una vez se han eliminado los intermediarios, la enzima polY actúa sobre los extremos de las dos cadenas (cortando o alargando) haciéndolos accesibles para la ADN ligasa III, que los une, acabando así el proceso de replicación (36).

Se ha descrito un modelo de replicación alternativo, es el modelo de incorporación de ribonucleótidos de la cadena retardada o RITOLS (37). Los dos modelos difieren en la manera de proteger la cadena de ADN simple complementaria al molde; en este modelo el ARN complementario producido durante la transcripción del ADNmt, cubre la cadena simple de ADN; en cambio como hemos visto antes, en el modelo de replicación SDM son las proteínas mtSSB las que realizan esta función.

### Mantenimiento del pool de nucleótidos durante la replicación

Durante la replicación es indispensable que el pool de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) esté equilibrado. Los nucleótidos utilizados durante la replicación se sintetizan “de novo” o mediante la ruta de salvamento (38) (Figura 6). La ruta de salvamento de nucleótidos mitocondriales se lleva a cabo en la matriz mitocondrial, donde se sintetizan nucleótidos a partir de nucleósidos preexistentes. En la ruta participan diferentes enzimas, que variarán dependiendo del nucleótido que se genere:

. La enzima timidina quinasa 2 (TK2, codificada por el gen *TK2*) participa en la vía de salvamento de los nucleótidos de pirimidina, concretamente interviene en la fosforilación de los deoxinucleósidos de pirimidinas, convirtiendo la deoxicitidina y la timidina en deoxicitidina monofosfato (dCMP) y deoxitimidina monofosfato (dTMP) (39).

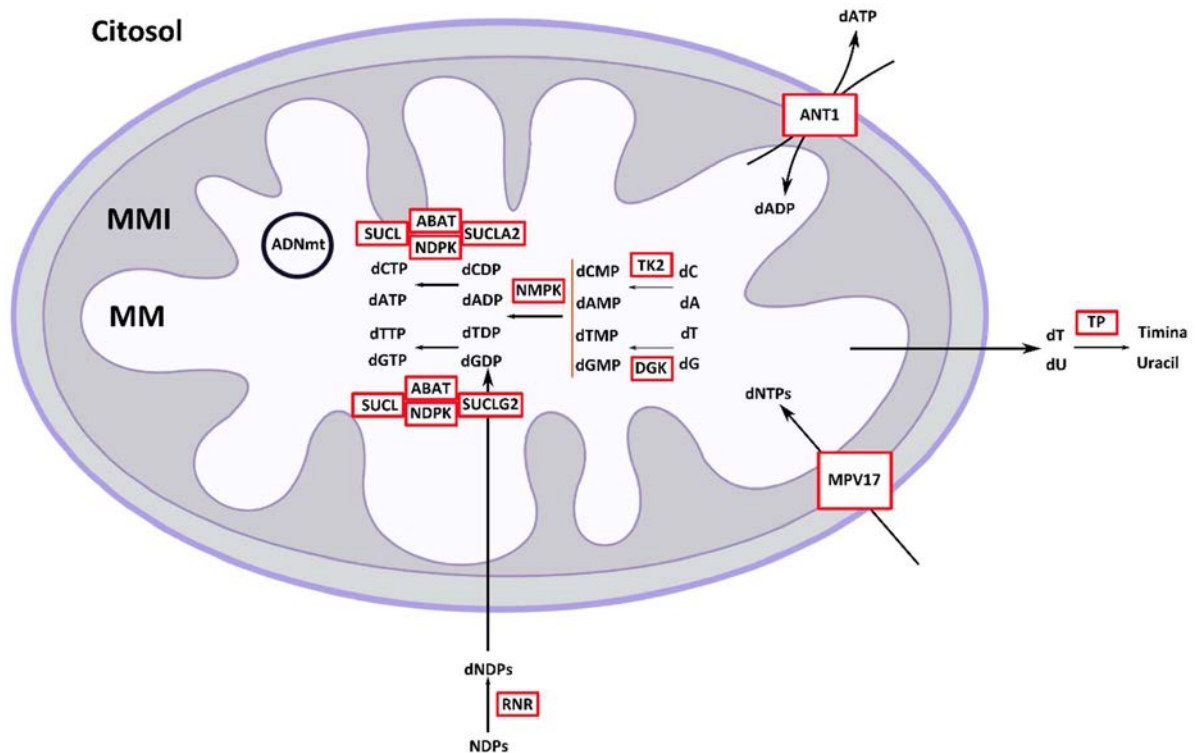
. La enzima deoxiguanosina quinasa (DGK, codificada por el gen *DGUOK*) participa en la vía de salvamento de los nucleótidos de purinas, catalizando la fosforilación de los deoxinucleósidos de purinas, que convierte la deoxiguanosina y la deoxiadenosina en deoxiguanosina y deoxiadenosina monofosfato (dGMP y dAMP) (40).

Los deoxinucleósidos monofosfato (dNMPs) se fosforilan dos veces más, la primera es catalizada por la enzima nucleósido monofosfato quinasa (NMPK) que convierte los dNMPs en deoxinucleósidos difosfato (dNDPs), y la segunda realizada por la nucleósido difosfato quinasa (NDPK, codificada por el gen *NME4*) convierte los dNDPs en dNTPs.

La proteína NDPK, forma un complejo enzimático junto la enzima succinil CoA ligasa (SUCL codificada por el gen *SUCLG1*) y Y-aminobutirato transaminasa (GABAT codificada por el gen *ABAT*) (41). SUCL además de participar en la ruta de salvamento de los nucleótidos, también lo hace en el ciclo de Krebs, y está formada por una subunidad  $\alpha$ , codificada por el gen *SUCLG1*, y por una subunidad  $\beta$ , codificada por *SUCLA2* o *SUCLG2*. La enzima SUCL cataliza la conversión succinil\_CoA + dADP o dGDP a succinato + dATP o dGTP; cuando la subunidad  $\alpha$  forma dímero con la subunidad  $\beta$  codificada por *SUCLA2*, la enzima transforma dADP en dATP, en cambio cuando forma dímero con la subunidad  $\beta$  codificada por *SUCLG2*, la enzima transforma GDP en GTP (42). GABAT, al igual que SUCL, tiene una función dual, ya que además de catabolizar el principal neurotransmisor inhibitor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en la matriz mitocondrial, se ha visto que interactúa con NDPK, interviniendo de alguna manera en el metabolismo de nucleótidos (41).

Por último, la enzima timidina fosforilasa (codificada por el gen *TYMP*) participa en la vía de salvamento de dNTPs citosólica, ya que cataliza la conversión de timidina y deoxiuridina en timidina y uracilo en el citosol (43).

Figura 6 - Mantenimiento del pool de nucleótidos durante la replicación



Cuando los nucleótidos producidos por la ruta de salvamento no cubren la demanda mitocondrial, se importan los nucleótidos sintetizados “de novo” en el citosol, ya que no se pueden producir nucleótidos “de novo” en el interior de las mitocondrias. La síntesis de nucleótidos “de novo” está regulada por el ciclo celular. En esta vía, la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) cataliza la reducción de ribonucleósidos difosfato (NDPs) a dNDPs; la enzima está formada por dos subunidades catalíticas R1 y otras dos pequeñas R2 o p53R2 (codificada por el gen *RRM2B*). Cuando las células están en la fase S, la subunidad R1 se asocia con R2, en cambio, en células post-mitóticas R1 se asocia con p53R2; por tanto, el heterodímero R1/R2 proveerá de dNTPs durante la síntesis de ADN a las células en división y R1/p53R2 a las células quiescentes (44, 45).

Los dNTPs sintetizados en el citosol se importan a la matriz mitocondrial; en este intercambio tienen un papel fundamental los translocadores mitocondriales de dNTPs. La proteína ANT1 (codificada por el gen *SLC25A4*), se sitúa en MMI que forma un canal a través de ella, permitiendo la entrada ADP a la matriz y la salida de ATP fuera de la mitocondria, se expresa sobre todo en células post-mitóticas, como músculo esquelético o cardíaco y cerebro, tiene un papel central en la bioenergética celular, ya que regula proporción ADP/ATP que entra y sale de la mitocondria, es una de las proteínas más abundantes de la MMI y se une a los lípidos de MMI, cardiolipina y ácido fosfatídico (46) (47).

La enzima AGK (acilglicerol quinasa mitocondrial) participa en la síntesis de lípidos de membrana, como el ácido fosfatídico, y este a su vez en la síntesis de fosfolípidos de membrana como la cardiolipina; indirectamente AGK participa en la entrada de nucleótidos a la mitocondria, ya que participa en la síntesis de los fosfolípidos a los que se une ANT1. MPV17 es una proteína localizada en la MMI, formando canales que permiten importar los dNTPs del citosol a la mitocondria (48).

### 3.4.2 Transcripción

En la transcripción del ADNmt se producen dos largos transcritos primarios de ARN policistrónico sin procesar, que abarcan toda la información de los ARNm, ARNt y ARNr de cada cadena del ADNmt (49). Este proceso es bidireccional y se origina desde dos promotores únicos de transcripción situados en la región control; LSP es el promotor de la transcripción de la cadena ligera y HSP de la pesada (50). Los transcritos primarios son procesados para dar lugar a moléculas individuales de ARN, ya que su estabilidad sin procesar es baja, por ello a medida que se va produciendo la transcripción van siendo procesados (49).

El proceso de transcripción se realiza en 3 etapas: inicio, elongación y terminación. En la etapa inicial, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) se une al ADN justo por delante de los promotores de inicio de la transcripción, esto genera una curvatura en el ADN y el reclutamiento de la ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) en la zona de los promotores. Al unirse al ADN, POLRMT sufre un cambio conformacional que permite la unión del factor de transcripción mitocondrial B2 (TFB2M); en este momento queda ensamblado el complejo de inicio de la transcripción (51)(52). La extensión de los transcritos empieza cuando el factor de elongación de la transcripción mitocondrial (TEFM) interactúa con POLRMT, estimulando su interacción con el molde ADN:ARN que se debe extender. En el caso de la transcripción de la cadena ligera, TEFM ayuda a la POLRMT a sobrepasar el bloque de secuencia conservada II (CSBII) de la región control, haciendo posible la síntesis del transcrito policistrónico completo (53)); cuando TEFM no está presente, la transcripción acaba en CSBII, generando los cebadores necesarios para el proceso de replicación de ADNmt (54).

El transcrito policistrónico producido durante la transcripción es cortado para liberar los diferentes tipos de ARNs. La mayoría de los ARNm y ARNr, están flanqueados por ARNt, lo que permite su escisión mediante las enzimas RNasaP (corta los extremos 5') y ELAC2 (corta los extremos 3'), tal y como explica el modelo de puntuación de los ARNt (55).

Los ARNm a excepción del ARNm del gen ND6, sufren una poliadenilación de entre 30 y 40 nucleótidos en su extremo 3' por la polimerasa polyA mitocondrial (PAPmt) (56); por último, muchos de los ARNt sufren modificaciones como tiolaciones o pseudouridilaciones, que permite añadirles la secuencia CCA en el extremo 3' para poder ser acetiladas por las aminoacil ARNt sintetasas mitocondriales y que se les pueda unir su aminoácido específico (57).

### 3.4.3 Traducción

Los ARN mensajeros (ARNm) que se forman durante el procesamiento de los transcritos primarios, necesitan ser traducidos por el mitoribosoma para dar lugar a nuevas proteínas mitocondriales. El código genético mitocondrial es diferente al código universal.(58-60)

La traducción mitocondrial está dividida en 4 etapas: inicio, elongación, terminación y reciclaje (61). La traducción se inicia, cuando el factor de inicio 2 (IF2mt) ligado a GTP, se une a la subunidad pequeña

del mitoribosoma (SSUmt) que a su vez está unida al factor de inicio 3 (IF3mt); este complejo es capaz de reclutar al ARNm y al ARNt formilado cargado con el aminoácido metionina (parte de la metionina es formilada para el inicio de la síntesis de proteínas (62)) en el sitio P de la subunidad grande del mitoribosoma (LSUmt); la liberación de la metionina en el sitio P, promueve la hidrólisis del GTP y la liberación de los dos factores de inicio, con lo que las dos subunidades de mitoribosoma son capaces de unirse; en este momento la cadena polipeptídica iniciará su elongación, en este proceso es necesario que el factor de elongación mitocondrial (EFTumt) se una al GTP y al ARNt unido con su correspondiente aminoácido en el sitio A; si la interacción entre codón-anticodón es correcta, se produce la hidrólisis del GTP y se libera el EFTumt, el factor de intercambio de nucleótidos (EFTsmt) intercambia el GDP del EFTumt por GTP; la liberación del EFTumt, a su vez cataliza la formación de la unión peptídica entre el aminoácido inicial y el que se añade de nuevo, con lo que el ARNt sin aminoácido, pasa al sitio P y el sitio A será ocupado por un nuevo ARNt cargado, con lo que se irá formando la cadena de aminoácidos; la interacción del factor de elongación G1 (EFG1mt) con el mitoribosoma, promueve cambios conformacionales que liberan el ARNt del sitio P al E, con lo que el nuevo ARNt localizado en el sitio A puede pasar al sitio P, elongando así la cadena polipeptídica hasta que el codón de terminación entra en el sitio A (63); cuando esto ocurre, es detectado por el factor de liberación 1a (RF1amt), que cambia su conformación para hidrolizar el enlace ester entre el ARNt y el último aminoácido de la cadena, permitiendo su liberación. Por último, los dos factores de reciclaje RRF1mt y RRF2mt promueven la disociación del mitoribosoma y la liberación del ARNm y ARNt descargado; además para evitar una reasociación prematura, la SSUmt permanece unida a IF3mt.

#### **3.4.4 Mantenimiento del proteoma mitocondrial**

El mantenimiento del proteoma mitocondrial es fundamental para la síntesis y el mantenimiento del ADNmt. Las mitocondrias mantienen el proteoma intercambiando su contenido con el citosol o con otras mitocondrias; estos orgánulos son dinámicos y móviles, además están en constante fusión y división, lo que les permite controlar su morfología y su distribución proteica entre la red mitocondrial. El proceso de fusión de mitocondrias implica la fusión entre la MME y la MMI, proceso en el cual están implicados 3 grandes grupos de enzimas GTPasas: las mitofusinas 1 y 2 (codificadas por los genes *MFN1* y *MFN2*) son proteínas de MME y participan en los primeros pasos de la fusión de la MME; OPA1 es una proteína de MMI y participa en su fusión (64); FBXL4 está situada en el espacio intermembrana, esta proteína es esencial en la formación de la red mitocondrial y además se cree que puede tener un papel en los procesos de fusión mitocondrial por su interacción y regulación con otras proteínas mitocondriales de fusión (65).

### **3.5 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)**

La fosforilación oxidativa es el proceso final del metabolismo energético aeróbico, ya que acopla la respiración celular a la producción de ATP.

El sistema OXPHOS, está situado en la MMI, y constituye la principal fuente de producción del ATP celular, produciendo en condiciones normales el 80% del ATP requerido por las células, el resto será producido principalmente por la degradación anaeróbica de sustratos citosólicos vía glucólisis (66).

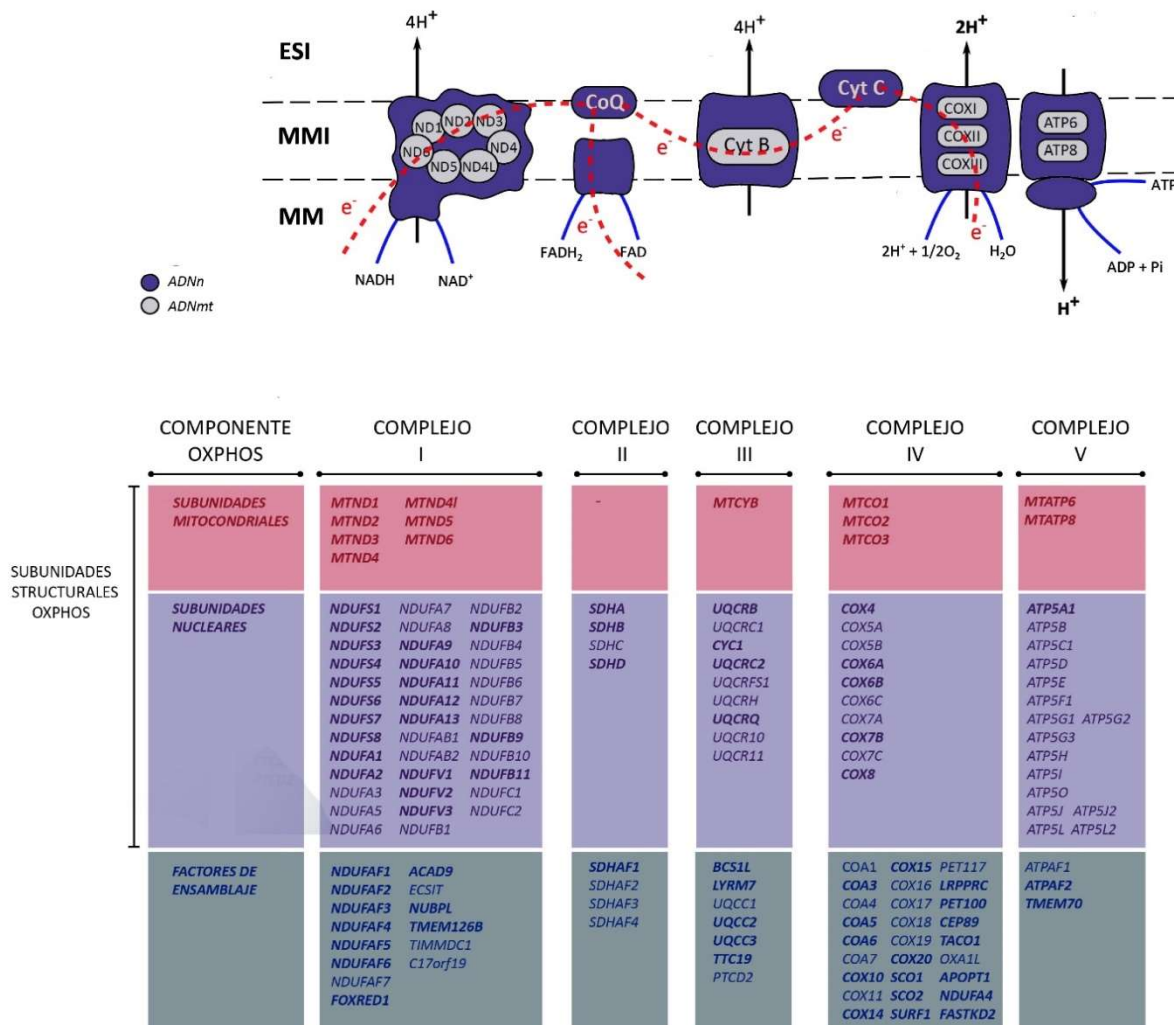
El sistema OXPHOS está formado por 5 complejos y dos proteínas transportadoras móviles de electrones, la ubiquinona o Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) (situada en la MMI) y el citocromo C (CitC) (localizado



en la MMI expuesto a la MM) (67, 68). Los 4 primeros complejos forman la cadena de transporte de electrones (CTE), que se acopla al complejo V, el cual es responsable de generar ATP, para formar el sistema OXPHOS completo.

El sistema OXPHOS está formado por 74 subunidades, 13 de ellas están codificadas por el ADNmt, el resto son subunidades nucleares que se sintetizan en el citosol y son transportadas al interior de las mitocondrias. Además, son necesarios 36 factores para el ensamblaje de los complejos (Figura 7).

Figura 7 - Estructura del sistema OXPHOS



\* En los genes que aparecen en negrita, se han descrito mutaciones patogénicas asociadas a enfermedad mitocondrial

Los 5 complejos del sistema OXPHOS son:

- **Complejo I (CI) o NADH:ubiquinona oxidoreductasa:** es el complejo de mayor tamaño (1.000 KDa). Está formado por 44 subunidades, 7 de las cuales están codificadas por el ADNmt; el núcleo del complejo está formado por 14 subunidades conservadas y es donde se sitúan todos los componentes redox (1 flavín mononucleótido (FMN), 8 centros Fe-S y 1 o 2 proteínas de unión a la ubiquinona) (69, 70) y se catalizan las reacciones de intercambio de energía, mientras que el resto de subunidades son accesorias; además se necesitan 11 factores de ensamblaje para su formación (71). El complejo

adquiere forma de L debido a la disposición de las subunidades que forman el núcleo, su brazo hidrofílico se localiza en la MM y el lipofílico está inmerso en la MMI (72).

El CI oxida el NADH a NAD<sup>+</sup> y transporta los electrones liberados a la CoQ10 mediante los centros Fe-S (73). Este complejo es el mayor productor de especies reactivas de oxígeno (74).

- **Complejo II (CII) o succinato:ubiquinona oxidoreductasa:** es el único complejo codificado íntegramente por el genoma nuclear; está formado por 4 subunidades, dos de las cuales (SDHC y SDHD) forman la parte insoluble y están inmersas en la MMI y las otras dos (SDHA y SDHB) constituyen la parte soluble localizada en la MM; además, se necesitan 4 factores de ensamblaje para su formación. Contiene también, 1 FMN, 3 centros Fe-S y 1 grupo hemo. El CII oxida el FADH<sub>2</sub> que proviene de la beta oxidación, a FAD transfiriendo sus electrones a la CoQ10.

Este complejo, además de participar en la fosforilación oxidativa, es una enzima del ciclo de Krebs, donde metaboliza el succinato a fumarato.

- **Complejo III (CIII) o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa:** está compuesto por 11 subunidades, de las cuales 1 está codificada por el ADNmt, tiene un tamaño de 240 kDa (75). Necesita 2 factores de ensamblaje para su formación. Las 3 subunidades forman el núcleo del complejo. Además, contiene 2 grupos hemo y 1 centro Fe-S (76). El complejo recibe los electrones de la CoQ10 y los transfiere al citocromo C.

- **Complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa:** está formado por 14 subunidades, 3 de ellas codificadas por el ADNmt. Son necesarios 18 factores de ensamblaje para su correcta formación. Contiene 4 centros redox, formados por átomos de hierro, cobre, zinc y magnesio. El complejo está insertado en la MMI en forma de dímero; cada monómero de 200 kDa contiene un núcleo, formado por las 3 subunidades codificadas por el ADNmt, que están rodeadas por el resto (66).

Es el último receptor de electrones de la CTE, recibe los electrones del citocromo C y los transfiere al oxígeno molecular, reduciéndolo hasta formar agua.

Los complejos I, III y IV utilizan la energía liberada del transporte de electrones para translocar protones de la MM al EI, con lo que se forma un flujo de protones en la MMI, que genera un gradiente electroquímico a través de la MMI.

Se han propuesto dos modelos sobre la interacción y organización de los complejos de la CTE (77): el modelo fluido, donde los complejos difunden libres a través de la MMI y la transferencia de electrones es aleatoria; y el modelo sólido, que apoya la formación de supercomplejos estables formados por los complejos I, III y IV, también llamados respirasomas (78, 79).

- **Complejo V (CV) o F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintasa:** está formado por 19 subunidades (550 kDa), de las cuales 2 son mitocondriales; además necesita 4 factores de ensamblaje para su formación.

Las subunidades que constituyen el complejo forman dos motores rotatorios F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub> que permiten acoplar el flujo de protones generados por la CTE, a la formación de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico. Su función es reversible, ya que es capaz de hidrolizar ATP y expulsar protones al ESI en condiciones en que el flujo de protones no se genera adecuadamente.

El bloque  $F_0$  está insertado en la MMI, mientras que el  $F_1$  está en la MM; este complejo utiliza el gradiente electroquímico establecido en la MMI para promover la fosforilación de ADP con el fin de producir ATP.  $F_0$  forma un canal a través del cual los protones del EI regresan a la MM, este flujo de protones promueve la rotación de la  $F_1$ , la energía de esta rotación se utiliza para la síntesis de ATP (80).

El sistema OXPHOS recibe los intermediarios energéticos de varias vías del metabolismo energético en la producción de energía; ya que mediante el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación, los carbohidratos y los ácidos grasos, son oxidados y producen NADH y  $FADH_2$ , estos son capaces de transferir sus electrones a los CI y CII respectivamente, que a su vez los donarán a la CoQ10, que lo hará al CIII, este al CIV que los cederá al oxígeno molecular produciendo agua. El flujo de electrones está acoplado al bombeo de protones de la MM al ESI, que genera un gradiente electroquímico a través de la MMI, lo que proporciona la energía libre necesaria para que el CV sintetice ATP.

Mediante la fosforilación oxidativa se producen unas 30 moléculas de ATP por cada glucosa, a diferencia de los 2 ATP que se obtiene mediante la glucólisis.

La producción de energía mediante esta vía requiere el continuo importe de ADP y fósforo inorgánico del citosol a la MM; además, el ATP generado que no se utiliza en la mitocondria es transportado fuera del orgánulo mediante translocadores de adenina (81).

### **3.6 Enfermedades mitocondriales (EM)**

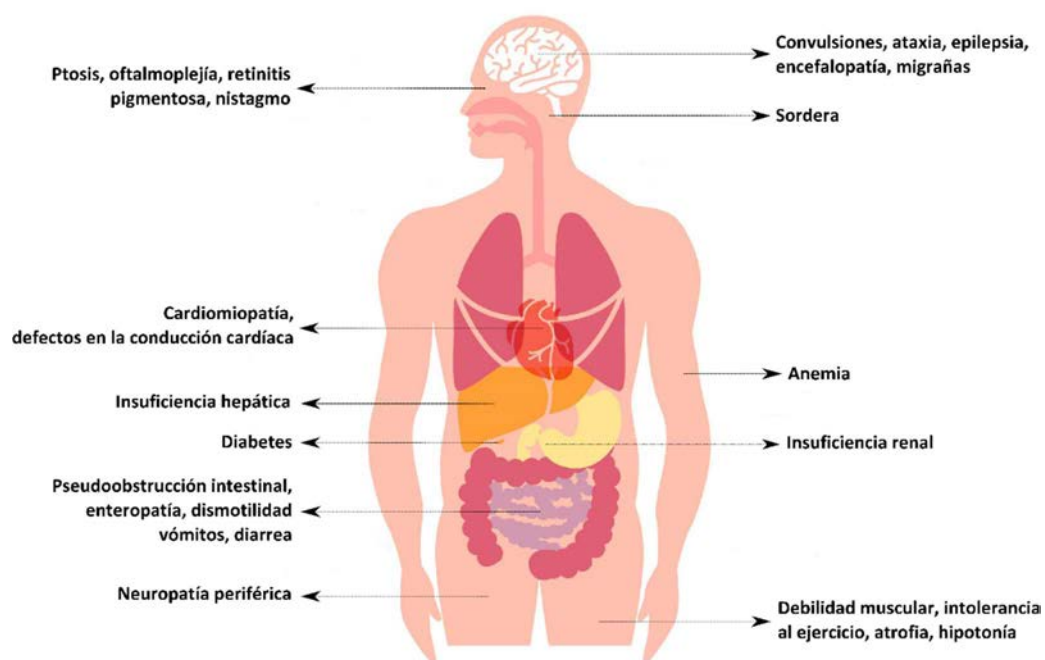
Las EM tienen una incidencia mínima de 1 de cada 5.000 nacimientos (82). Las EM primarias, se definen como síndromes que tienen un impacto en la estructura o función de la mitocondria, que en su mayoría derivan directa o indirectamente en la disfunción del sistema OXPHOS (83); además, pueden aparecer EM secundarias producidas por daño en las mitocondrias a lo largo del tiempo, por la influencia de factores externos (84). La prevalencia mínima de las EM es de 12.5/100.000 en adultos y de 5/100.000 en niños (85).

El término EM abarca un grupo muy heterogéneo de síndromes y fenotipos clínicos, en los cuales los tejidos y órganos más vulnerables son aquellos con altos requerimientos energéticos, como por ejemplo el cerebro o músculo, más dependientes de la producción de energía mediante el sistema OXPHOS (86) (Figura 8). Asimismo, las manifestaciones clínicas pueden afectar a un solo órgano o a varios a la vez, siendo las manifestaciones multiorgánicas las más comunes, sobre todo en órganos presuntamente no relacionados (87). El grado de heterogeneidad de las EM es tal, que una mutación (igual o diferente) en el mismo gen pueden generar diferentes fenotipos clínicos, o mutaciones en diferentes genes causan la misma sintomatología clínica; algunos ejemplos son la variante patogénica m.3243A>G, que se ha descrito tanto en pacientes con encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular (MELAS), como con diabetes, sordera o retinopatía; o el fenotipo de oftalmoplejía externa progresiva (PEO) con depleción o delecciones múltiples del ADNmt que se ha asociado a su vez, a alteraciones en los genes *POLG*, *OPA1* o *TWNK* entre otros (88, 89). A toda esta heterogeneidad, se suma el hecho de que los primeros síntomas

pueden aparecer a cualquier edad, desde el nacimiento hasta la vejez, y su severidad puede ser variable (90).

Se han descrito diferentes síndromes clínicos específicos, con características fenotípicas comunes entre los pacientes, aunque también pueden no presentar un síndrome específico, sino una serie de alteraciones que hacen sospechar de que puedan estar afectados por una EM. Algunas de estas alteraciones son: combinación de síntomas neuromusculares con otros no neuromusculares; curso progresivo de la enfermedad; afectación de diferentes órganos aparentemente no relacionados; intolerancia al ejercicio por fatiga prematura en actividades físicas leves; calambres y rigidez muscular y niveles elevados de lactato en reposo (91). Además hay presentaciones fenotípicas características como acidosis láctica, miopatía, sordera, ceguera, neurodegeneración, dismotilidad intestinal y neuropatía periférica (92); siendo el retraso en el desarrollo, regresión motora, encefalopatía metabólica, convulsiones y cardiomiopatía, predominantes en niños, e intolerancia al ejercicio, sordera neurosensorial, anomalías oftalmológicas, ptosis, oftalmoplejía externa progresiva, debilidad muscular, afectación del SNC, manifestaciones cardíacas, anomalías del sistema gastrointestinal y endocrino, más frecuente en adultos (93).

*Figura 8 - Afectación multisistémica de las EM*



Debido a que, por lo general no hay correlación entre fenotipo y genotipo en los pacientes con sospecha de EM, en la mayor parte de los casos es difícil realizar un diagnóstico molecular definitivo; este diagnóstico es muy importante para ayudar a llevar a cabo consejo genético a las familias que lo necesitan, ya que en muchos casos las EM son fatales en niños; de igual forma, este diagnóstico es fundamental para enfocar el tratamiento más adecuado a los pacientes. Algunas de las EM se pueden tratar, como los defectos en la biosíntesis de la CoQ<sub>10</sub> (94); aunque la mayoría de EM no tienen aún tratamiento, se están desarrollando diversas terapias como la administración de antioxidantes, el reemplazo enzimático o la administración de nucleósidos (95), el trasplante con células

hematopoyéticas (96), incluso la posible aplicación de la terapia génica y el trasplante de mitocondrias, como potencial vía de prevención, tratamiento o cura de las EM (97, 98).

### 3.6.1 Clasificación de las EM

Las EM se pueden clasificar en dos grandes grupos según el origen del defecto genético que las causan. Por tanto, podemos diferenciar entre EM causadas por defectos primarios en el ADNmt y EM producidas por defectos en el ADNn.

#### 3.6.1.1 EM debidas a defectos en el ADNmt

Los defectos primarios en el ADNmt están causados por mutaciones puntuales, pequeñas inserciones o deleciones y grandes deleciones únicas (99). Las EM debidas a defectos en el ADNmt pueden seguir un patrón de herencia materna o pueden aparecer de forma esporádica. Debido a la presencia del efecto de cuello de botella durante la embriogénesis, el patrón de herencia de estas enfermedades no siempre es evidente, ya que la proporción de ADNmt mutado que se hereda es aleatorio (100). Si el porcentaje de moléculas de ADNmt mutado heredado es bajo, puede que no se manifieste el fenotipo clínico, hecho que dependerá del umbral de expresión de la enfermedad en el tejido (101). Además, a lo largo de la vida de los individuos aparecen diferentes presiones selectivas, que hacen que la proporción de moléculas de ADNmt mutado pueda cambiar haciendo que el fenotipo clínico empeore (102).

Se ha estimado que 1 de cada 200 nacidos vivos son portadores de una variante patogénica en el ADNmt (103), aunque solo 1 de cada 5.000 expresan fenotipo clínico de EM (104).

Debido a la elevada tasa de mutación del ADNmt, pueden aparecer mutaciones esporádicas somáticas en determinados tejidos. Estas mutaciones por expansión clonal, pueden alcanzar proporciones suficientes para superar el umbral de expresión del fenotipo clínico en los tejidos, causando disfunción mitocondrial con la edad (105).

En algunos casos la sintomatología de los pacientes se puede asignar a síndromes mitocondriales determinados, aunque también puede ocurrir un solapamiento de síntomas y variabilidad en el curso y gravedad de la enfermedad.

##### 3.6.1.1.1 *Mutaciones puntuales*

Se han descrito mutaciones puntuales patogénicas (incluidas pequeñas inserciones y deleciones) en los 37 genes mitocondriales (Figura 9). Actualmente hay 31 variantes descritas y confirmadas como patogénicas en los ARNt y ARNr, y 40 en genes que codifican subunidades proteicas del OXPHOS, aunque hay más de 300 variantes descritas (<https://www.mitomap.org>).

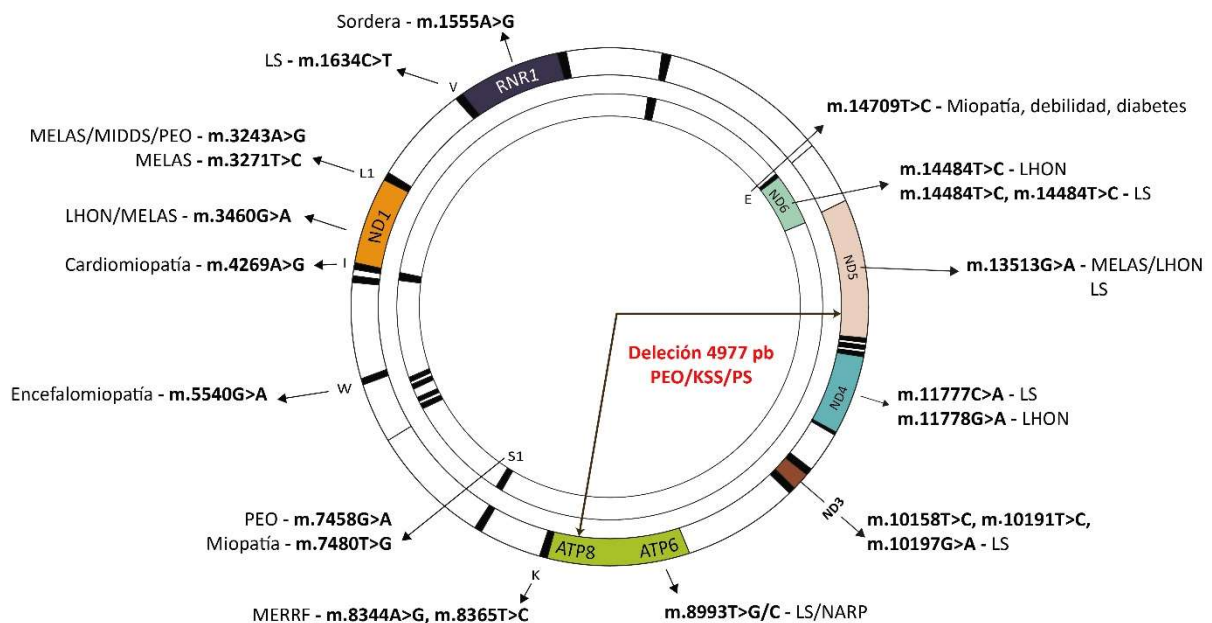
Normalmente, las variantes patogénicas suelen ser heteroplásmicas y provocan una gran variedad de fenotipos mitocondriales; aunque algunas son muy comunes y se pueden asociar a determinados síndromes mitocondriales clínicos. Cuando las variantes patogénicas aparecen en homoplasmia, es frecuente que solo se vea afectado un tejido y se observa penetrancia incompleta (106).

Podemos clasificar las mutaciones en el ADNmt en dos grupos, según el tipo de gen mitocondrial afectado

### Mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales

Dado que los genes que codifican proteínas mitocondriales, son subunidades del sistema OXPHOS, es común que mutaciones patogénicas en ellos causen deficiencias aisladas de los complejos OXPHOS a los que pertenecen (CI, CIII, CIV o CV). Los síndromes mitocondriales más característicos se describen a continuación.

Figura 9 - Variantes patogénicas descritas en el ADNmt



\* PEO: oftalmoplejía externa progresiva crónica, LHON: neuropatía óptica de Leber, LS: Síndrome de Leigh, MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de tipo accidente cerebrovascular, MERRF: epilepsia mioclónica y fibras rojo rasgadas, MIDDS: diabetes y sordera de herencia materna, NARP: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa.

### - Neuropatía óptica de Leber (LHON)

La enfermedad de LHON afecta específicamente al nervio óptico y las células ganglionares de la retina. Los pacientes sufren una neuropatía óptica bilateral con atrofia óptica, defectos en el campo visual y pérdida de visión central unilateral indolora, que normalmente se convierte en bilateral en pocos meses. Los síntomas suelen aparecer en adultos jóvenes y es más frecuente en hombres que en mujeres (107). Las variantes causantes del fenotipo, normalmente se encuentran en homoplasmia y presentan penetrancia incompleta.

El 95-90 % de los casos están causados por una de las 3 variantes patogénicas más frecuentes m.3460G>A (*MTND1*), m.11779G>A (*MTND4*), y m.14484T>C (*MTND6*) (108), pero existen una veintena de variantes patogénicas secundarias descritas en los 7 genes que codifican las subunidades mitocondriales del CI.

### - Síndrome de Leigh mitocondrial (MILS) y Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)

La enfermedad de Leigh mitocondrial, es la presentación clínica más común y característica de las EM pediátricas. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por lesiones en los ganglios basales, tálamo, tronco encefálico, y menos frecuente, cerebelo. Los síntomas suelen aparecer antes de los dos años de vida, siendo los casos adultos muy raros. Entre las características clínicas más comunes están, retraso en el desarrollo y regresión motora, convulsiones, ataxia, distonía, hipotonía, neuropatía periférica, atrofia óptica, fallo respiratorio y vómitos; la enfermedad suele ser fatal ya que los pacientes no suelen sobrevivir a la niñez. Bioquímicamente, presentan niveles altos de lactato y piruvato, en sangre y líquido cefalorraquídeo (109). La causa más común, es la mutación m.8993T>G/C en el gen *MTATP6* (110) en niveles de heteroplasmia por encima del 90% en ADN de músculo, aunque se han descrito mutaciones en los genes que codifican subunidades proteicas del CI y CIV, además de otras en algunos ARNt. Sin embargo, también pueden estar producido por variantes patogénicas en genes nucleares.

Cuando los porcentajes de la mutación m.8993T>G/C están entre el 70 y 90% en ADN de músculo (111), aparece un fenotipo menos severo, conocido como NARP; los primeros síntomas pueden aparecer desde la infancia hasta edad adulta y se caracterizan por desarrollar neuropatía periférica, ataxia, retinitis pigmentosa, debilidad muscular, convulsiones, demencia y retraso en el desarrollo (112).

### Mutaciones en los ARNt y ARNr mitocondriales

Las mutaciones que afectan a estos genes, pueden alterar la síntesis de las 13 proteínas mitocondriales, lo que puede implicar una afectación múltiple de la actividad de los complejos OXPHOS. Los casos más severos, se han asociado a variantes en heteroplasmia y suelen afectar al SNC o causar miopatía (113).

### - Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ictus (MELAS - Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke)

Este síndrome se caracteriza por encefalomiopatía, acidosis láctica, episodios tipo ictus recurrentes y transitorios a edades tempranas (antes de los 40 años) que provocan disfunción cerebral, demencia y convulsiones; además pueden presentar vómitos, migraña, diabetes, cardiomiopatía, sordera neurosensorial, retinitis pigmentosa y ataxia cerebelar (114). La biopsia muscular de los enfermos, evidencia fibras rojo rasgadas (FRR). Normalmente, la actividad del CI está afectada, aunque también lo puede estar la del CIV.

La causa molecular son mutaciones puntuales en el ARNt leucina (UUR) en el gen *MTTL1*; el 80% de los casos se deben a la mutación m.3243 A>G (115), pero se han encontrado mutaciones en los genes de las subunidades del CI y CIV, en otros ARNt o en diferentes posiciones del ARNt leucina. Las variantes patogénicas se han descrito en heteroplasmia.

Aunque la mutación m.3243 A>G produce mayoritariamente MELAS, se han detectado también en pacientes con PEO, miopatía aislada, cardiomiopatía o diabetes mellitus de herencia materna con ceguera cuando los porcentajes de mutación son bajos (alrededor del 30% en ADN de sangre periférica) (116).

#### - Epilepsia mioclónica asociada con fibras rojas rasgadas (MERRF - Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers)

MERRF es un trastorno neurodegenerativo grave, que suele aparecer en la infancia o en edad adulta temprana después de un desarrollo normal. La característica más significativa es la presencia de epilepsia mioclónica, que normalmente progresa en un cuadro clínico mixto de debilidad muscular, ataxia, convulsiones generalizadas, miopatía con FRR y fibras COX-, sordera, neuropatía, demencia y atrofia óptica (114). Además, hay una disminución en la actividad del CIV y a veces del CI.

El 80% de los pacientes presentan la mutación m.8344A>G en el ARNt lisina (gen *MTTK*) (117) en heteroplasmia, pero se han descrito otras mutaciones en el mismo gen, otros ARNt o en *MTND5*.

#### - Oftamoplejía externa progresiva (PEO)

Es uno de los síndromes de aparición adulta más comunes, y está caracterizado por una oftalmoplejía externa o parálisis progresiva de los músculos del ojo que altera su movimiento y provoca ptosis bilateral; además es muy común detectar miopatía proximal, fatiga y defectos en la conducción cardíaca (106).

Se han descrito mutaciones puntuales los ARNt isoleucina, alanina o la mutación m.3243A>G en el ARNt leucina (también asociada al síndrome de MELAS) (118).

#### - Sordera neurosensorial no sindrómica asociada a aminoglicósidos

Es un tipo de sordera neurosensorial bilateral postlingual, causada por la variante patogénica m.1555A>G en homoplasmia, en el gen que codifica la subunidad 12S del ARNr (*MTRNR1*); los pacientes presentan una severidad variable, desde una pérdida leve a total de la audición, pero irreversible(119). Este tipo de sordera se ha asociado a la administración de antibióticos de tipo aminoglicósidos (120) como la gentamicina, tobramicina, ampicacina, canamicina o estreptomina (121); la mutación m.1555A>G, afecta una región muy conservada del gen *MTRNR1*, esta región es homóloga al dominio bacteriano de unión a los aminoglicósidos. Esta variante patogénica, hace que la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial humano se asemeje al bacteriano y se vea afectado por este tipo de antibiótico. Sin embargo, se ha visto afectación no relacionada con la exposición a estos antibióticos (122). Esta variante presenta penetrancia incompleta, se ha postulado que existen factores modificadores del fenotipo, como algunos genes nucleares (ciertas variantes en los genes *TRMU*, *MTO1* o *GTPBP3*), el haplogrupo mitocondrial (en población china se han visto que entre los pacientes que desarrollan sordera abunda el fenotipo D (40%), respecto a la población control (20%)(123)) o factores ambientales (124)

#### 3.6.1.1.2 Grandes deleciones únicas del ADNmt

Se han descrito una gran variedad de deleciones únicas de gran tamaño, variables en cuanto localización y magnitud, pero la mayoría se encuentran en la llamada “zona de deleción común” de 4977pb situada entre el gen *MTATP8* y *MTND5* (125) (Figura 9). Este tipo de anomalías, aparecen normalmente de manera esporádica durante el desarrollo embrionario (126) y presentan un bajo riesgo de transmisión (menor al 10%). Hay 3 fenotipos principales asociados (127):

#### - Síndrome de Pearson

Las características clínicas de la enfermedad son la anemia sideroblástica asociada a una insuficiencia hepática; la mayoría de los pacientes no superan los 4 años de vida, los pacientes que sobreviven desarrollan el síndrome Kearns-Sayre.



### - Síndrome Kearns-Sayre (KSS)

Es un síndrome grave, de aparición más tardía (a partir de los 20 años), caracterizado por la presencia de PEO y retinitis pigmentosa; además es común ver una implicación multisistémica con miopatía, ataxia y defectos en la conducción cardíaca (128); es común que los pacientes no superen los 40 años de vida.

### - PEO

Es el fenotipo más leve y de aparición tardía, asociado a ptosis palpebral, limitación progresiva del movimiento de los ojos y debilidad general; también puede haber signos de enfermedad multisistémica, como intolerancia al ejercicio, cardiomiopatía, cataratas, sordera o disfunción cerebelar (114).

### 3.6.1.2 EM debidas a defectos en el ADNn.

La mayoría de genes que codifican el proteoma mitocondrial son de origen nuclear, y se ha establecido en aproximadamente 1.500 proteínas (129). Hasta la fecha, se han descrito alteraciones en unos 300 genes nucleares que provocaran una disfunción del sistema OXPHOS (130). Las EM asociadas a defectos en el genoma nuclear se heredan siguiendo los patrones de herencia mendeliana o pueden originarse de novo, siendo los fenotipos más severos los que presentan un patrón de herencia recesiva. Como todas las EM, este grupo presenta un fenotipo clínico muy variado, ya que las características clínicas se pueden solapar, aunque hay síndromes específicos bien definidos.

Las EM debidas a defectos en genes nucleares son más comunes en niños que en adultos; ya que son responsables de la mayoría de las EM en niños, asignando solo un 20-25% de los casos pediátricos de EM a mutaciones en el ADNmt (131). En cambio, las EM de origen nuclear que predominan en adultos, en general, son provocadas por alteraciones en genes implicados en la replicación de ADNmt, heredadas siguiendo un patrón de herencia dominante, aunque también pueden heredarse de forma recesiva, dando lugar a fenotipos más leves, como PEO (132).

Clasificamos las EM de origen nuclear según la función de los genes implicados, y las simplificaremos en : alteraciones en subunidades estructurales y factores de ensamblaje del sistema OXPHOS, defectos en el mantenimiento del ADNmt, defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales y otras alteraciones que afectan al sistemas OXPHOS indirectamente.(132, 133)

#### 3.6.1.2.1 Defectos en subunidades estructurales y factores de ensamblaje del sistema OXPHOS

En este grupo, se incluyen genes que codifican subunidades estructurales y factores de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS; defectos en este grupo de genes darán lugar a déficits aislados en la actividad de los complejos.

El déficit aislado de la actividad del CI es la causa más común de este tipo de trastornos, afectando al 30% de los pacientes de este grupo; a diferencia del CI, las alteraciones del resto de complejos son menos frecuentes (130).

Podemos diferenciar dos grandes grupos fenotípicos que dan lugar a este tipo de alteraciones: pacientes con afectación puramente miopática, con fenotipo medio o leve; y pacientes con afectación multiorgánica, en los cuales los tejidos y órganos con más demanda energética se verán más afectados, como el cerebro o el corazón, el fenotipo resultante es progresivo y normalmente fatal; este último grupo es el más frecuente. La aparición de los síntomas en la mayoría de estos pacientes, suele ser en los primeros 5 años de vida. El fenotipo clínico varía (Tabla 1), pero la presentación más común en niños es el síndrome de Leigh, caracterizado por la presencia de lesiones necróticas en los ganglios basales y del tronco cefálico (134), de aparición en los primeros meses de vida con una regresión en el desarrollo, que progresa y empeora hasta provocar la muerte en los primeros años de vida.

*Tabla 1 - Genes y fenotipos asociados a defectos en subunidades y factores de ensamblaje del sistema OXPHOS (135)*

Defectos en subunidades estructurales		
	Gen	Fenotipo clínico
CI	<i>NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFB3, NDUFB9, NDUFB11, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3</i>	SL, encefalopatía, cardiomiopatía, hepatopatía
CII	<i>SDHA, SDHB, SDHD</i>	SL, retinopatía, encefalopatía, paraganglioma, feocromocitoma
CIII	<i>CYC1, UQCRB, UQCRC2, UQCRQ</i>	AL, retraso desarrollo, sordera, cardiomiopatía
CIV	<i>COX4, COX6A, COX6B, COX7B, COX8</i>	Encefalomiopatía infantil, AL, insuficiencia pancreática exocrina y anemia
CV	<i>ATP5A1, ATP5E</i>	Aciduria 3-metilglutaconica, acidosis láctica, retraso mental leve, neuropatía periférica
Defectos en factores de ensamblaje OXPHOS		
CI	<i>ACAD9, FOXRED, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NUBPL, TMEM126B</i>	SL, cardioencefalomiopatía, AL infantil
CII	<i>SDHAF1</i>	Leucoencefalopatía infantil, paraganglioma
CIII	<i>BCS1L, LYRM7, UQCC2, UQCC3, TTC19</i>	Encefalopatía, hepatopatía, tubulopatía, síndrome GRACILE, síndrome Björnstad
CIV	<i>SURF1, CEP89, COX14, COX20, COA5, COA3, COA6, COX10, COX15, FASTKD2, PET100, SCO1, SCO2, SURF1, LRPPRC, CEP89, TACO1, APOPT1, NDUFA4</i>	SL, SL franco-canadiense, encefalopatía, miopatía, cardiomiopatía, fallo hepático, tubulopatía
CV	<i>ATPAF2, TMEM70</i>	Encefalopatía, AL, hipotonía, cardioencefalomiopatía

\*SL: Síndrome de Leigh; AL :Acidosis láctica; GRACILE: Retraso del crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte prematura.

### 3.6.1.2.2 Defectos en el mantenimiento del ADNmt

Los defectos en estos grupos de genes alteran la síntesis del ADNmt directa o indirectamente, lo que induce a defectos secundarios, que pueden ser cuantitativos (depleción), cualitativos (deleciones múltiples) o mutaciones puntuales, en el ADNmt del tejido afectado (136). Este grupo de alteraciones causa fenotipos muy diversos, que van desde enfermedades severas multisistémicas infantiles, donde el número de copias del ADNmt está muy disminuido, hasta presentaciones adultas más leves como PEO, donde el ADNmt presenta deleciones múltiples, pero no depleción. Los síntomas clínicos más

característicos son la afectación de los músculos externos de los ojos, miopatía generalizada e intolerancia a ejercicio, cardiomiopatía y ataxia (137).

Se han asociado variantes patogénicas en 24 genes involucrados en el mantenimiento del ADNmt (Tabla 2).

Tabla 2 - Genes y fenotipos asociados a defectos en mantenimiento del ADNmt (138)

Defecto	Gen	Herencia	ADNmt	Fenotipo clínico principal
<b>Replicación del ADNmt</b>	<i>DNA2</i>	AD	DLM	PEOad
	<i>MGME1</i>	AR	DLM	PEOar
	<i>POLG</i>	AD	DLM	PEOad
		AR	DLM	PEOar
		AR	DP	Alpers-Huntenlocher
	<i>POLG2</i>	AD	DLM	SANDO, SCAE
	<i>POLG2</i>	AD	DLM	PEOad
	<i>RNASEH1</i>	AR	DLM	PEOar
	<i>TWNK</i>	AD	DLM	PEOad
		AR	DLM	IOSCA
AR		DP	Alpers -like	
<i>TFAM</i>	AR	DP	Síndrome hepatocerebral	
<b>Vía de salvamento mitocondrial de los nucleótidos</b>	<i>TK2</i>	AR	DP	Miopatía
		AR	DLM	PEOar
	<i>DGUOK</i>	AR	DP	Síndrome hepatocerebral
		AR	DLM	Miopatía con o sin PEO
		AR	DLM	Síndrome de la neurona motora
	<i>SUCLA2</i>	AR	DP	Encefalomiopatía o Síndrome hepatocerebral
	<i>SUCLG1</i>	AR	DP	Encefalomiopatía o Síndrome hepatocerebral
<i>ABAT</i>	AR	DLM	Encefalomiopatía	
<b>Metabolismo citosólico de nucleótidos</b>	<i>TYMP</i>	AR	DP y DLM	MNGIE
	<i>RRM2B</i>	AD	DLM	PEOad
AR		DP	Miopatía y tubulopatía	
<b>Importe de nucleótidos mitocondriales</b>	<i>SLC25A4</i>	AD	DLM	PEOad
		AD	DP	Miopatía y cardiomiopatía
		AR	DLM	Miopatía y cardiomiopatía
	<i>AGK</i>	AR	DP	Miopatía y cardiomiopatía
	<i>MPV17</i>	AR	DLM	Miopatía con o sin PEO
		AR	DP	PEOar, leucodistrofia
<b>Dinámica mitocondrial</b>	<i>OPA1</i>	AD	DLM	Atrofia óptica
	<i>MFN2</i>	AD	DLM	Atrofia óptica
	<i>SPG7</i>	AR	DLM	PEOar y ataxia
	<i>FBXL4</i>	AR	DP	PEOar y ataxia
	<i>CHCHD10</i>	AD	DLM	Miopatía
	<i>AFG3L2</i>	AD/AR	DLM	PEOar y ataxia

\* AD: Autosómico dominante; AR: Autosómico recesivo; DLM: Delecciones múltiples; DP: Depleción

La sintomatología clínica de este grupo de enfermedades se puede agrupar en:

### Encefalomiopatías de aparición adulta

El fenotipo clínico característico de este grupo, es la oftalmoplejía externa progresiva (PEO) de herencia dominante o recesiva (139) con delecciones múltiples del ADNmt, asociadas a variantes patogénicas en

los genes *SUCLA2*, *SUCLG1* o *ABAT*. Los pacientes presentan ptosis con limitación en el movimiento de los ojos y una debilidad generalizada, hay otros de síntomas característicos de EM, que pueden manifestarse en los pacientes; normalmente, los síntomas aparecen entre los 20 - 40 años. También es característica, la presencia de FRR y COX- en la biopsia muscular y de una disminución de la actividad enzimática del CI, III, IV y V (138).

### **Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE - Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy)**

Es una enfermedad autosómica recesiva, caracterizada por la combinación de PEO, dismotilidad gastrointestinal, caquexia, neuropatía periférica, leucoencefalopatía difusa y disfunción mitocondrial, con una edad media de aparición de los síntomas de 19 años; es una enfermedad progresiva fatal, en que los pacientes no suelen superar los 40 años de edad. Solo se han descrito variantes patogénicas en el gen *TYMP* como causa genética. También es característica, la presencia de FRR y COX- en la biopsia muscular (140).

### **Síndromes neurológicos recesivos**

Este grupo de síndromes, se asocian a mutaciones en el gen *POLG* y a defectos secundarios cualitativos o cuantitativos en el ADNmt. El grupo está constituido por la enfermedad Alpers-Huttenlocher, caracterizado por una polidistrofia hepática con convulsiones de origen infantil, que evoluciona en un deterioro neurológico global fatal; síndromes de origen temprano o juvenil como la neuropatía sensorial atáxica con disartia y oftalmoplejía (SANDO) o epilepsia mioclónica, miopatía y ataxia sensorial (MEMSA) donde la administración del valproato como antiepiléptico está contraindicado, ya que provoca un fallo hepático fatal (141); y varios espectros de varias miocerebrohepatopatías de origen temprano y ataxias espinocerebrales y epilepsia (SCAE)(138).

### **Síndromes depleción mitocondrial**

Este grupo síndromes se caracteriza por presentar un defecto cuantitativo del ADNmt, aparecen en niños y se heredan de forma recesiva. Son clínica y genéticamente muy heterogéneos.

#### **Formas miopáticas**

Los síntomas aparecen en los primeros años de vida, y normalmente presentan dificultad para comer, hipotonía y debilidad, con muerte en el primer año de vida por insuficiencia pulmonar, aunque hay fenotipos más leves con regresión motora aislado y mayor supervivencia (142). Además, la biopsia pulmonar presenta fibras COX- y los niveles de creatina quinasa en sangre son elevados. En la mayoría de los casos están causadas por alteraciones en los genes *GFER*, *TK2*, *DGUOK*, *RRM2B* o *SLC25A4*.

#### **Formas encefalomiopáticas**

Pueden presentar diferentes manifestaciones clínicas, que van desde un retraso psicomotor severo con hipotonía, sordera, convulsiones seguidas de contracturas y ptosis asociados a depleción en músculo; a otras formas mucho más severas con rasgos dismórficos con acidosis láctica con muerte a los pocos días del nacimiento con depleción en músculo e hígado. Es común detectar una acidúria metilmalónica. Estas manifestaciones clínicas están causadas mayoritariamente por alteraciones en los genes *SUCLG1*, *SUCLA2* o *ABAT*.

#### **Formas hepatocerebrales**

Los niños con estos síndromes, presentan fallo hepático con depleción en hígado; no suelen superar el primer año de vida. Es común la presencia de vómitos, hipotonía e hipoglucemia asociada a síntomas

neurrológicos progresivos. Se observa en la biopsia hepática degradación lipídica, fibrosis y colapso de los lóbulos de hígado. Este tipo de fenotipo clínico puede estar causado por alteraciones en los genes *SUCLG1*, *SUCLA2*, *DGUOK* o *TFAM*.

### 3.6.1.2.3 Defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales

En este grupo se incluyen tanto los genes involucrados en la transcripción mitocondrial, procesamiento y modificación de los ARN como los que intervienen en la traducción de las proteínas mitocondriales. Los defectos en estos grupos de genes *Tabla 3*, en general están asociados a fenotipos muy severos, incluso fatales, ya que se ve afectada la síntesis de todas las subunidades mitocondriales de los complejos OXPHOS, reflejado en un déficit multienzimático de este sistema. Las manifestaciones clínicas más características de este grupo de defectos, son Síndrome de Leigh, miopatía-acidosis láctica-anemia sideroblástica (MLASA), fallo hepático agudo, acidosis láctica neonatal fatal, hipotonía, cardiomiopatía, tubulopatía, encefalopatía progresiva y leucoencefalopatía (137).

*Tabla 3 - Genes implicados en defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales*

<b>Procesamiento de los ARNm:</b> <i>LRPPRC, TACO1, ELAC2, PNPT1, HSD17B10, MTPAP, PTC1</i>
<b>Modificación de ARNt:</b> <i>MTO1, GTP3BP, TRMU, PUS1, MTFMT, TRIT1, TRNT1, TRMT5, PNPT1</i>
<b>Aminoacil ARNt sintetetasas:</b> <i>AARS, DARS2, EARS2, RARS2, YARS2, FARS2, HARS2, LARS2, VARS2, TARS2, IARS2, CARS2, PARS2, NARS2, KARS, GARS, SARS2, MARS2</i>
<b>Factores de reciclaje y liberación del ribosoma:</b> <i>C12orf65, GFM2</i>
<b>Factores de elongación en la síntesis de proteínas:</b> <i>TUFM, TSFM, GFM1</i>
<b>Proteínas mitoribosomales:</b> <i>MRPS16, MRPS22, MRPL3, MRP12, MRPL44</i>

### 3.6.1.2.4 Alteración de la fusión y fisión mitocondrial

El mantenimiento de la dinámica mitocondrial, es esencial para la distribución de las mitocondrias y la conservación de su función, ya que forman una red interconectada en constante reorganización. La alteración de algunos genes como *SLC25A46*, *DNM1L*, *GDAP*, *MFF*, *STAT2*, implicados en estos procesos, dan lugar a fenotipos clínicos como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía sensor-motora o encefalopatía.

### 3.6.1.2.5 Otras alteraciones que afectan al sistema OXPHOS

En este grupo se incluyen genes que codifican otras proteínas que forman parte del sistema OXPHOS (CoQ10), componentes que forman parte de alguno de los complejos OXPHOS (centros Fe-S) o proteínas implicadas en otras funciones que su defecto interfiere con el del sistema OXPHOS. Estos defectos dan lugar a una gran variedad de fenotipos clínicos (*Tabla 4*).

La CoQ10 transfiere los electrones de los CI y CII al CIII, defectos en su función alteran el funcionamiento del sistema OXPHOS (130), lo mismo sucede con los defectos en los centros Fe-S, ya que están involucrados en numerosas reacciones redox en los CI, CII y CIII. Además, la alteración de la síntesis de componentes de las membranas mitocondriales pueden provocar una alteración OXPHOS (130). También hay otros mecanismos que afectan, como la alteración del sistema bisulfito, que juega un papel en la entrada en la mitocondria de proteínas ricas en cisteína y cede los electrones al citocromo c, por lo que su alteración provoca alteraciones OXPHOS. Por último, la acumulación de algunos componentes inhibidores de los complejos OXPHOS, como el sulfito, que inhibe del CIV (137).

**Tabla 4 – Grupos de genes asociados a defectos OXPHOS**

<b>Defectos en la CoQ10</b>	
<i>ADCK3, ADCK4, COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ9, PDSS1, PDSS2</i>	Encefalopatía, nefropatía, cardiomiopatía, enfermedad multisistémica infantil fatal (143)(144).Déficit CI+III, CII+III.
<b>Defectos en los Centros Fe-S</b>	
<i>BOLA3, FDX1L, FXN, GLRX5, HSPA9, IBA57, ISCA2, ISCU, LYRM4, NFS1, NFU</i>	Miopatía, AL, ataxia Fiedreich, anemia sideroblástica, paraplejía espástica (145). Déficit CI, CII
<b>Metabolismo de fosfolípidos de membrana</b>	
<i>SERAC1, TAZ</i>	Síndrome de Bart
<b>Metabolismo de componentes tóxicos</b>	
<i>HIBCH, ECHS1, ETHE1</i>	Encefalopatía, ataxia, SL, leucodistrofia
<b>Sistema intercambio disulfuro</b>	
<i>GFER</i>	Miopatía

\*AL: Acidosis láctica; SL: Síndrome de Leigh.

### 3.6.2 Diagnóstico de las EM

El diagnóstico de las enfermedades mitocondriales es complicado debido su gran heterogeneidad clínica y genética. Cuando se sospecha que un paciente padece un EM el primer paso en el diagnóstico, es realizar el diagnóstico clínico donde se buscan evidencias clínicas y bioquímicas, que ayudaran en la identificación de la base genética (146).

En el diagnóstico de las EM se debe realizar una evaluación clínica completa del paciente y disponer de su historia familiar. Si se reconoce en el paciente un síndrome mitocondrial o características clínicas específicas que permitan enfocar el análisis genético dirigido, el paciente puede ser diagnosticado con brevedad. Si no es así, es necesario realizar pruebas clínicas y bioquímicas detalladas para enfocar su diagnóstico genético. Los algoritmos de diagnóstico de las EM incluyen el análisis de biomarcadores que, aunque no son específicos de EM, ayudan en el diagnóstico genético de estas enfermedades.

Algunas de las pruebas que se suelen realizar son (147):

**Análisis de metabolitos en sangre, orina o LCR:** se suelen medir los niveles de lactato, piruvato, creatina quinasa, aminoácidos, timidina y desoxiuridina, acilcarnitinas y ácidos orgánicos. Algunos metabolitos ayudan en el diagnóstico de síndromes concretos, como son los niveles elevados de timidina y desoxiuridina en plasma en pacientes de MNGIE (148). Niveles altos de amino ácidos en plasma o LCR puede ser el resultado de un estado redox alterado creado por una disfunción del OXPHOS, los aminoácidos que suelen acumularse son alanina, glicina, prolina y treonina; la concentración de aminoácidos en orina suele ser un marcador útil en pacientes con alteración renal. En aquellos síndromes con miopatía puede haber aumento de los niveles de creatina quinasa en sangre. También se pueden observar concentraciones elevadas de ácido metilmalónico en pacientes con síndromes de depleción mitocondrial (149).

**Biopsia muscular:** es frecuente en pacientes con miopatía el estudio de la biopsia muscular. Permite visualizar a partir de secciones de músculo teñidas, la morfología y distribución de las fibras musculares, así como el número y disposición de las mitocondrias. Las tinciones más utilizadas son hematoxilina-eosina, para conocer la forma, tamaño, número de las fibras musculares; la tinción tricromica de Gomori modificada, donde se puede observar las acumulaciones subsarcolémicas de

mitocondrias características de las FRR, ya que tiñe de color azul claro al tejido conectivo, azul a las fibras musculares y rojo a las mitocondrias; por último, la tinción combinada COX/SDH, permite identificar fibras musculares con alteraciones en la actividad del complejos IV (COX o citocromo c oxidasa) y II (SDH o succinato deshidrogenasa) (106).

Otra técnica muy utilizada en la rutina diagnóstica de las enfermedades mitocondriales, es la determinación mediante el estudio de la oxidación/reducción de los diferentes sustratos de cada complejo, de las actividades enzimáticas de los complejos OXPHOS en músculo del paciente por espectrofotometría (150).

**Técnicas moleculares:** cuando hay sospecha de síndrome de depleción, es habitual realizar el estudio del número de copias del ADNmt mediante PCR a tiempo real en el tejido diana (151, 152); además, si se sospecha de deleciones del ADNmt, se estudian por Southern blot o PCR larga (153), como por ejemplo en el estudio de deleciones únicas en síndromes como el de Pearson o KSS, y de las deleciones múltiples en pacientes con PEO.

### 3.6.2.1 Diagnóstico genético

En algunos casos los resultados de la exploración clínica del paciente, pueden dirigir a un síndrome clásico de enfermedad mitocondrial con un estudio genético bien definido. La historia familiar puede ayudar a diferenciar el origen genético del defecto ya que puede informar si el tipo de herencia es materna, debida a defectos en el ADNmt o bien mendeliana, por defectos en el genoma nuclear. La orientación del diagnóstico de la EM dependerá de la sospecha clínica y del tipo de herencia.

#### 3.6.2.1.1 Análisis del ADNmt

Cuando existe la sospecha de EM de un síndrome clásico, normalmente se estudia el ADNmt en busca de las mutaciones puntuales más comunes, aunque si no se detectan se analiza todo el genoma mitocondrial. El estudio genético del ADNmt se puede realizar utilizando las técnicas convencionales o técnicas de secuenciación masiva.

- Las técnicas convencionales utilizadas para detectar variantes puntuales son la PCR-RFLP, o la secuenciación Sanger. Si se quiere analizar la molécula completa de ADNmt se realiza por secuenciación Sanger a partir de múltiples fragmentos solapantes o con el array de resecuenciación de Afimetrix o MitoChip v2.0. La mayoría de las técnicas permiten detectar bajos niveles de heteroplasmia (>5%), a excepción de la secuenciación Sanger en que el límite de detección es mayor (>30%). Cuando se detecta una variante, el porcentaje de heteroplasmia se puede detectar mediante RT-PCR o PCR-RFLP.

- La utilización de las técnicas de secuenciación masiva permiten en una sola determinación, detectar las variantes en el ADNmt y determinar su porcentaje de heteroplasmia, por eso se ha extendido su uso; además, también permite la detección de grandes deleciones únicas en el ADNmt.

#### 3.6.2.1.2 Análisis de genes nucleares

Aproximadamente 300 genes se han asociado a fenotipos clínicos de EM, aunque se estiman en 1.500 los posibles genes implicados. En el diagnóstico de las EM de origen nuclear, se utiliza la secuenciación Sanger para estudiar un gen o un grupo reducido de genes relacionados con el fenotipo clínico del

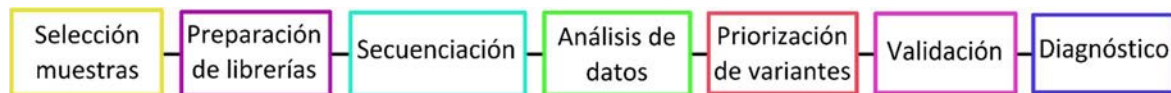
paciente. Debido a que el número de genes asociados a determinados fenotipos es muy elevado, la aplicación de la secuenciación masiva en el análisis simultáneo de genes representa una mejora tanto en tiempo como económica.

### 3.6.2.1.3 Técnicas de secuenciación masiva

Las técnicas de secuenciación de segunda generación o next generation sequencing (NGS), han supuesto una revolución en el diagnóstico genético ya que debido a su alto rendimiento (número de secuencias leídas al mismo tiempo), son capaces de secuenciar muchos genes, a más profundidad, en mucho menor tiempo y a un costo económico y técnico muy inferior.

El flujo de trabajo en las técnicas de secuenciación NGS implica los siguientes procedimientos *Figura 10*; enriquecimiento de la zona de interés, preparación de las librerías, secuenciación, análisis de datos y la priorización de las variantes encontradas.

*Figura 10 – Esquema proceso diagnostico aplicando las técnicas de secuenciación masiva*



#### **Enriquecimiento de zona de interés y preparación de las librerías**

En las técnicas de secuenciación masiva, un paso previo a la secuenciación, es la selección de las regiones que se quieren secuenciar. Normalmente se seleccionan los exones de los genes de interés incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes de 20 pb. Se pueden utilizar dos métodos; la amplificación de las regiones seleccionadas por PCR multiplex, en la que se generaran amplicones, o la captura de estas regiones por hibridación utilizando sondas específicas. La elección del método utilizado, dependerá del tamaño de la zona a estudiar. Normalmente se utilizan amplicones cuando la región diana es pequeña, ya es más complicado sintetizar cientos de cebadores que permitan la optimización de las condiciones de PCR; en los casos en que la zona de interés sea grande, es más adecuado utilizar la captura por sondas específicas.

La preparación de las librerías es ligeramente diferente dependiendo de la forma en la que se ha realizado el enriquecimiento. Cuando se enriquece la muestra mediante amplicones, los adaptadores necesarios para la secuenciación, se han unido en el proceso de amplificación; a continuación, se añaden los índices específicos a cada muestra por amplificación PCR; esto permite realizar la secuenciación de diferentes muestras al mismo tiempo. En cambio, cuando se enriquecen las muestras mediante captura por sondas, inicialmente se fragmenta en ADNg, al cual se le añaden los adaptadores por ligación, después se añaden los índices por PCR, en general en este paso se mezclan las distintas muestras y, por último, se lleva a cabo la captura de las regiones de interés utilizando cientos de sondas específicas.

La captura del ADNmt es conveniente realizarla en un único amplicón mediante LPCR, ya que así se evita la interferencia de las secuencias nucleares homologas del ADNmt (NUMT - nuclear mitochondrial DNA segment) y se obtiene mayor homogeneidad de cobertura, además permite la localización de deleciones únicas del ADNmt.



## Secuenciación

La secuenciación se lleva a cabo en alguna de las plataformas disponibles de secuenciación masiva. Antes de que se produzca la secuenciación propiamente, las librerías sufren una amplificación clonal de sus fragmentos, que formaran los clusters de secuenciación. Básicamente existen dos métodos de amplificación clonal, la PCR en emulsión (se lleva a cabo fuera del secuenciador, cada fragmento de la librería se une a una esfera) o la PCR por puente (se realiza dentro del secuenciador, los fragmentos se unen a la celda de secuenciación o “flow cell”). Después de la amplificación clonal, empieza la secuenciación. Las diferentes plataformas se basan en diferentes estrategias para realizar la secuenciación, siendo la secuenciación por síntesis la más extendida.

Existen diferentes tecnologías NGS, Roche (454, Junior) Applied Biosystem’s (SOLID), Illumina (MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq) o Ion Torrent (PGM, IonS5, Proton), entre otras, cada una con varias plataformas de secuenciación disponibles con diferentes rendimientos, basadas en diferentes principios de secuenciación y con reactivos, aparatos y softwares específicos.

La aparición de los secuenciadores compactos de pequeña y mediana capacidad han supuesto una gran mejora en el abordaje del diagnóstico genético de pacientes, ya que son aparatos relativamente pequeños, que permiten la secuenciación de pequeños genomas (genoma mitocondrial, bacteriano, virus..), la secuenciación de paneles de genes e incluso de exomas (en un número reducido de muestras). Las plataformas más utilizadas en la actualidad son las de Illumina e Ion Torrent.

Estas dos tecnologías de secuenciación monitorizan la adición de nucleótidos durante la síntesis de ADN (secuenciación por síntesis), pero trabajan con diferentes principios (Figura 11). La formación de los clusters en las plataformas Illumina se realiza por PCR por puente, estos clusters son secuenciados mediante ciclos repetitivos de extensión de la cadena de ADN base a base, utilizando una mezcla de los 4 nucleótidos fluorescentes con terminadores de cadena reversible, permitiendo solo la adición de un nucleótido por ciclo; una cámara recoge la fluorescencia y determina el nucleótido unido en cada posición; las plataformas Illumina realizan la secuenciación en los dos sentidos de cada fragmento (pair-end) (154). En cambio, en las plataformas de Ion Torrent, los clusters de secuenciación se sintetizan por PCR en emulsión, estos clusters que se han formado en la superficie de las microesferas, se depositan en una cámara llena de micropocillos en el chip semiconductor de secuenciación; los nucleótidos individualmente son introducidos cíclicamente en presencia de la ADN polimerasa, cuando hay una incorporación de un nucleótido, se produce la liberación de protones, que producen un cambio de pH que es registrado por un electrodo (155); a diferencia de las plataformas Illumina, más de un nucleótido puede ser incorporado en cada ciclo, induciendo a errores en las zonas homopoliméricas (156).

Hay diferentes plataformas de secuenciación de cada una de las dos tecnologías mencionadas, que se diferencian en la capacidad de secuenciación (Tabla 5).

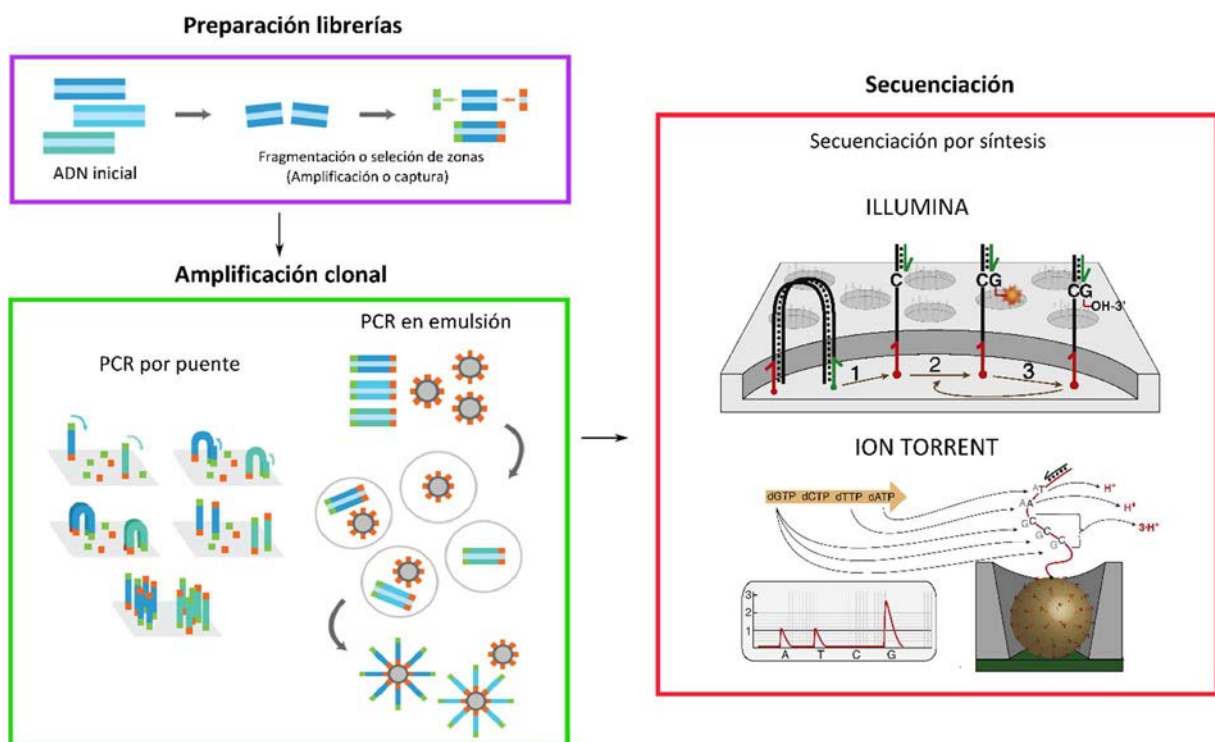
Aunque la aparición de la NGS ha supuesto una revolución el rendimiento de secuenciación, la aparición de la tercera generación de secuenciadores (TGS) supondrá una mejora en la secuenciación en zonas repetitivas y permitirá reconocer variantes estructurales, estas mejoras se deben a que

permiten secuenciar moléculas únicas de ADN eliminando la amplificación inicial del ADN y secuenciar moléculas de mayor longitud. Las principales plataformas de TGS son Single Molecule Real Time (SMRT) de Pacific Bioscience (Pac Bio), Tru-seq Synthetic Long-Read technology de Illumina y Oxford Nanopore.

**Tabla 5 - Plataformas compactas de pequeña y mediana capacidad**

Illumina			
Plataforma	Capacidad máxima	Longitud máxima fragmentos	Aplicación
Miniseq	7.5 Gb	2x150 pb	Pequeños genomas, secuenciación dirigida, expresión, miARN/sARN
MiSeq/MiSeq DX	15 Gb	2x300 pb	Pequeños genomas, secuenciación dirigida, expresión, miARN/sARN, interacción ADN-proteína
NextSeq	120 Gb	2x150 pb	Genomas, exomas, transcriptomas, secuenciación dirigida, metiloma, interacción ADN-proteína
Ion Torrent			
Ion PGM	2 Gb	400 pb	Pequeños genomas, secuenciación dirigida, sARN, interacción ADN-proteína, metilación
Ion S5	15 Gb	600 pb	Genomas, exomas, transcriptomas, secuenciación dirigida, metiloma, interacción ADN-proteína

**Figura 11 – Esquema representativo de la secuenciación con las tecnologías de secuenciación Illumina y Ion Torrent**



### Análisis de datos

Hay diferentes niveles de análisis de los datos obtenidos mediante las plataformas NGS. A partir de las señales obtenidas por el secuenciador, se transforman en secuencias de bases a las que se asocia una puntuación de la calidad en un formato FASTQ, este proceso se puede llevar a cabo en algunas plataformas de secuenciación que llevan integrados estos programas. El siguiente paso es el

alineamiento de las secuencias frente a un genoma de referencia en el que se generan los archivos BAM (Binary Alignment Map), ensamblaje y detección de variantes obteniéndose archivos gvcf/vcf. A continuación, se realiza la anotación de variantes y por último utilizando diferentes métodos de filtraje en los que se usan varios programas informáticos, se realiza la priorización de variantes (157).

Es aconsejable que las variantes obtenidas en la secuenciación NGS sean validadas, ya que en ocasiones pueden producirse errores de secuenciación, la validación se realiza mediante secuenciación Sanger.

El rápido desarrollo tanto de la tecnología NGS como de los programas bioinformáticos, permite que se estén aplicando a muchos campos de conocimiento. Estas técnicas tienen varias aplicaciones, ya que permiten estudiar genomas enteros (WGS), transcriptomas (WTSS/RNA seq), exomas (WES), genes candidatos o metilomas (MeS).

#### 3.6.2.1.4 Interpretación de variantes no descritas

Las variantes en el ADNmt, pueden tener diferente impacto funcional, que varía desde patogénicas a benignas. Algunas de las variantes se establecen como polimorfismos homoplásmicos estables dentro de las poblaciones (158). Combinaciones de varios polimorfismos definen los haplogrupos mitocondriales que se heredan por vía materna (159). Los haplogrupos están bien definidos filogenéticamente, por eso se utilizan para mapear o estudiar migraciones humanas y diferencias genéticas entre poblaciones. Se ha visto que las variantes genéticas que definen los haplogrupos podrían ser factores de susceptibilidad para el desarrollo de determinados fenotipos clínicos; por ejemplo, se ha asociado que el haplogrupo J incrementa la penetrancia de las mutaciones patogénicas m.11778G>A y m.14484T>C, en pacientes con síndrome de LHON (160).

Algunos autores (161) han propuesto criterios para asignar la patogenicidad de variantes en el ADNmt, que incluyen que: la variante no debe de haberse asignado como polimorfismo; el cambio debe afectar a una posición conservada; las variantes deletéreas son normalmente heteroplásmicas; el porcentaje de heteroplásmia en los demás miembros de la familia debe de corresponder con la severidad; y la carga mutacional debe de ser diferente en fibras normales y afectadas (162). Aunque hay excepciones, ya que se han descrito variantes patogénicas que se encuentran en homoplasmia (163).

La clasificación de la patogenicidad de las variantes en genes nucleares, se realizan siguiendo las recomendaciones de la ACMG (164); estas guías también se pueden adaptar a las variantes mitocondriales reconsiderando algunos aspectos. Se consideran los siguientes factores para su clasificación, entre otros, si cosegregan con la enfermedad en familiares afectados o se ha encontrado en pacientes no relacionados con fenotipo similar, si la variante afecta a un aminoácido conservado, si el modelo de proteína predice consecuencias funcionales y si estudios funcionales indican un defecto (165).

Las bases de datos poblacionales mas consultadas, para estudiar la frecuencia de una variantes encontrada, son entre otras GnomAD Browser, EXAC Browser, 1000g). También se consultan bases de datos que recogen variantes asociadas a patología (Human Genome Mutation Database - HGMD,

Database of single nucleotide polymorphism - dbSNP, Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM, Locus Specific Mutation databases - LSDBs, Leiden Open Variation - LOVD, MutDB, MITOMAP, mtDB, POLG mutation database).

Para clasificar variantes no descritas también se utilizan programas que in silico predicen el efecto de la variante considerando diferentes factores como la conservación de la posición entre especies, el tipo cambio de aminoácido, el posible efecto sobre splicing. (SIFT, POLYPHEN, Mutation taster, Align GVGD, Panther, CADD).

En el caso que sea posible es conveniente caracterizar funcionalmente las variantes no descritas para poder confirmar su patogenicidad.

#### 3.6.2.1.5 Estudio de variantes potencialmente patogénicas

A lo largo del diagnóstico genético de pacientes con EM, es posible encontrar variantes genéticas no descritas con anterioridad y potencialmente patogénicas, o en genes no asociados previamente, a fenotipos de EM pero potencialmente candidatos. En estos casos, para confirmar o descartar que las variantes estén involucradas en el fenotipo clínico, es necesario su estudio en modelos experimentales.

### Modelos experimentales de estudio de las EM

#### Modelos celulares de EM

Una de las técnicas más utilizadas en el estudio de las EM, son los híbridos mitocondriales. Estas células híbridas, son utilizadas para caracterizar desajustes en la bioenergética celular asociada a mutaciones específicas en el ADNmt (166). Estas líneas celulares se generan deplecionando el genoma mitocondrial de células huésped con bromuro de etidio, y repoblándolas con el de las células donadoras del paciente, a partir de plaquetas o células enucleadas.

Otros tipos de cultivos celulares utilizados para generar modelos de estudio de EM, son los cultivos primarios de fibroblastos derivados de biopsias de piel de los pacientes o las células madre pluripotentes inducidas (iPS) (84); las iPS pueden ser reprogramadas en células no-pluripotentes y diferenciadas en los diferentes tipos de células que sean relevantes en cada EM, así se puede estudiar el tejido afectado en cada una (167).

#### Modelo de EM en levadura

Es un modelo alternativo para estudiar mutaciones puntuales asociadas a EM, fue el sistema de estudio establecido en los años sesenta. *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido y es una herramienta muy útil en el estudio de mutaciones puntuales en el genoma mitocondrial, ya que es fácilmente manipulable, su función mitocondrial está muy conservada y los proteomas mitocondriales de levaduras y humanos son similares. Mediante transformación biolística, que consiste en la transferencia directa de ADNmt con la mutación unido a microesferas de metal que son proyectadas sobre las células a gran velocidad, los fragmentos de ADNmt mutado se integran en el ADNmt salvaje de la levadura por recombinación homóloga. El genoma mitocondrial de levadura, a diferencia del de mamíferos, se hereda de forma biparental y sufre procesos de recombinación. Varios autores han aplicado este modelo para estudiar

mutaciones puntuales en genes que codifican subunidades mitocondriales de los CIII y CIV (168) o en los ARNt (169).

También es posible estudiar mutaciones puntuales en genes nucleares involucrados en EM ya que un 70% de estos genes están conservados en levadura (170).

### Modelos animales de EM

Hay pocos modelos animales que reproduzcan adecuadamente las características clínicas de las EM humanas, pero sin duda, los más utilizados en este campo son los modelos murinos. Tradicionalmente, los modelos murinos de EM se han generado mediante la inactivación de genes de manera constitutiva o condicional mediante el sistema de recombinación Cre-loxP o por captura aleatoria de genes, con lo que se obtienen respectivamente, ratones *knock-out* con una inactivación completa del gen de interés o la disminución de su expresión; también se utilizan aunque con menor frecuencia, ratones *knock-in* en los que se modifica el gen de interés, o ratones transgénicos a los que se introducen secuencias codificantes exógenas al genoma del ratón, con el fin de estudiar alteraciones concretas en los genes de interés (84).

También se utilizan otros modelos animales, como el pez cebra (*Danio rerio*) o la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), para estudiar funciones mitocondriales básicas o algunos aspectos de patologías humanas. Sobre todo estos modelos complementan a los modelos murinos para avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de las EM y poder llegar a obtener un tratamiento eficaz.

#### 3.6.2.1.6 Caracterización de variantes patogénicas

Los modelos de EM permiten estudiar alteraciones en la bioenergética celular asociada a mutaciones específicas tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear.

Los estudios funcionales son especialmente importantes cuando se encuentran variantes potencialmente patogénicas no relacionadas previamente con un fenotipo clínico o en genes previamente no asociados a estas enfermedades. El modelado de proteínas ayuda a predecir la consecuencia de las variantes encontradas y ayuda a dirigir los estudios funcionales. Aunque la confirmación de la patogenidad viene dada de los resultados con modelos celulares obtenidos con células de paciente como fibroblastos o generación híbridos transmitocondriales (EM de origen mitocondrial). Muchas veces no se pueden realizar estudios con fibroblastos de los pacientes, porque no presentan fenotipo, en estos casos se realizan estudios alternativos, como por ejemplo ensayos *in vitro* con proteínas recombinantes (171). También se estudia determinadas variantes en genes de levadura, sobre todo genes de origen en el ADNmt, ya que están muy conservadas. El estudio de la patogenidad de genes de origen nuclear, es más complicado, ya que su función es muy diversa, y en cada caso se estudia de manera específica.



## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## 4.1 Hipótesis

Las enfermedades mitocondriales son un grupo muy variado de trastornos genéticos hereditarios, que generalmente presentan afectación multisistémica y amplia variabilidad fenotípica, debidas a fallos en el sistema energético celular (OXPHOS). Al presentar estas enfermedades una baja frecuencia (1:5.000-10.000), y que además pueden deberse tanto a mutaciones en el ADNn o en el ADNmt, con forma de herencia muy distinta, hace que su diagnóstico sea muy laborioso y complejo. Hasta ahora se conocen mutaciones en prácticamente todos los genes del ADNmt y se han identificado mutaciones en unos cuantos genes nucleares, en parte debido a la amplia variedad de posibles genes implicados y a las limitaciones de los recursos tecnológicos de diagnóstico genético disponibles, aunque en la actualidad debido a los últimos avances tecnológicos el panorama ha cambiado de forma significativa. Todo ello ha conducido a que una importante proporción de estos pacientes no posean un diagnóstico genético-molecular conocido, y que a su vez que no se conozcan bien los distintos factores biológicos que provocan la heterogeneidad clínica de los mismos. La integración de diferentes aproximaciones metodológicas de genotipado con la inclusión de los genes que se han descrito recientemente en estas patologías permitirá identificar defectos genéticos causantes de estos trastornos y establecer una estrategia diagnóstica para optimizar el rendimiento (incrementando el porcentaje de pacientes diagnosticados), tiempo de respuesta y los recursos económicos. Además, la identificación de los posibles factores que pueden influir en la diferente expresión fenotípica en estas enfermedades permitirá establecer posibles dianas terapéuticas.

## 4.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es establecer una estrategia de identificación genético-molecular de enfermedades mitocondriales y caracterizar los distintos factores que pueden influir en la presentación fenotípica de estos enfermos. Para desarrollar este objetivo, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Validación de la secuenciación completa del ADNmt con la plataforma de secuenciación masiva MiSeq para su posterior aplicación en el diagnóstico.
2. Diseño y validación un panel de genes diseñado a la carta relacionados con en el mantenimiento del ADNmt, para su posterior aplicación diagnóstica.
3. Estudio del exoma clínico y el exoma completo en pacientes con EM.
4. Estudio de la patogenicidad de variantes no descritas previamente en genes asociados a EM.
5. Caracterización de variantes modificadoras del fenotipo en pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica mitocondrial portadores de la variante m.1555A>G en homoplasmia en el gen *MTRNR1*.



## **5 MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5.1 Pacientes

### 5.1.1 Pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial de origen en el ADNmt

A continuación, se detallan los enfermos con EM atribuida a mutaciones en el ADNmt (Tabla 6). En todas ellas se realizó la secuenciación completa del ADNmt.

*Tabla 6 - Pacientes con sospecha en EM de origen en ADNmt*

Paciente	Sexo	Edad (años)	Sospecha diagnóstica
1	Masculino	ND	Síndrome de MELAS
2	Femenino	61	Síndrome de MELAS
3	Femenino	39	Síndrome de MELAS
4	ND	ND	Síndrome de MELAS
5	Femenino	44	Síndrome de MELAS
6	Femenino	56	Síndrome de MELAS
7	Masculino	69	Síndrome de MELAS
8	Masculino	ND	Síndrome de MELAS
9	Masculino	37	Síndrome de MELAS
10	Femenino	31	Síndrome de Leigh
11	Femenino	11m	Síndrome de Leigh
12	Masculino	ND	Síndrome de Leigh
13	Femenino	ND	Síndrome de Leigh
14	Femenino	1	Síndrome de Leigh
15	Femenino	44	Síndrome de LHON
16	Masculino	17	Síndrome de LHON
17	Femenino	3	Síndrome de Leigh, miocardiopatía hipertrófica
18	Femenino	1	Síndrome de Leigh, miopatía
19	Masculino	56	Encefalopatía mitocondrial
20	Masculino	26	Encefalopatía mitocondrial
21	Masculino	8	Miopatía mitocondrial
22	Masculino	47	Miopatía mitocondrial
23	Masculino	33	Miopatía mitocondrial
24	Masculino	ND	Debilidad de cinturas
25	Masculino	50	Debilidad de cinturas y mialgias
26	Masculino	3	Hipotonía y déficit de CI y CIII
27	Masculino	12	Enfermedad mitocondrial
28	Masculino	ND	Enfermedad mitocondrial
29	Femenino	9	Enfermedad mitocondrial
30	Masculino	ND	Enfermedad mitocondrial
31	Masculino	ND	Enfermedad mitocondrial
32	Femenino	ND	Enfermedad mitocondrial

### 5.1.2 Pacientes con sospecha de EM de origen en el ADNn

En la Tabla 7 se describen los pacientes con EM y sospecha de mutaciones en genes nucleares. Estos pacientes se estudiaron mediante diferentes técnicas NGS.

*Tabla 7 - Pacientes con EM de origen en genes nucleares*

Paciente	Sexo	Edad	Fenotipo	Defecto ADNmt
33	Masculino	5	AL, déficit enzimático CIV	Sin anomalía
34	Femenino	1	AL, hipotonía, encefalopatía	No estudiado
35	Femenino	14	Atrofia óptica	No estudiado
36	Masculino	9	Atrofia óptica	No estudiado
37	Femenino	40	Cardiomiopatía, retinitis pigmentosa	Deleciones múltiples
38	Femenino	40	Crisis tónico-crónicas, ataxia, epilepsia	Deleciones múltiples

Paciente	Sexo	Edad	Fenotipo	Defecto ADNmt
39	Femenino	30	Crisis epilépticas y hepatopatía	Depleción
40	Masculino	ND	Epilepsia, ataxia y movilidad reducida	Deleciones múltiples
41	Masculino	65	Epilepsia occipital izquierda	Delección simple
42	Femenino	49	Epilepsia temporal	No estudiado
43	Femenino	48	Epilepsia, fatiga, debilidad y déficit OXPHOS multienzimático	No estudiado
20	Masculino	26	Encefalopatía mitocondrial	Sin anomalía
44	Masculino	54	Enfermedad mitocondrial	Deleciones múltiples
45	Femenino	4	Hepatopatía y alteración renal	No estudiado
46	Femenino	81	Miopatía mitocondrial	Deleciones múltiples
47	Femenino	65	Miopatía mitocondrial	Deleciones múltiples
48	Femenino	55	Miopatía mitocondrial	Deleciones múltiples
49	Masculino	75	Miopatía mitocondrial, anemia, insuficiencia pancreática y déficit OXPHOS multienzimático	Deleciones múltiples
50	Masculino	36	Miopatía mitocondrial	Depleción
51	Masculino	33	Miopatía mitocondrial	Depleción
52	Masculino	23	Miopatía mitocondrial	Depleción
53	Masculino	4	Miopatía mitocondrial, AL, déficit enzimático CI, CIII y CIV	Sin anomalía
54	Masculino	56	Ptosis, PEO, disfagia, debilidad muscular distal	Deleciones múltiples
55	Masculino	43	Ptosis bilateral, oftalmoplejía	Deleciones múltiples
56	Femenino	60	Ptosis bilateral, oftalmoplejía y disartria	Deleciones múltiples
57	Masculino	61	Ptosis, debilidad muscular	Deleciones múltiples
58	Masculino	77	Ptosis bilateral, ataxia, disfagia, diplopia	Deleciones múltiples
59	Femenino	80	Ptosis bilateral, dislipemia	Deleciones múltiples
60	Masculino	68	Ptosis, debilidad muscular, diplopia, hipoacusia	Deleciones múltiples
61	Femenino	50	Ptosis, hipoacusia, migrañas, fatiga muscular	Deleciones múltiples
62	Masculino	73	Ptosis, disfagia, debilidad	Deleciones múltiples
63	Masculino	51	Ptosis y debilidad de cinturas	Deleciones múltiples
64	Masculino	77	Ptosis bilateral	Deleciones múltiples
65	Femenino	ND	PEO	Deleciones múltiples
66	Femenino	ND	PEO	Deleciones múltiples
67	Masculino	ND	PEO	Deleciones múltiples
68	Masculino	ND	PEO	Deleciones múltiples
69	Femenino	ND	PEO	Deleciones múltiples
70	Femenino	56	PEO	Deleciones múltiples
71	Femenino	59	PEO	Deleciones múltiples
72	Femenino	53	PEO, miopatía	Deleciones múltiples
73	Masculino	64	PEO, epilepsia, disfagia	Deleciones múltiples
74	Femenino	48	PEO, parkinsonismo	Deleciones múltiples
75	Masculino	51	PEO	Delección simple
76	Maculino	41	PEO	Sin anomalía
77	Femenino	ND	PEO, miopatía e insuficiencia respiratoria	No estudiado
78	Masculino	60	Polineuropatía axonal sensitiva-motora	Deleciones múltiples
79	Femenino	31	Síndrome de Kearns Sayre	Delección simple
18	Femenino	1	Síndrome de Leigh, déficit enzimático CI, CIII y CIV	Depleción
17	Femenino	3	Síndrome de Leigh, miocardiopatía hipertrófica	Depleción
80	Masculino	1	Síndrome de Leigh, déficit enzimático CI	No estudiado
81	Femenino	1	Síndrome de Leigh	Sin anomalía
82	Masculino	20	Síndrome de Leigh/NARP, microcefalia, retinopatía, convulsiones y encefalopatía	Sin anomalía
83	Femenino	15	MNGIE like	No estudiado
84	Femenino	17	MNGIE like	No estudiado

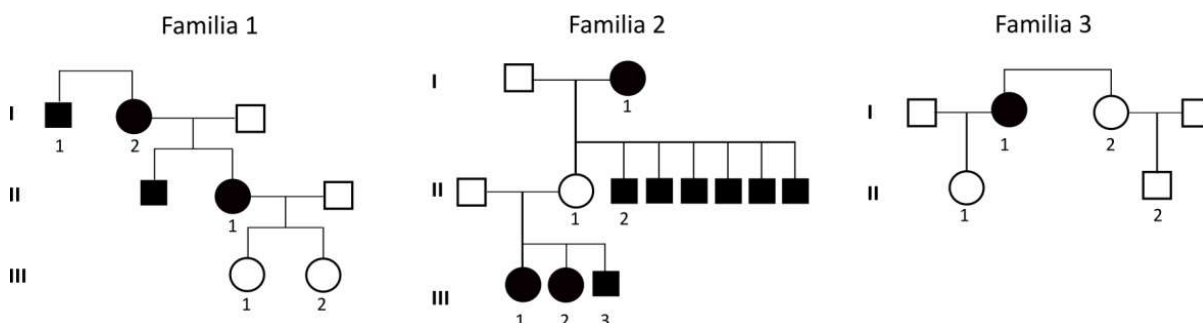
Paciente	Sexo	Edad	Fenotipo	Defecto ADNmt
85	Femenino	5	MNGIE like	No estudiado
86	Masculino	ND	MNGIE like	No estudiado
87	Femenino	45	MNGIE like	No estudiado
88	Femenino	68	MNGIE like	No estudiado
89	Femenino	11	MNGIE like	No estudiado
90	Femenino	22	MNGIE like	No estudiado

\*ND: Información no disponible; AL: acidosis láctica

### 5.1.3 Pacientes portadores de la variante m.1555A>G en el gen *MTRNR1*

Se estudiaron 23 pacientes portadores de la variante m.1555A>G en homoplasmia en el gen *MTRNR1* (Tabla 8). De los 23 pacientes estudiados, 15 pertenecen a 3 familias (Figura 12 y 8 pacientes no están relacionados).

Figura 12 - Familias estudiadas con la variante m.1555A>G



\* Los cuadrados representan individuos de sexo masculino y las redondas del sexo femenino. Todos los individuos con el símbolo negro están afectados de sordera neurosensorial no síndrómica en menor o mayor grado. Los individuos de cada generación identificados con un número se estudiaron genéticamente y son portadores de la variante m.1555A>G; el resto de individuos no identificados con un número, no se han estudiado.

Tabla 8 - Pacientes portadores de la mutación m.1555A>G

Paciente	Familia	Sexo	Edad	Fenotipo
91	1.I.1	Masculino	80	Sordera neurosensorial no síndrómica
92	1.I.2	Femenino	24	Sordera neurosensorial no síndrómica
93	1.II.1	Femenino	20	Sordera neurosensorial no síndrómica
94	1.III.1	Femenino	52	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
95	1.III.2	Femenino	75	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
96	2.I.1	Femenino	99	Sordera neurosensorial no síndrómica
97	2.II.1	Femenino	66	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
98	2.II.2	Masculino	74	Sordera neurosensorial no síndrómica
99	2.III.3	Masculino	44	Sordera neurosensorial no síndrómica (muy grave >90%)
100	2.III.2	Femenino	36	Sordera neurosensorial no síndrómica (leve <20%)
101	2.III.1	Femenino	39	Sordera neurosensorial no síndrómica
102	3.I.1	Femenino	41	Sordera neurosensorial no síndrómica
103	3.I.2	Femenino	36	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
104	3.II.1	Femenino	9	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
105	3.II.2	Masculino	9	Sin sordera neurosensorial no síndrómica
106	-	Femenino	ND	Sordera neurosensorial no síndrómica
107	-	Femenino	36	Sordera neurosensorial no síndrómica
108	-	Femenino	ND	Sordera neurosensorial no síndrómica
109	-	Femenino	ND	Sordera neurosensorial no síndrómica

Paciente	Familia	Sexo	Edad	Fenotipo
110	-	Masculino	ND	Sordera neurosensorial no sindrómica
111	-	Femenino	13	Sordera neurosensorial no sindrómica
112	-	Femenino	ND	Sordera neurosensorial no sindrómica
113	-	Masculino	ND	Sordera neurosensorial no sindrómica

\*ND: Información no disponible

## 5.2 Técnicas generales

### 5.2.1 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de muestras de sangre, orina, mucosa bucal, biopsia muscular y pellet de células, se realizan con el Kit QIAamp ADN Blood mini (51304, QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante según el tipo de la muestra.

### 5.2.2 Cuantificación de ADN mediante fluorometría

Para la cuantificación de las muestras de ADN, se utiliza el fluorómetro Qubit 2.0 (Q32866, Thermo Fisher). Se usó el kit Qubit dsADN BR (Q32853, Thermo Fisher) para cuantificar muestras con una concentración de ADN de entre 1000 ng y 2 ng, y el kit Qubit dsADN HS (Q32854, Thermo Fisher) para muestras con una concentración de ADN de entre 100 ng y 0.2 ng.

Se prepara una solución de trabajo con 199  $\mu$ l de tampón más 1  $\mu$ l de reactivo Qubit para cada muestra; se mezclan 196  $\mu$ l de solución de trabajo con 4  $\mu$ l de muestra, se vortea unos segundos y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente (TA); pasado el tiempo de incubación, se lee la concentración de ADN en el fluorómetro Qubit 2.0. Los estándares de ADN se miden de la misma manera, pero se utiliza 190  $\mu$ l de solución de trabajo y 10  $\mu$ l de ADN estándar.

### 5.2.3 Amplificación PCR

#### 5.2.3.1 Amplificación con la enzima Taq ADN polimerasa

Se amplifica el ADN con enzima Taq ADN polimerasa (R001A, Takara), utilizando una pareja de cebadores específicos para cada zona Tabla 10.

Se mezclan los reactivos necesarios para cada reacción Tabla 9, en un volumen final de 25  $\mu$ l.

**Tabla 9 - Reactivos utilizados en el sistema de PCR con Taq ADN polimerasa**

Reactivo	Concentración final en reacción	Reacción ADNmt o ADNn	Reacción ADNn (DMSO)	Reacción ADNn (DMSO + GC rich)
DNTPs 2.5 mM	0.25 mM	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Tampón 10X	1X	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Cebador Forward (5 $\mu$ M / 2 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M	5 $\mu$ l/2.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l/2.5 $\mu$	2.5 $\mu$ l
Cebador Reverse (5 $\mu$ M / 2 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M	5 $\mu$ l/2.5 $\mu$	5 $\mu$ l/2.5 $\mu$	2.5 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.05U/ $\mu$ L	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
Agua MilliQ	-	9.25 $\mu$ l/14.3 $\mu$ l	7.25 $\mu$ l/13.3 $\mu$ l	11.3 $\mu$ l
DMSO	4%/2%	-	2 $\mu$ l/1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
GC rich (5 M)	0.5 M	-	-	2.5 $\mu$ l
ADN	100 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

\*Cuando aparecen dos valores en la misma celda el primero se utiliza cuando se amplifican zonas del ADNmt y el segundo para amplificar zonas del ADNn. La reacción + DMSO + GC rich solo se utiliza para amplificar ADNn.



Las reacciones se amplifican en las siguientes condiciones:

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	
Hibridación	* °C	45 s	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1
	4°C	∞	

\*La temperatura de hibridación varía entre 55°C y 63°C en función de los cebadores utilizados.

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados. Se prepara un gel al 1.5% de agarosa con tris-borato EDTA (TBE 1X) y 2.5 µl de bromuro de etidio (BrEt). Se cargan 3 µl de cada muestra con 1 µl de tampón de carga (Orange G 1X) y el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (10787018, Thermo Fisher Scientific). Se utiliza el tampón TBE 1X en la electroforesis y se aplica un voltaje de 100V durante 30 minutos. Para finalizar, se visualiza el gel en la cámara de fluorescencia (UNIVERSAL HOOD II, Bio-Rad).

Tabla 10 - Cebadores utilizados en las ampliaciones PCR con taq polimerasa

ID	Exón	Cebador directo	Cebador reverso	Tª
SLC25A4	1	5'GCGGGGATATAAGGGGGAGC3'	5'CAGCTCGCGCCGCATC3'	61°C
SUCLA2	1	5'CCCAGAAAAATGTCACTGCCG3'	5'AGTTCCAAAGGTCAAAGCTTGC3'	57°C
SPG7	1	5'GAATACAAGGCCGCTTCAAAAA3'	5'CTGGGCCTTACAGAGCAGAGC3'	61°C
TK2	1	5'CCGAGTGTTCGAAGTTATGGG3'	5'AGTAGGTGGGCGCATAGGGG3'	60°C
POLG	2	5'TCCACGTCTTCCAGCCAGTA3'	5'AGCCCGTAACAGGACCTCAG3'	59°C
DNA2	6	5'GAACCCGAGAGGCAGAGATTA3'	5'TCTTCCCCTCCCACATTCTC3'	57°C
TRMU E1	1	5'ACAGCGCAGAAGAAGAGCAGT3'	5'ACTACACAGGTGGAGGGCGA3'	58°C
MTND1	ADNmt	5'TACTTCACAAAGCGCCTTCC3'	5'ATGAAGAATAGGGCGAAGGG3'	61°C
m.4440	ADNmt	5'TATGATATGTCTCCATACCCATGGCAA TCT3'	5'GATTAATTAGTACGGGAAGGGTATAACC CA3'	58°.
Ligp15	-	5'GAGATATACCATGGGCAGC3'	5'CCCAAGGGGTTAT GCTAGTT3'	60°C

Tª: temperatura de hibridación

### 5.2.3.2 Amplificación con la enzima Expand High Fidelity

Se amplifica el ADN mediante el sistema PCR Expand High Fidelity (11732641001, Merck) utilizando una pareja de cebadores específicos para cada zona Tabla 12.

Se preparan dos reacciones diferentes de 25 µl.

Tabla 11 – Reactivos utilizados en PCR Expand High Fidelity

#### Reacción 1

Reactivo	[ ] final	Volumen en la reacción
DNTPs Mix (2.5 mM de cada dNTP)	200 µM de cada dNTP	4 µl
Cebador Forward (10 µM)	300 nM	1.5 µl
Cebador Reverse (10 µM)	300 nM	1.5 µl
ADN molde	0.1-250 ng	variable
Agua MilliQ	-	Hasta 25 µl

#### Reacción 2

Reactivo	[ ] final	Volumen en la reacción
Expand High Fidelity buffer (10X)	1X (1.5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
Expand High Fidelity enzyme mix	4%/2%	0.75 µl
Agua MilliQ	-	Hasta 25 µl

Se mezclan las dos reacciones y se amplifican en las siguientes condiciones:

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	15 s	
Hibridación	* °C	30 s	10
Extensión	68°C	2 min	
Desnaturalización	94°C	15 s	
Hibridación	* °C	30 s	20
Extensión	68°C	2 min (+ 5' por ciclo)	
Extensión final	72°C	7 min	1
	4°C	∞	

\*La temperatura de hibridación variará entre 55°C y 63°C en función de los cebadores utilizados.

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados. Se prepara un gel al 1.5% de agarosa con tris-borato EDTA (TBE 1X) y 2.5 µl de bromuro de etidio (BrEt). Se cargan 3 µL de cada muestra con 1 µL de tampón de carga (Orange G 1X) y el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (10787018, Thermo Fisher Scientific). Se utiliza el tampón TBE 1X en la electroforesis y se aplica un voltaje de 100V durante 30 minutos. Para acabar, se visualiza el gel en la cámara de fluorescencia (UNIVERSAL HOOD II, Bio-Rad).

*Tabla 12 -Cebadores utilizados en las amplificaciones con la enzima Expand High Fidelity*

ID	Cebador directo	Cebador reverso	Tª
ADNcRNASEH1	5'ATGTTCTATGCCGTGAGGAG3'	5'TCAGTCTTCCGATTGTTTAGC3'	54°C
DNdel	5' TTACGCCAAGCTTGGTACCGAG3'	5'GGTGGTCATATGATGTTCTATGCCGTGA3'	60°C

Tª: temperatura de hibridación

## 5.2.4 Secuenciación convencional o Sanger

### 5.2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplifica el ADN que se va a secuenciar con la taq polimerasa y una pareja de cebadores específica, tal y como se detalla en el apartado 4.2.3.1.

### 5.2.4.2 Purificación del producto de PCR

Se purifica el producto de PCR con el reactivo ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (78200, Affymetrix). Se mezclan 2 µl de ExoSAP con 5 µl de producto de PCR, y se incuba 15 minutos a 37°C seguidos de 15 minutos a 80°C.

### 5.2.4.3 Reacción de secuencia

Para realizar la secuenciación Sanger se utiliza el sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4337455, Thermo Fisher). Se mezclan los reactivos (Tabla 13) y se incuban a 96°C 1min, seguido de 25 ciclos de 96°C 10s, 5s a 50°C, y un ciclo final de 60°C 4min. Las reacciones se mantienen a 4°C hasta su purificación.

*Tabla 13 - Reactivos utilizados en la reacción de secuencia*

Reactivo	Fragmentos ADNmt	Fragmentos ADNn
Tampón BD 5X	1.75 µl	1.75 µl
Reaction mix BD v3.1	0.5 µl	0.5 µl
Cebador	0.7 µl	1.6 µl
Producto de PCR amplificado	1 µl	1 µl
H2O milliQ	6.05 µl	5.15 µl

#### 5.2.4.4 Purificación y secuenciación del producto de la reacción de secuencia

El producto de la reacción de secuencia se purifica con el sistema XTerminator Purification (4376486, Thermo Fisher). Se mezclan 10 µl de reacción de secuencia con 45 µl de reactivo SAM y 10 µl de XTerminator, y se incuba la placa durante 30 min en movimiento a 3800 rpm. Por último, el producto purificado se secuencia utilizando el secuenciador de 16 capilares ABI PRISM 3100 de Applied Biosystems.

#### 5.2.5 PCR larga del ADNmt (LPCR)

Se amplifican las moléculas de ADNmt con una, dos o tres parejas de cebadores, dependiendo de la técnica que vaya a realizar. Si se amplifica toda la molécula de ADNmt con una única pareja de cebadores (Mito16569), se genera un único amplicón de ADNmt de 16569 pb, mientras que si se utilizan dos (Mito1-2 y Mito3) o tres parejas de cebadores (Mito1, Mito2 y Mito3) Tabla 14, se generan dos (9307 pb y 7814 pb) o tres amplicones solapantes (3968 pb, 5513 pb y 7814 pb).

Tabla 14 - Cebadores utilizados en la amplificación del ADNmt completo

	Cebador Directo	Cebador Reverso	Posición en ADNmt (NC_012920)
Mito16569	5'CCGCACAAGAGTGCTACTCTCCTC3'	5'GATATTGATTCACGGAGGATGGTG3'	16426-16449 / 16425-16401
Mito1	5'ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTC TCGTCCC3'	5'GATATTGATTCACGGAGGATGGTG3'	16331-16365 / 3700-3729
Mito2	5'ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTC TCGTCCC2'	5'ATTGCTAGGGTGGCGCTTCCAATTAGG TGC3'	3646-3680 / 9124-9158
Mito1-2	5'ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTC TCGTCCC3'	5'ATTGCTAGGGTGGCGCTTCCAATTAGG TGC3'	16331-16365 / 9124-9158
Mito3	5'TCATTTTTATTGCCACAACCTCCTC GGACTC3'	5'CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTG TGGGCTAT3'	8753-8787 / 16532-16566

Se amplifica el ADNmt utilizando la LA Taq ADN polimerasa (RR002A, Takara). Se preparan 25 µl de reacción Tabla 15 y se realiza la amplificación con el siguiente programa: 1min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 10s a 98°C, 15min a 68°C y uno ciclo final de 10min a 72°C. La reacción se mantiene a 4°C hasta su procesamiento.

Tabla 15 - Reactivos utilizados en la reacción PCR con la LA Taq

Reactivo	Volumen
Tampón 10X Mg <sup>2+</sup>	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.5 µl
dNTPs 2.5 mM	4 µl
Cebador Directo 2 µM	2.5 µl
Cebador Reverso 2 µM	2.5 µl
LA Taq	0.25 µl
ADN (100 ng/µl)	0.5 µl
Agua milliQ	10.25 µl

Se visualizan los productos de PCR en un gel de agarosa al 0.8%. Se cargan 3 µL de cada muestra con 2 µL de tampón de carga (Orange G 1X), y el marcador lambda HindIII (SM0101, Thermo Fisher). La electroforesis se realiza en tampón TBE 1X, aplicando un voltaje de 70V durante tres horas; pasado el tiempo, se visualiza en la cámara de fluorescencia. Los fragmentos amplificados se cuantifican mediante el fluorómetro Qubit 2.0 como se indica en el apartado 4.2.2.

### 5.2.6 Estudio del número de copias de ADNmt mediante PCR a tiempo real (RT-PCR)

Se estudia el número de copias de ADNmt utilizando la técnica de RT-PCR, siguiendo el protocolo descrito por Andreu y colaboradores (172).

Esta técnica permite determinar el número de copias de ADNmt en una muestra a partir de la relación entre el número de copias de un gen mitocondrial (*MTRNR1*) y un gen nuclear de copia única (*RNAsaP*). Para cuantificar el ADNmt se utiliza la sonda TaqMan MTRNR1 (4331182, Thermo Fisher), marcada con el fluoróforo FAM, y los siguientes cebadores:

	Secuencia 5' --- 3'	Posición en ADNmt (NC_012920)
12S Cebador D	TACTTCACAAAGCGCCTTCC	805-824
12S Cebador R	ATGAAGAATAGGGCGAAGGG	903-927
12S Sonda	FAM-TGCCAGCCACCGCG-MGB	888-900

Para cuantificar el ADNn se utiliza el kit RNAsaP Control Reagent (4316844, Thermo Fisher), la sonda está marcada con el fluoróforo VIC.

La curva que se utiliza para calcular el número de copias de los dos genes se basa en la relación lineal de las Ct y el logaritmo del número de copias. Los calibradores son dos plásmidos en los que se han clonado los fragmentos generados por los cebadores que se utilizan en la amplificación. Una vez clonado el inserto se extrae el ADN y cuantifica el ADN. El número de copias de cada calibrador se calcula según su concentración y longitud.

La curva se genera mediante diluciones seriadas de la solución madre en Tris 10 mM pH8.

En cada reacción se mezclan los siguientes reactivos: 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (4304437, Thermo Fisher), 0.5 µl de cebador 12 S Forward (4µM), 0.5 µl de cebador 12 S Reverse (4µM), 0.5 µl de sonda 12 S (5µM) 1 µl de Assay RNAsaP, 2.5 µl de FNW y 5 µl de ADN.

Se determina cada muestra por duplicado y a dos concentraciones diferentes 5 y 2.5 ng/µl (diluciones en Tris 10mM pH8).

Las reacciones se preparan en una placa de 96 pocillos y la amplificación se lleva a cabo en el equipo PCR Real-Time 7500 (Thermo Fisher), con el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	
95°C	15 s	40
60°C	1 min	

### 5.2.7 Estudio de la secuencia del ADNmt mediante el array de resecuenciación de Affymetrix Mitochip V2.0

Primero, se amplifica el ADNmt de las muestras mediante LPCR, tal y como se detalla en la sección 4.2.4, utilizando las 3 parejas de cebadores Mito1, Mito2 y Mito3 Tabla 14, que generan 3 fragmentos solapantes.

Con cada array, se procesa un fragmento IQ, utilizado como control de hibridación; este control IQ se amplificó también por LPCR utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen
Tampón LA-Taq 10x	20 µL
25mM mg Cl <sub>2</sub>	20 µL
dNTP 2,5 mM	32 µl
Taq LA	2 µL
Agua MiliQ	104 µL
Cebador directo 7,5 Kb (20 µM)	6 µL
Cebador reverso (20 µM)	6 µL
ADN control IQ (0,2 pg/µl)	10 µL

Se cuantifican los fragmentos generados y el IQ, mediante el fluorómetro Qubit con el kit Qubit dsADN HS tal y como se detalla en la sección 5.2.4; se mezclan equimolarmente los 3 fragmentos y el control IQ. A continuación, se realiza una fragmentación enzimática con el kit GeneChip® Resequencing Assay (900447, Affymetrix) y un marcaje terminal de los fragmentos con una transferasa terminal y el fluoróforo Bio-N6-ddATP; para acabar, se hibrida la muestra con el chip y se lee con el Scanner GCS 3000. Los datos obtenidos se analizan mediante el software GSEQ.

## 5.2.8 Western blot

### 5.2.8.1 Preparación de las muestras

Se mezclan 10 µl de cada muestra (20 µg de proteína total) con 10 µl de tampón de carga 3X (Tris 2M pH 6.8, SDS 20%, Glicerol 10%, 2β-Mercaptoetanol 15%, Azul de bromofenol 0.2%). Se incuban las muestras 5 min a 95°C y se mantienen en hielo.

### 5.2.8.2 Preparación de los geles

Se prepara el gel de poliacrilamida al 15% de 1.5 mm de grosor, mezclando los siguientes reactivos:

	GEL CONCENTRADOR	GEL SEPARADOR
Acrilamida/bisacrilamida 40% (39:1)	2.5 ml	1 ml
Tris 2M pH 6.8		750 µl
Tris 3M pH 8.8	1.25 ml	
SDS 20%	50 µl	50 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Agua	6.15 ML	8.5 ml

### 5.2.8.3 Electroforesis

Se cargan 15 µl de cada muestra y 5 µl del marcador de peso molecular en los pocillos del gel. La electroforesis se lleva a cabo en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3), durante 30 min a 80 V y se incrementa el voltaje a 120 V hasta que se escapa el frente.

### 5.2.8.4 Transferencia

Se activa la membrana de PVDF sumergiéndola 5 min con metanol y 15 min con tampón de transferencia.

Se realiza la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF de dos maneras diferentes:

- Transferencia húmeda: la transferencia se realiza en una cubeta de electroforesis de geles de acrilamida, con tampón de transferencia, a 100 V fijando el amperaje a 350 mA durante 1 h y 30 min en frío.

- Transferencia semi-seca: la transferencia se lleva a cabo en el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry (BIO-RAD) durante 45 min a 15 V (sin sobrepasar los 290 mA por membrana).

#### **5.2.8.5 Inmunodetección**

Se bloquea la membrana con solución de bloqueo (TBS, Tween 20 0.1%, leche en polvo 5%) durante 1 h en agitación, y se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante 1 h a TA en movimiento.

Se hacen 3 lavados de 10 min con TTBS (TBS, Tween 20 0.1%) en movimiento para eliminar el exceso de anticuerpo.

Se incuba con el anticuerpo diluido en solución de bloqueo, durante 1 h a TA; después se hacen 3 lavados de 10 min en TTBS (TBS, Tween 20 0.1%).

Por último, se revela la membrana incubándola previamente con los reactivos del kit Immobilon quimoluminiscente de HRP (WBKLS0500, Millipore) y exponiéndola en una película fotográfica en una reveladora automática.

#### **5.2.8.6 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 15.0, utilizando la prueba estadística no paramétrica U Mann-Whitney, aplicada a muestras independientes, y el test t-student cuando el tamaño muestral lo permitió.

### **5.3 Secuenciación mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS)**

Se utilizaron las técnicas de secuenciación NGS para:

- 1- Secuenciar el ADNmt completo.
- 2- Estudio de paneles de genes a la carta.
- 3- Estudio de exoma clínico (TrueSight One) y de exoma completo.

#### **5.3.1 Estudio del ADNmt**

Se utilizaron dos plataformas de secuenciación NGS en el estudio del ADNmt, el sistema Ion PGM (Ion Torrent, Thermo Fisher) y la plataforma MiSeq (Illumina).

En la secuenciación NGS es necesario preparar librerías de ADN previa a la secuenciación. En este caso, se preparan a partir de la amplificación del ADNmt completo por LPCR. El proceso de amplificación del ADNmt es común para las dos plataformas.

##### **5.3.1.1 LPCR**

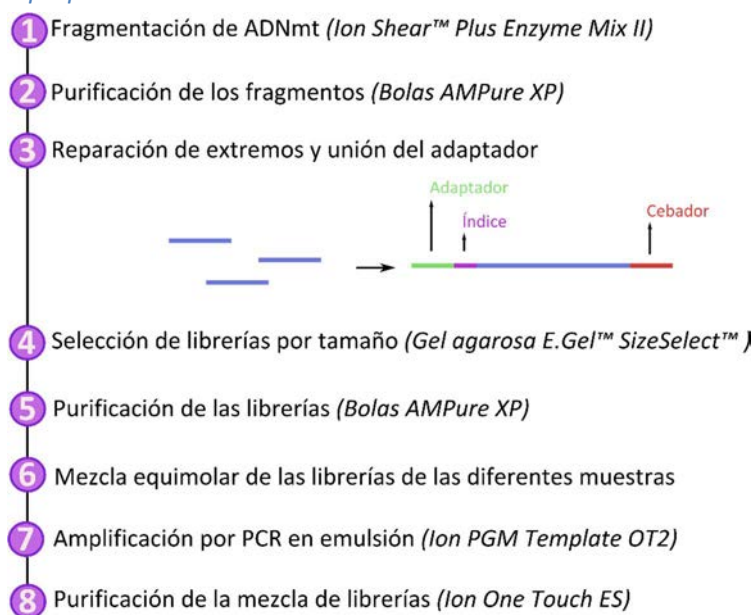
Se amplifican las moléculas de ADNmt con una o dos parejas de cebadores solapantes, tal y como se detalla en la sección 4.2.4. Si se amplifica el ADNmt con una pareja de cebadores (Mito16569), se genera un único fragmento de ADNmt, mientras que, si se utilizan dos parejas de cebadores (Mito1-2 y Mito3), se generan dos fragmentos solapantes.

Los fragmentos amplificados se cuantifican mediante el fluorómetro Qubit 2.0 como se indica en el apartado 4.2.2. Además, si se amplifican las muestras utilizando las dos parejas de cebadores que generan dos fragmentos solapantes, estos se deben mezclar equimolarmente.

### 5.3.1.2 Secuenciación mediante la plataforma Ion PGM

Las librerías de ADNmt se preparan con el kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library (4471269, Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones de Thermo Fisher mediante el protocolo MAN0009847 (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4471269>), para generar fragmentos de 200 pb. Esta consiste en una fragmentación enzimática con una mezcla de enzimas, seguida de una purificación mediante bolas magnéticas Agencourt™ AMPure™ XP; a continuación se añaden los adaptadores y los índices específicos para cada muestra, además se deben reparar los extremos de los fragmentos; se realiza una selección de fragmentos según tamaño usando el sistema E-Gel™ SizeSelect™ Agarose Gels (G661002, Thermo Fisher) y se cuantifican las muestras individualmente con el kit High Sensitivity ADN Agilent™ 2100 Bioanalyzer™ (5067-4626, Agilent). Para finalizar, se purifica cada librería con bolas magnéticas Agencourt™ AMPure™ XP y se mezclan las diferentes librerías equimolarmente para asegurar la misma representación de cada muestra durante la secuenciación; la concentración final debe de ser aproximadamente de 100 pM. El pool de librerías se amplifica mediante una PCR en emulsión con el kit Ion PGM Template OT2 200 (4480974, Thermo Fisher) en el aparato Ion OneTouch 2 System (4474779, Thermo Fisher). Por último, se purifican en el aparato Ion OneTouch ES (4474779, Thermo Fisher). La Figura 13 resume la preparación de las librerías de ADNmt con este kit.

Figura 13 – Esquema preparación de librerías PGM



La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma Ion PGM System, el sistema realiza lecturas únicas (single-end). La elección del chip (chip Ion 314, 316 o 318) donde se llevará a cabo la carrera, dependerá del número de muestras y la cobertura deseada.

### 5.3.1.3 Análisis de datos

El análisis de datos se realiza con el servidor Torrent Server (TS), el programa de alineación TMAP y los plugins VariantcallerforADNmt (v3.0.0) y Coverageanalysis (v.4.2.1.4). Los resultados se anotan usando las bases de datos MITOMAP y MitoImpact, con un programa propio escrito en Perl.

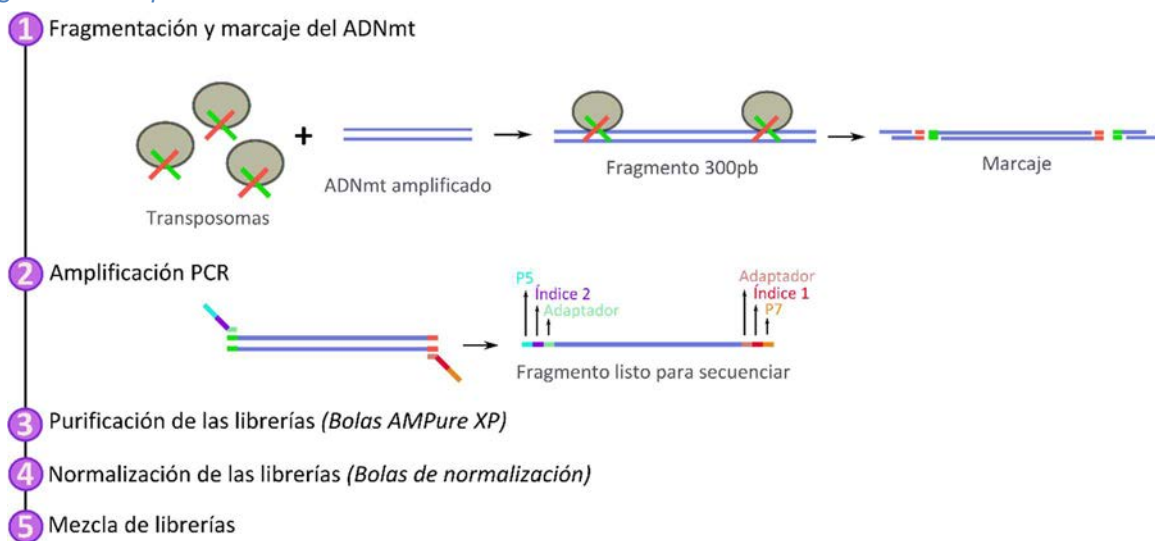
### 5.3.2 Secuenciación mediante la plataforma MiSeq (Illumina)

Se han utilizado dos sistemas diferentes para la preparación de las librerías de ADNmt.

#### 5.3.2.1 Preparación de librerías de ADNmt con el kit Nextera XT ADN Library Preparation

El kit Nextera XT ADN Library Preparation (FC-131-1096, Illumina) utiliza la enzima transposasa, para llevar a cabo la fragmentación del ADN, a la vez que añade un adaptador específico, que permite añadir posteriormente el cebador necesario para realizar la secuenciación con las plataformas de Illumina (P5 y P7) y los índices individuales a cada muestra que permite diferenciarla (Índice 1 y 2). Para preparar las librerías, se siguen las especificaciones de Illumina mediante el protocolo 15031942 V02 ([https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/nextera\\_xt\\_dna\\_kit/documentation.htm](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_xt_dna_kit/documentation.htm)) a partir del ADNmt amplificado mediante LPCR, tal y como se ha descrito en la sección 4.2.5. Una vez el ADNmt ha sido digerido y marcado, se lleva a cabo una purificación de los fragmentos con selección de tamaño, mediante las bolas Ampure XP, esto permite seleccionar solo los fragmentos de aproximadamente 300 pb; a continuación, se lleva a cabo a normalización de las librerías individuales con las bolas de normalización, que permitirá realizar la mezcla equimolar de las diferentes librerías. El siguiente diagrama, resume la preparación de las librerías utilizando este kit.

Figura 14 - Preparación de librerías con kit Nextera XT



#### 5.3.2.2 Preparación de librerías de ADNmt con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina

Se ha utilizado la fragmentación con la enzima NEBNext® dsADN Fragmentase (M0348L, NEW ENGLAND BioLabs), como alternativa para mejorar la homogeneidad de la cobertura de las muestras.

- Fragmentación de ADNmt amplificado: se mezclan 300 ng de ADNmt amplificado con 2 µl de 10X Fragmentase Reaction Buffer V2 y 2 µl de NEBNext dsADN Fragmentase, en una reacción de 20 µl de volumen final; la reacción se incuba a 37°C durante 17 min para conseguir fragmentos de 250 pb, al finalizar se añaden 5 µl de EDTA 0.5M para parar la reacción.

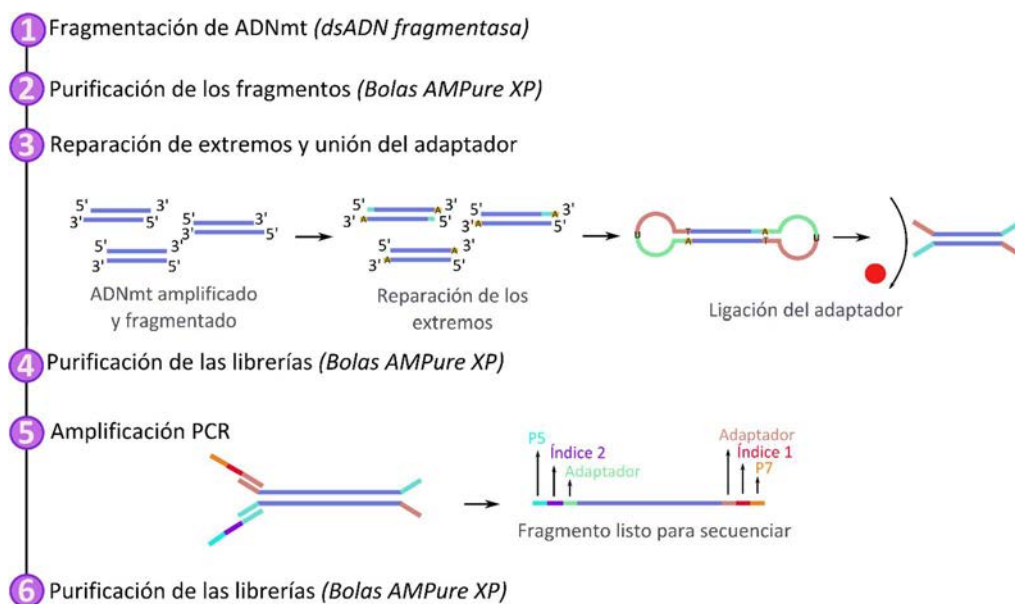
- Purificación del ADNmt fragmentado: se mezclan los 25 µl de ADNmt fragmentado con 25 µl de bolas Ampure XP, y se incuba 5 min a TA. A continuación, se coloca la placa con las muestras en un rack



magnético hasta que la mezcla se vuelve clara, y se transfiere el sobrenadante a un pocillo nuevo. Se añaden 43.5 µl de bolas Ampure XP al sobrenadante, se vortea e incuba 5 min a TA. Se coloca la placa con las muestras en un rack magnético hasta que la mezcla se vuelve clara, y se descarta el sobrenadante. Se hacen 2 lavados de 30 s con 200 µl de etanol 80% y se dejan secar las bolas Ampure XP durante 15 min. Se añaden 60 µl de agua miliQ, vorteamos la mezcla y se incuba 5 min a TA. Por último, se coloca la placa en el rack magnético y cuando la solución se vuelve clara se aspira y transfiere 55.5 µl de sobrenadante a una nueva placa de PCR. En este punto, el ADNmt fragmentado está preparado para iniciar la preparación de las librerías.

Una vez se fragmenta y purifica el ADNmt amplificado, se preparan las librerías de ADN, utilizando el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina (E7645L, NEW ENGLAND BioLabs). La preparación de las librerías se realiza siguiendo las especificaciones de New England Biolabs del manual E7370 (<https://www.neb.com/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina#tabselect2>). Utilizando este kit, se reparan con una mezcla de enzimas (End Prep Enzyme Mix) los extremos de los fragmentos del ADNmt, para que se pueden ligar los adaptadores necesarios para que se lleve a cabo la secuenciación; por último, mediante una amplificación se añaden los índices a cada muestra. La Figura 15 resume la preparación de las librerías utilizando este kit.

Figura 15 - Preparación de librerías con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep



### 5.3.2.3 Preparación del pool de librerías para secuenciar en la plataforma MiSeq

Se deben mezclar las librerías individuales en un pool único equimolar antes de realizar la carga en el secuenciador. Si se ha congelado la placa, se centrifuga 1 min a 1.000 g.

#### 5.3.2.3.1 Librerías preparadas con el kit Nextera XT

Se transfieren 5 µl de cada librería individual a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se añaden 24 µl de la mezcla anterior, a otro tubo de 1.5 ml con 576 µl de Hybridization buffer (HT1); se vortea la mezcla y se incuba durante 2 min a 96°C. Inmediatamente después se coloca el tubo en hielo durante 5 min y se mantiene hasta que se carga en el secuenciador.

#### 5.3.2.3.2 *Librerías preparadas con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina*

Se comprueba el tamaño de las librerías mediante el aparato Agilent Bioanalyzer utilizando el kit Agilent ADN 1000 (5067-1504, Agilent). Se cuantifican las librerías con el fluorímetro Qubit 2.0 usando el kit Qubit dsADN HS como se detalla en la sección 4.2.2. Se calcula la molaridad media de los fragmentos de ADN de las librerías (normalmente se obtienen fragmentos de 200 pb) con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración nM} = \frac{\text{concentración ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} * \text{tamaño medio de la librería}} * 10^6$$

Se diluye cada librería en TE 0.1X hasta una concentración de 4nM, y se mezclan 5  $\mu\text{l}$  de cada librería en un tubo eppendorf. En otro tubo, se mezclan 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de librerías con 5  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2N. Se vortea la mezcla, se centrifuga 1 min a 280 g, y se incuba 5 min a TA. Por último, se añaden 990  $\mu\text{l}$  de HT1. En este momento, el pool de librerías tiene concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Se carga el secuenciador con las librerías a una concentración de 8  $\mu\text{M}$ , por eso se deben diluir (se mezclan 240  $\mu\text{l}$  de pool a 20  $\mu\text{M}$  con 360  $\mu\text{l}$  de HT1). Por último, se añaden 32  $\mu\text{l}$  de PhiX Control V3 (FC-110-3001, Illumina) a 8  $\mu\text{M}$  a los 600  $\mu\text{l}$  de pool de librerías a 8  $\mu\text{M}$ . La mezcla se mantiene en hielo hasta la carga en el secuenciador.

#### 5.3.2.4 **Secuenciación en la plataforma MiSeq**

La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma MiSeq (Illumina), el sistema realiza lecturas dobles (pair-end). Para las librerías preparadas con el kit Nextera XT se utiliza el kit Reagent V2 300 cycles (MS-102-2002, Illumina), en las librerías preparadas con el kit NEBNext  $\mu\text{lra}$  II ADN se utiliza el kit Reagent V2 500 cycles (MS-102-2003, Illumina). La cobertura media que se obtiene es de 5.000 X.

El secuenciador tarda aproximadamente unas 24 horas en completar el proceso de secuenciación y generación de datos en el caso de utilizar el kit Reagent V2 300 cycles y 39 horas si se utiliza el kit Reagent V2 500 cycles. Antes de iniciar la carrera, se indica en el secuenciador los índices específicos de cada muestra y el tipo de análisis que debe realizar, que en este caso es resecuenciación, ya que el alineamiento de bases se realiza frente al genoma mitocondrial (NC\_012920).

#### 5.3.2.5 **Análisis de datos**

El análisis primario de los datos se lleva a cabo mediante el software Real-time analyses (RTA), el cual realiza el análisis primario de imagen, el llamamiento de bases y la asignación de la puntuación de calidad de cada base en cada ciclo. El análisis secundario de datos se hace mediante el software MiSeq Reporter. Este, utiliza el alineador BWA y GATK como programa de llamamiento de bases (variant caller), el filtro de calidad que se utiliza es de 30 (Q30). Los resultados se anotan utilizando la base de datos MITOMAP mediante una base de datos ACCESS interna. Para la visualización de los perfiles de cobertura se utilizan los archivos bam y el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

### 5.3.3 **Estudio de genes nucleares involucrados en la replicación y mantenimiento del ADNmt**

Se ha utilizado un panel de genes a la carta implicados en la replicación y mantenimiento del ADNmt, en pacientes con síndrome de deleción o depleción. El panel también se ha aplicado en otros casos donde la clínica del paciente sugiere que puede tener algún defecto en los genes incluidos en el panel.

### 5.3.3.1 Diseño de GeneRead ADNseq Targeted Panel con la tecnología GeneRead NGS System (QIAGEN)

Se diseñó un panel de genes GeneRead Custom ADNseq Gene Panel V1 (181902, QIAGEN) con la tecnología de QIAGEN basada en la amplificación de las regiones diana mediante mezclas de cebadores que amplifican cientos de zonas a la vez. El diseño del panel se realizó utilizando el software en línea de QIAGEN (<https://www.qiagen.com/es/shop/genes-and-pathways/custom-products/custom-array-products/generead-designer/#design>). Más tarde, se diseñó un segundo panel GeneRead Custom ADNseq V2 (181942, QIAGEN). Las características de los dos paneles se describen en la Tabla 16.

Tabla 16 - Características de los dos paneles diseñados

PANEL	Custom GeneRead ADNseq Panel V1	Custom GeneRead ADNseq Panel V2
<b>NÚMERO DE GENES</b>	13	17
<b>GENES</b>	<i>DGUOK, MNF2, MPV17, OPA1, POLG, POLG2, RRM2B, SLC25A4, SUCLA2, SUCLG1, TK2, TWNK, TYMP</i>	<i>DGUOK, MNF2, MPV17, OPA1, POLG, POLG2, RRM2B, SLC25A4, SUCLA2, SUCLG1, TK2, TWNK, DNA2, SPG7, MGME1, RNASEH1, FBXL4</i>
<b>ZONAS A SECUENCIAR</b>	183	197
<b>AMPLICONES</b>	606	400
<b>TAMAÑO DE AMPLICONES</b>	120 pb	230 pb
<b>POOL DE AMPLICONES</b>	4	3
<b>COBERTURA TEÓRICA</b>	95%	99.9%

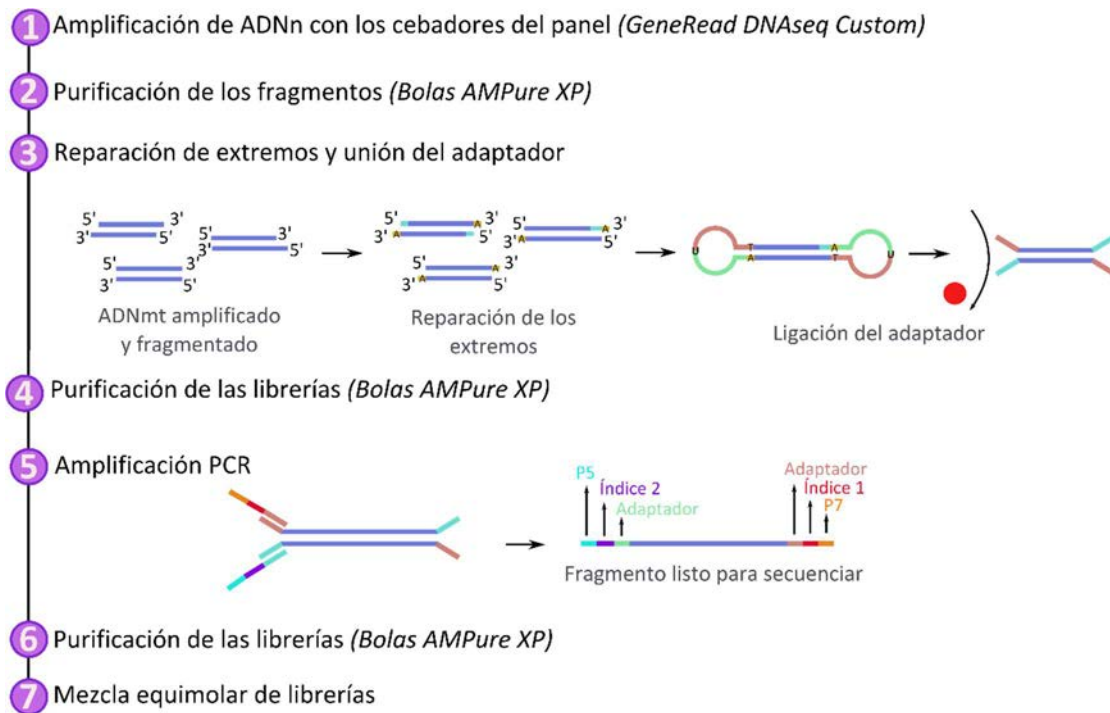
### 5.3.3.2 Preparación de las librerías de ADN y secuenciación en la plataforma MiSeq

Previamente a la preparación de las librerías, se amplifica el ADN de cada muestra con el panel GeneRead DNaseq Custom V1 o V2 para enriquecer las zonas de interés. La amplificación se lleva a cabo siguiendo las especificaciones de QIAGEN mediante el manual GeneRead™ DNaseq Targeted Panels Handbook V2 V06/2015 (<https://www.qiagen.com/us/shop/sequencing/generead-dnaseq-custom-panels-v2/#resources>). Se necesitan 4 µL de ADN a una concentración de 2.5 ng/µl para cada pool de amplicones. Las librerías se preparan con el kit NEBNext ultra II ADN Library Prep for Illumina, como se ha descrito en la sección 4.3.1.3. La Figura 16 resume la preparación de las librerías utilizando este kit.

### 5.3.3.3 Secuenciación en la plataforma MiSeq

La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma MiSeq (Illumina), el sistema realiza lecturas dobles (pair-end). En la secuenciación, se utiliza el kit Reagent V2 500 cycles (MS-102-2003, Illumina). La cobertura media que se obtiene es de 300 X. El secuenciador tarda aproximadamente unas 39 horas en completar la carrera y el análisis de los datos. Antes de iniciar la carrera, se especifica en el secuenciador los índices de cada muestra y el tipo de análisis que debe realizar, que en este caso es PCR amplicon. El alineamiento de bases se realiza frente al genoma completo (GRCh37/hg19).

Figura 16 - Preparación de librerías en la secuenciación con el panel a la carta de genes



### 5.3.3.4 Análisis de datos

El análisis primario y secundario de los datos se lleva a cabo con los softwares RTA y MiSeq Reporter de la misma manera que para el análisis de la secuenciación del ADNmt, pero la anotación de variantes se realiza con el software Variant Studio cargando los archivos vcf que genera el programa MiSeq Reporter. Además, se realiza un segundo análisis secundario y la anotación de las variantes mediante la plataforma GeneRead Targeted Exon Enrichment Panel Data Analysis de QIAGEN (<http://ngsdata.analysis.com/NGS2/>), cargando los ficheros FASTQ generados por el secuenciador. Para la visualización de las secuencias se cargan los archivos bam en el programa IGV. El llamamiento de bases se realizó utilizando los transcritos canónicos de los genes con las siguientes referencias: *DGUOK* (NM\_080916), *MFN2* (NM\_014874), *MPV17* (NM\_002437), *OPA1* (NM\_130837), *POLG* (NM\_002693), *POLG2* (NM\_00715), *RRM2B* (NM\_015713), *SLC25A4* (NM\_001151), *SUCLA2* (NM\_00380), *SUCLG1* (NM\_003849), *TK2* (NM\_004614), *TWNK* (NM\_021830), *DNA2* (NM\_0010804), *SPG7* (NM\_003119), *MGME1* (NM\_052865), *RNASEH1* (NM\_002936), *FBXL4* (NM\_012160), *TYMP* (NM\_001953).

### 5.3.3.5 Amplificación de las regiones no cubiertas

Las zonas que no están cubiertas por el panel se amplifican y se secuencian con secuenciación convencional; la amplificación por PCR previa se realiza como se detalla en la sección 4.2.3.1, utilizando los cebadores diseñados para los genes *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SPG7*, *TK2*, *POLG* y *DNA2*. Las reacciones para amplificar los exones de los genes *SUCLA2*, *SPG7* y *TK2* se realizaron con DMSO; las reacciones para amplificar los exones de los genes *DNA2*, *POLG* y *SLC25A4*, se añadió DMSO y GCrish.

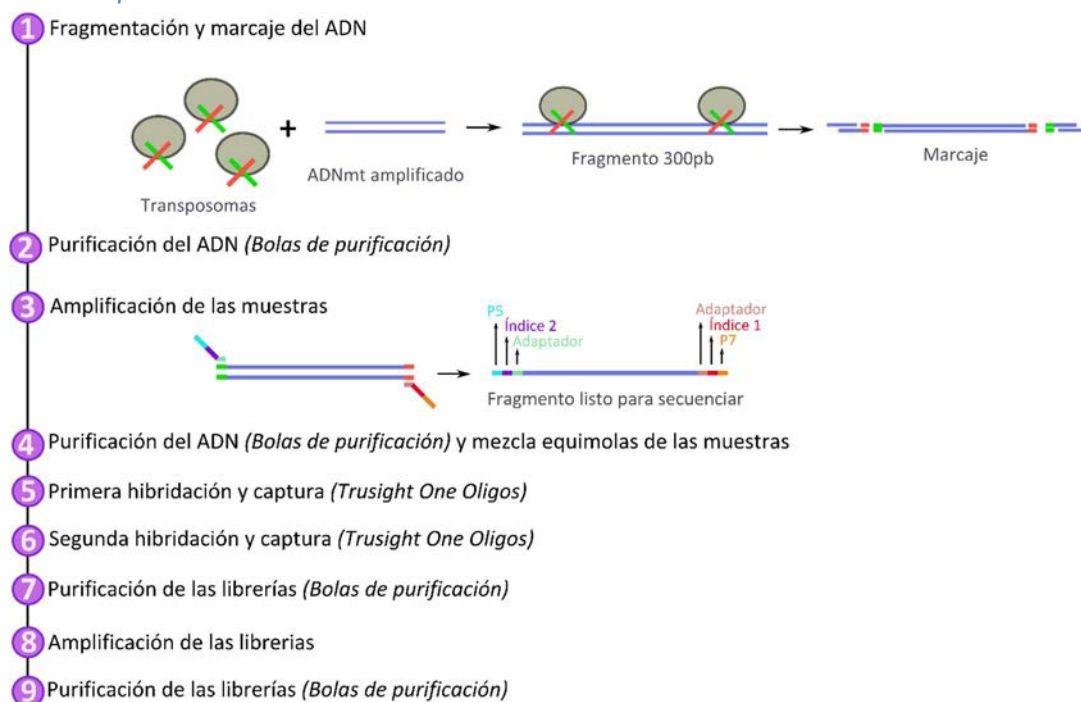
### 5.3.4 Exoma clínico (Trusight One)

El panel Trusight One (TSO) permite secuenciar las regiones exónicas de 4.813 genes involucrados en fenotipos clínicos conocidos. Se utilizan sondas específicas para capturar las regiones que se van a secuenciar. Las librerías de ADN se preparan según las especificaciones de Illumina siguiendo el protocolo 15046431Rev.1 ([https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/trusight\\_one\\_kit.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit.html)), a partir de 50 ng de ADN; el primer paso de la preparación de las librerías es la fragmentación, marcaje del ADN y la adición de los adaptadores con la enzima transposasa que se utiliza en el kit Nextera XT; después se realizan dos hibridaciones del ADN con las sondas específicas que capturan las regiones de estudio. La Figura 17 resume el proceso de preparación de las librerías.

#### 5.3.4.1 Validación y preparación de la librería para la secuenciación

Se hace una dilución 1/15 del pool de librerías y se mide la concentración en el fluorómetro Qubit con el kit Qubit dsADN HS, tal y como se describe en la sección 4.2.2. Se calcula la molaridad aplicando la fórmula descrita anteriormente, asumiendo un tamaño de fragmentos de 650 pb. Es necesario diluir las librerías en bufer de resuspensión hasta una concentración de 1.25 nM. Se comprueba el tamaño de las librerías cargando 1 µl de esta, en un chip ADN 1.000 en el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer. Para finalizar, se mezclan en un tubo eppendorf 10 µl de librería a 1.25 nM con 10 µl de NaOH 0.1N, se incuba 5 min a TA y se añaden 980 µl de HT1. Se mantiene el tubo en hielo hasta que se carga el secuenciador.

Figura 17 - Preparación de librerías en la secuenciación con el exoma clínico



#### 5.3.4.2 Secuenciación en la plataforma MiSeq

La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma MiSeq (Illumina), el sistema realiza lecturas dobles (pair-end) de 150 pb. En la secuenciación, se utiliza el kit MiSeq Reagent V3 (MS-102-3001, Illumina). La cobertura media que se obtiene es de 300 X. El secuenciador tarda aproximadamente unas 50 horas en completar la carrera y el análisis de los datos. Antes de iniciar la carrera, se especifica en el

secuenciador los índices de cada muestra y el tipo de análisis que debe realizar, que en este caso es Enrichment. El alineamiento de bases se realiza frente al genoma completo (GRCh37/hg19).

### 5.3.4.3 Análisis de datos

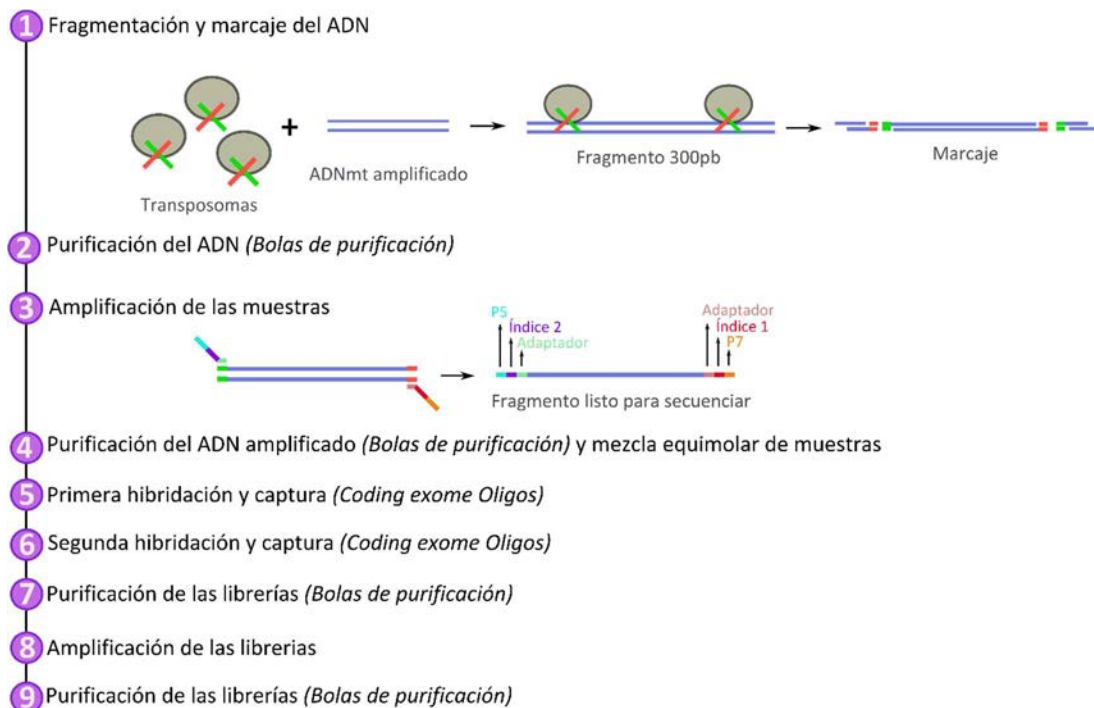
El análisis primario de los datos se realiza mediante el software interno RTA y el secundario con el software MiSeq Reporter. Los archivos gvcf se anotan utilizando el programa Variant Studio. Para la visualización de las secuencias se utilizan los archivos bam y el programa IGV.

### 5.3.5 Exoma completo

La secuenciación del exoma completo, permite estudiar todas las regiones exónicas del genoma, y las zonas intrónicas flanqueantes (unas 20 pb). Se utilizó el kit Truseq Rapid Exome Library Prep (FC-144-1000, Illumina) para preparar las librerías. El kit utiliza sondas específicas para capturar las zonas que se van a secuenciar. La preparación de las librerías de ADN es similar a las de preparación del panel TSO (apartado 4.3.4).

Las librerías de ADN se preparan según las especificaciones de Illumina siguiendo el protocolo 100000000751 v01 ([https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_kits/trusight\\_one\\_kit.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/trusight_one_kit.html)), a partir de 50 ng de ADN. El primer paso de la preparación de las librerías es la fragmentación, marcaje del ADN y la adición de los adaptadores con la enzima transposasa que se utiliza en el kit Nextera XT; después se realizan dos hibridaciones del ADN con las sondas específicas que capturan las regiones exónicas de todo el genoma. El siguiente esquema resume el proceso de preparación de las librerías.

Figura 18 - Preparación de librerías en la secuenciación con el exoma completo



#### 5.3.5.1 Secuenciación en la plataforma NextSeq500

La secuenciación se lleva a cabo en la plataforma NextSeq500 (Illumina), el sistema realiza lecturas dobles (pair-end) de 75 pb. En la secuenciación, se utiliza el kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75

cycles) (FC-404-2005, Illumina). La cobertura media que se obtiene es de 100 X. Aproximadamente, el secuenciador tarda unas 18 horas en completar la carrera y en generar los archivos FASTQ. Antes de iniciar la carrera, se especifica en el secuenciador los índices de cada muestra y el tipo de análisis que debe realizar, que en este caso es FASTQ only. El alineamiento de bases se realiza frente al genoma completo (Homo\_sapiens, hg19 en la base de datos UCSC).

### 5.3.5.2 Análisis de datos

El análisis primario de los datos se realiza mediante el software interno RTA y el secundario con la plataforma de análisis DNAnexus (<https://platform.dnanexus.com>). Los archivos gvcf se anotan utilizando el programa Variant Studio. Para la visualización de las secuencias se utilizan los archivos bam y el programa IGV.

### 5.3.5.3 Bases de datos y predictores “in silico” de patogenicidad

En la priorización de las variantes encontradas durante la secuenciación masiva, se han consultado las siguientes bases de datos:

<b>Bases de datos poblacionales</b>	
<b>Base datos</b>	<b>Sitio web</b>
GnomAD Browser	<a href="http://gnomad.broadinstitute.org">gnomad.broadinstitute.org</a>
EXAC Browser	<a href="http://exac.broadinstitute.org">exac.broadinstitute.org</a>
1000g	<a href="http://www.internationalgenome.org">www.internationalgenome.org</a>
<b>Bases de datos de variantes</b>	
<b>Base datos</b>	<b>Sitio web</b>
Database of single nucleotide polymorphism (dbSNP)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP</a>
Human gene mutation data base at Cardiff (HGMD)	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk">http://www.hgmd.cf.ac.uk</a>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	<a href="https://www.omim.org">https://www.omim.org</a>
Human DNA Polymerase gamma Mutation Database	<a href="https://tools.niehs.nih.gov/polg/">https://tools.niehs.nih.gov/polg/</a>
MITOMAP	<a href="https://www.mitomap.org/MITOMAP">https://www.mitomap.org/MITOMAP</a>
Human Mitochondrial Genome Database (mtDB)	<a href="http://www.mtodb.igp.uu.se">http://www.mtodb.igp.uu.se</a>

Cuando se encuentran variantes no descritas se utilizan los siguientes predictores de patogenicidad para caracterizar las variantes “in silico”:

<b>Algoritmos predictores de patogenicidad</b>	
<b>Programa</b>	<b>Sitio web</b>
Scale-invariant feature transform (SIFT)	<a href="http://sift.jcvi.org">http://sift.jcvi.org</a>
Prediction of functional effects of human nsSNPs (POLYPHEN)	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
MUTATION TASTER	<a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)	<a href="http://cadd.gs.washington.edu">http://cadd.gs.washington.edu</a>
POLG Pathogenicity Prediction Server	<a href="http://polg.bmb.msu.edu">polg.bmb.msu.edu</a>

## 5.3.6 Estudio del efecto de nuevas variantes en el ADNmt

### 5.3.6.1 Caracterización de la variante m.3634A>G en el gen *MTND1*

Durante el proceso diagnóstico de un paciente con fenotipo clínico de LHON, se encontró la variante m.3634A>G no descrita anteriormente en las bases de datos. Para estudiar su patogenicidad se llevaron a cabo estudios funcionales a partir de la generación de una línea de híbridos transmitocondriales.

#### 5.3.6.1.1 Descripción clínica del paciente

Hombre de 25 años con pérdida de visión bilateral repentina, precedida por mareos. El examen neurológico reveló una pérdida severa de la agudeza visual en ambos ojos y reflejo pupilar a la luz disminuido. La fundoscopia mostró los discos ópticos pálidos. El patrón del potencial evocado visual (PVEP) mostró una ausencia de respuesta en ambos ojos. La electroretinografía (ERG) mostró una reducción de la amplitud N95 bilateral con amplitud P50 normal. El ERG de campo completo era normal en ambos ojos. En conjunto, los datos obtenidos del examen físico concluyeron que el paciente sufría una disfunción bilateral severa de las células ganglionares de la retina y del nervio óptico.

La EMG y ENG fueron normales, así como la resonancia magnética craneal (MRI), en la que no se vio anomalías en el nervio óptico o la materia blanca en el hemisferio cerebral. La tomografía de coherencia óptica mostró un adelgazamiento de la capa de fibra nerviosa de la retina en ambos ojos, aunque fue más pronunciada en el ojo izquierdo. El paciente presentaba unos valores elevados de lactato en sangre, 3.3 y 3.0 mmol / L (rango normal entre 0.63 y 2.45).

Dos años antes, el paciente había sido tratado por el oftalmólogo para extraer un cuerpo extraño de su ojo izquierdo, y no se habían detectado anomalías del nervio óptico. La madre de 57 años del paciente, que vive en Rumania, tiene la agudeza visual reducida. El paciente es el mayor de dos hermanos, y su hermano menor no tiene problemas de vista. No hay más información oftalmológica sobre estos u otros parientes. El seguimiento neurológico y oftalmológico después de 6 meses, no mostró cambios en la agudeza visual.

#### 5.3.6.1.2 Generación de cíbridos transmitocondriales

Los cíbridos transmitocondriales son líneas celulares que provienen de la fusión de células p0 (células sin ADNmt) con plaquetas del paciente de estudio, que aportará su ADNmt a la nueva población celular. Las células p0 que se usaron provienen de una línea de osteosarcoma, que son deficientes en timidina quinasa y resistentes a puomicina (143B TK- PR) Figura 19.

#### **Obtención de las plaquetas del paciente**

- Se transfirieron 10 ml de sangre del paciente a un tubo de 50 ml y se añade 1 ml de citrato sódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 0.1 M y NaCl 0.15 M. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 200 g durante 20 min a 12°C.
- Se aspiraron 3/4 partes del sobrenadante (evitando coger células de la interfase), se transfirieron a un tubo nuevo de 50 ml y se centrifugó a 1.500 g durante 20 min a 15°C. Se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en 2 ml de solución A (0.15 M NaCl / 15 mM Tris-HCl a pH 7.4) y se añadió solución A hasta tener 10 ml de solución final. Se dividió la mezcla en dos tubos con el mismo volumen, se centrifugaron a 1.500 g durante 20 min a 15°C y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet de las plaquetas de uno de los tubos, se mezcló con solución A + 20% FBS + 10% de DMSO y se congeló. El pellet del segundo tubo, se utilizó para realizar la fusión con las células p0.

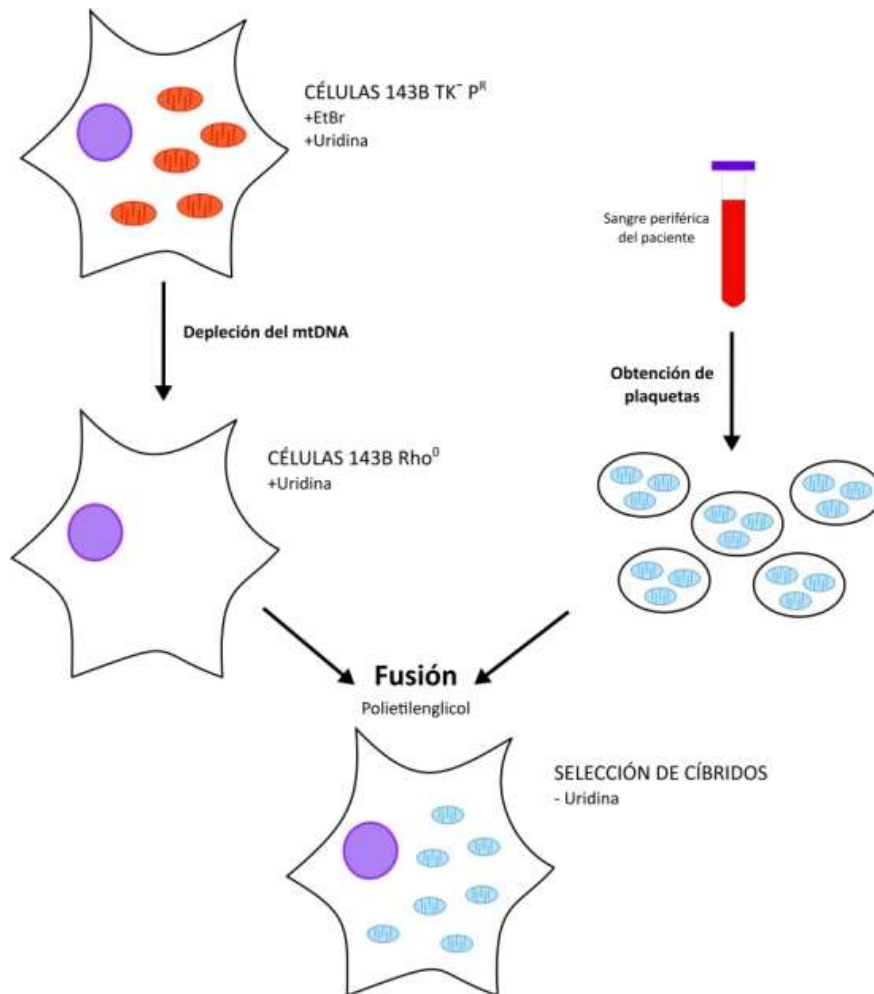
#### **Preparación de las células p0**

- Se sembraron células p0 en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, cuando llegaron al 80-90% de su confluencia, se tripsinizaron con 1 ml de tripsina 1X y se transfirieron a un tubo de 15 ml; después se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min. En cada fusión son necesarias  $10^6$  células.



- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 10 ml medio de cultivo p0 (DMEM, High glucose 10% FBS, 50 µg/ml de uridina).

Figura 19 - Esquema general del proceso de generación de cíbridos transmitocondriales



### Contaje de células

- Primero, se lavaron las placas de células con PBS, después se añadió 1 ml de tripsina 1X que se dejó actuar durante 2 min a 37°C y se resuspendió con 5 ml de medio de cultivo en un tubo de 15 ml; se centrifugó el tubo a 1.500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de medio de cultivo.

- Se mezclaron 15 µl de solución de células con 15 µl de azul de tripano. Se añadieron 10 µl de mezcla a cada cámara de la placa de contaje y se determinó la cantidad de células vivas mediante el contador de células COUNTESS Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific).

### Fusión de las plaquetas con las células p0

- Se añadieron 10<sup>6</sup> células p0 en suspensión sobre el pellet de plaquetas y se centrifugaron a 180 g durante 10 min a TA. Se aspiró y descartó el sobrenadante.

- Se añadió 0.1 ml de PEG al 42% por las paredes del tubo y se resuspendió el pellet; se incubó inmediatamente a TA durante 1 min y se resuspendió durante 30 s.

- Se añadieron 10 ml de medio  $\rho 0$  por las paredes del tubo, primero se resuspendió durante 10 s con 900  $\mu$ l y se añadió poco a poco el resto. Se centrifugó a 180 g durante 10 min a TA y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 10 ml de medio  $\rho 0$  tal y como se hizo en el paso anterior. Todas las resuspensiones se realizaron dando unos golpecitos a la base del tubo.

- Para finalizar, se sembró toda la suspensión en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro. Transcurridos dos días de la fusión se cambió el medio  $\rho 0$  a la placa. Cuando la placa llegó a la confluencia, se tripsinizaron las células con tripsina 1X y se sembraron en dos placas. Cuando llegaron a la confluencia, una de las placas se congeló (con solución 95% FBS + 5% DMSO) y con la otra se inició la selección de cíbridos.

### Selección de cíbridos mediante dilución límite

- Cuando la placa de células fusionadas llegó a la confluencia, se tripsinizaron las células con tripsina 1X y se diluyó el pellet en 10 ml de medio de selección (DMEM, 10% FBS dializado). Se realizó el conteo de las células en solución tal y como se detalla en la sección anterior, y se diluyó en medio de selección hasta una concentración de  $10^6$  cel/ml.

- En un tubo de 15 ml, se mezclaron 0.1 ml de la solución de células a  $10^6$  cel/ml con 9.9 ml de medio de selección (PRIMERA DILUCIÓN). Se mezclaron en un nuevo tubo de 15 ml, 0.1 ml de células de la primera dilución con 9.9 ml de medio de selección (SEGUNDA DILUCIÓN); en esta solución las células a una concentración de 100 cel/ml.

- A partir de las células de la SEGUNDA DILUCIÓN se realizaron 3 diluciones más:

Dilución a 10 cel/ml: se mezclaron en un tubo de 15 ml, 1 ml de la SEGUNDA DILUCIÓN con 9 ml de medio de selección. Se sembraron 0.2 ml en cada pocillo de una placa de 96. De esta manera cada pocillo debería contener, 2 células.

Dilución a 5 cel/ml: se mezclaron en un tubo de 50 ml, 1 ml de la SEGUNDA DILUCIÓN con 19 ml de medio de selección. Se sembraron 0.2 ml en cada pocillo de una placa de 96. De esta manera cada pocillo debería contener, 1 célula.

Dilución a 2.5 cel/ml: se mezclaron en un tubo de 50 ml, 1 ml de la SEGUNDA DILUCIÓN con 39 ml de medio de selección. Se sembraron 0.2 ml en cada pocillo de una placa de 96. De esta manera cada pocillo debería contener, 0.5 células.

- Después de sembrar todas las placas, se hizo un seguimiento diario, y se seleccionaron únicamente aquellos pocillos que solo presentaron un foco de crecimiento. Cuando los pocillos seleccionados llegaron a la confluencia, se pasaron a una placa de 24 pocillos, los que siguieron prosperando, se pasaron a una placa de 6 y posteriormente a placas individuales de 100 mm.

Una vez finalizado el proceso de selección y expansión de los cíbridos, se dejó de utilizar el medio de selección, y se pasó a utilizar medio DMEM High glucose + 10% FBS sin dializar.

Con esta técnica se garantiza que cada clon proveniente de una única célula.

### 5.3.6.1.3 Selección de cíbridos

Se comprobó la presencia de la variante mediante secuenciación Sanger, utilizando el ADN que se obtuvo de la extracción del ADN de los pellets celulares con el kit de QIAGEN, como se ha descrito en la sección 4.2.1. En la amplificación del ADN se utiliza la pareja de cebadores MTND1 y los reactivos del apartado 4.2.3.1 sin DMSO ni GC-rich. En la secuenciación Sanger también se utilizaron los cebadores MTND1. Además, se secuenció el ADNmt completo mediante el array de resecuenciación del ADNmt o Mitochip (v2.0), de las líneas de cíbridos obtenidas, tal y como se detalla en la sección 4.2.6, para comprobar que los cíbridos únicamente presentaban la variante m.3634A>G y no habían incorporado en el proceso otras variantes.

Para realizar los estudios, se escogieron 3 líneas de cíbridos controles no isogénicos, con un haplogrupo similar al de la línea de cíbridos con la variante m.3634A>G, para realizar los estudios en paralelo. La línea de cíbridos mutados pertenece al haplogrupo HV4b. De las 3 líneas de cíbridos controles provenientes de sujetos sanos, dos presentaban el haplogrupo H1 y una el H2.

### 5.3.6.1.4 Crecimiento celular en medio glucolítico y oxidativo

Se realizaron estudios de crecimiento de los cíbridos en medio glucolítico (con glucosa) y oxidativo (con galactosa).

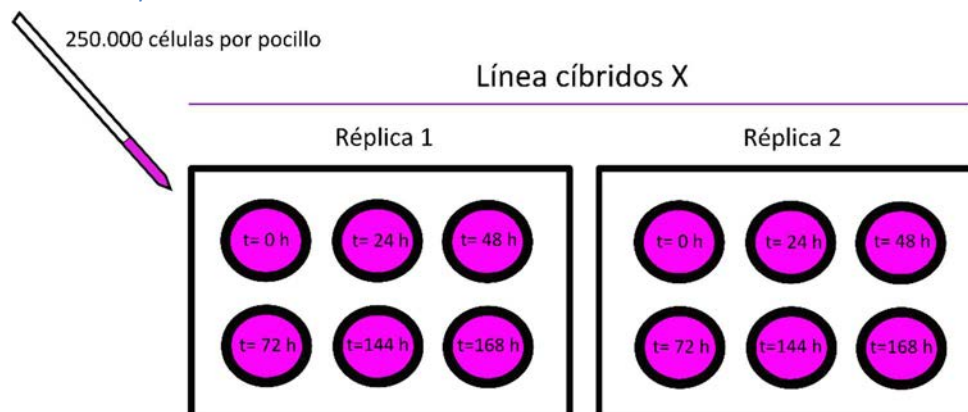
Preparación de medios de cultivo:

- Medio de mantenimiento: DMEM high glucose (4.5 g/L de glucosa) suplementado con 0.11 g/L de piruvato, glutamina 2 mM y 10% de FBS.
- Medio glucosa (glucolítico): DMEM high glucose (4.5 g/L de glucosa) suplementado con 0.11 g/L de piruvato, glutamina 2 mM y 10% de FBS dializado.
- Medio galactosa (oxidativo): DMEM sin glucosa suplementado con 0.11 g/L de piruvato, glutamina 2 mM, 1 g/L de galactosa y el 10% de FBS dializado.

- Se descongeló una alícuota de cada línea celular y se sembró en placas de 100 mm de diámetro con medio de mantenimiento; cuando las células llegaron a la confluencia se realizó su conteo tal y como se detalla en la sección 4.3.6.2.3.

- Se sembraron 2 placas de 6 pocillos de 34 mm con 250.000 células por cada línea celular (8 placas en total), con medio de mantenimiento (Figura 20).

Figura 20 - Diseño experimento de crecimiento celular



Se determinó el crecimiento de las células en medio glucolítico y oxidativo, a 6 tiempos diferentes: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h y 168 h, por duplicado.

- Pasadas 24 horas de la siembra, se cambió el medio por medio glucosa o galactosa, a todas las placas y se hizo el primer contaje, que correspondió al tiempo 0 h. Se hicieron contajes transcurridas 24, 48, 72, 144 y 168 horas.

- Después del contaje del número de células, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm y se extrajo el ADN y se determinó el número de copias de ADNmt tal y como de detalla en el apartado 4.2.1 y 4.2.6.

#### 5.3.6.1.5 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Se determinó el potencial de membrana mitocondrial, utilizando el fluoróforo tetrametilrodamina metil ester (TMRM). El fluoróforo TMRM es un colorante catiónico y lipofílico que atraviesa la membrana mitocondrial y se acumula en la matriz mitocondrial. Esta acumulación, dependerá del estado de polarización de las membranas mitocondriales. El colorante se excita a una longitud de onda de 548 nm y emite a la longitud de onda de 573 nm. El potencial de membrana se determina con el kit MitoPT TMRM Assay (9105, ImmunoChemistry Technologies).

- Se preparó la dilución de trabajo de 1X Assay Buffer, mezclando 5 ml de 10X Assay Buffer con 45 ml de agua destilada.

- Se reconstituyó el reactivo MitoPT añadiendo 100 µl de DMSO (Solución madre 1mM). Se preparó una solución de trabajo MitoPT 10 µM, diluyendo 1/100 la solución madre MitoPT en 1X Assay Buffer. El reactivo MitoPT contiene el fluoróforo.

- Se prepararon las células con las que se iban a llevar a cabo la determinación:

1- Control de autofluorescencia:  $5 \times 10^5$  células controles sin ningún tratamiento, para determinar la autofluorescencia de las células.

2- Control positivo de despolarización:  $5 \times 10^5$  células controles + 1 µl CCCP (agente desacoplante), se incubaron 20 min a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

3- Control negativo de despolarización:  $5 \times 10^5$  células controles + 1 µl DMSO, se incubaron 20 min a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

4- Líneas celulares:  $5 \times 10^5$  células de los 3 clones de la línea de cíbridos mutada y los 2 clones controles.

- Se mezclaron 980 µl de cada control o línea celular con 20 µl de MitoPT 10 µM y se incubaron 20 min a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. A continuación, se centrifugó a 300 g durante 5 min a TA y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendió el pellet en 1 ml de 1X Assay Buffer y se transfirió cada mezcla a un tubo de citometría.

- Se determinó la fluorescencia de cada tubo, utilizando el citómetro FACS Fortessa (Becton Dickinson). Se analizaron 10.000 células por cada muestra.

#### 5.3.6.1.6 Determinación de proteínas del sistema OXPHOS mediante Western Blot

Se realizó la determinación de proteínas del sistema OXPHOS por inmunohistoquímica, a partir de mitocondrias extraídas de los cíbridos controles y mutados.

### Extracción de mitocondrias de cultivos celulares

- Se cultivaron 3 clones de los cíbridos mutados y 3 líneas controles en placas de 100mm. Cuando las placas llegaron a la confluencia, se tripsinizaron las células con 1 ml de tripsina 1X y se centrifugaron 5 min a 1500 rpm. Se resuspendió el pellet de las células en 5 mL de tampón de homogenización (sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM pH 7.4, EGTA 1 mM, y una pastilla de inhibidor de proteasas (cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets; 11873580001; Roche)).
- Se lisaron las células golpeando 10 veces con un homogeneizador manual, y se transfirió el contenido a un tubo de 15 ml que se centrifugó 10 min a 1.500 g a 4°C.
- Se reservó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 5 mL de tampón de homogenización. Se golpeó el lisado 20 veces con el homogeneizador, y se transfirió el contenido a un tubo de 15 ml que se centrifugó 10 min a 1.500 g a 4°C.
- Se mezcló el sobrenadante con el que se reservó anteriormente y se centrifugó 10 min a 10.000 g a 4°C. El pellet resultante contendrá la fracción de mitocondrias celulares.
- Por último, se resuspendió el pellet en 1 ml de tampón de homogeneización.

### Cuantificación de proteínas de la fracción mitocondrial

Se determinó la concentración de proteínas de cada extracto utilizando el reactivo Coomassie Protein Assay (1856209; Thermo Scientific). Las determinaciones se realizaron respecto a una curva patrón de diluciones de albúmina 2 mg/ml (BSA) (23209, Thermo Scientific) en tampón de homogeneización.

- Se prepararon las diluciones de albúmina para la curva patrón: 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml y 0 mg/ml.
- Se prepararon dos diluciones diferentes (1/5 y 1/10) de los extractos de proteínas en tampón de homogeneización.
- Se mezclaron 5 µl de muestra o punto de la recta, con 200 µl de reactivo Coomassie, en un pocillo de una placa de 96. Se mezcló la muestra por pipeteo, y se leyó la absorbancia a 590 nm a en el lector de placas Elx800 (BioTek).

### Western blot

Se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida al 15%, con 20 µg de proteínas de la fracción mitocondrial de cada línea de cíbridos, tal y como se describe en la sección 4.2.7. Se realizó una transferencia húmeda de las proteínas del gel a la membrana de PVDF. La inmunodetección se llevó a cabo con el coctel de anticuerpos primarios anti-proteínas OXPHOS humanas (MitoProfile total OXPHOS human antibody cocktail, Mitosciences) y VDAC (Mitoscience), diluyendo 1/3.000 en solución de bloqueo. Se utilizó como anticuerpo secundario una anti-IgG policlonal de ratón unida a una peroxidasa (P0260, Dako), diluida 1/10.000 en solución de bloqueo.

Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría mediante el programa ImageJ 1.42q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). La cuantificación relativa (niveles relativos de proteína) se obtuvo mediante el ratio entre los valores de densitometría de las diferentes proteínas OXPHOS y los de proteína VDAC. Los resultados se expresaron como porcentaje del promedio del valor de densidad de la proteína NDUF8 con los cíbridos controles.

### 5.3.6.1.7 *Actividad de los complejos OXPHOS*

Se determinó la actividad de los complejos de la CTE según en el protocolo descrito por Medja y colaboradores (173).

#### Preparación de las muestras

- Se descongelaron y cultivaron células de 3 clones de cibridos mutados y 3 líneas controles, en placas de 100 mm. Cuando las placas llegaron a la confluencia, se tripsinizaron con 1 ml de tripsina 1X y se centrifugaron 5 min a 1.500 rpm. El pellet se resuspendió con 200 µl de tampón manitol (Manitol 225 mM, Sacarosa 75mM, Tris HCl 10mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2).
- El pellet de células, se homogeneizó sonicando 5 s.
- Se cuantificaron las proteínas utilizando el reactivo Comassie según el apartado 4.3.6.1.6. Se diluyeron los homogenados celulares hasta obtener una concentración de 2 mg/ml de proteína.

#### Preparación de los reactivos

Se prepararon los reactivos necesarios para llevar a cabo la determinación de la actividad de los complejos de la CTE (Tabla 17).

*Tabla 17 - Reactivos utilizados en la determinación de la actividad de los complejos OXPHOS*

#### **Reactivos de preparación inmediata**

---

- 2 mM NADH (N8129, Sigma Aldrich)
- 1 mM citocromo c (C7752, Sigma Aldrich)
- 10 mM KCN (31252, Sigma Aldrich)
- 100 µM citocromo c reducido (C7752, Sigma Aldrich). Diluir en 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.
- 2 mM oxalacetato (O4126, Sigma Aldrich). Diluir en 0.1 M de Tris\_HCl, pH 8.1.

#### **Reactivos de almacenamiento A -20°C**

---

- 25 mM decilubiquinona (D7911, Sigma Aldrich). Diluir en DMSO.
- 200 mM succinato (S7501, Sigma Aldrich)
- 50 mg/ml albúmina de suero bovino (A6003, Sigma Aldrich)
- 2.5 mM rotenona (R8875-1G, Sigma Aldrich). Diluir en etanol 95%/DMSO (1:1).
- 15 mM DTNB (D8130, Sigma Aldrich). Diluir en etanol al 95%.
- 10 mM acetilCoA (A2181, Sigma Aldrich)

#### **Reactivos de almacenamiento 4°C**

---

- 500 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5 (33611-265, Prolabo)
- 5 mM DCPIP (D1878, Sigma Aldrich)
- 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 (33611-265, Prolabo)
- 1 M Tris-HCl, pH 8.1 (28811-295, Prolabo)
- 100 mM Tris-HCl, pH 8.1 (28811-295, Prolabo)
- 10% Tritón-X100 (93443, Sigma Aldrich)

#### Reducción del citocromo c

Para iniciar el proceso, se prepararon 3 soluciones diferentes:

- Solución inicial (SI): se prepararon 15 ml de citocromo c 100 µM en tampón 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.

- Solución 100% oxidada (SO): se añadió ferricianuro de potasio (P4066, Sigma Aldrich) a 1 ml de SI, hasta que la solución se vuelve de color rojo-marrón oscuro.
- Solución 100% reducida (SR): se añadió ditionita sódica (7775-14-6, Sigma Aldrich) a 2 ml de SI, hasta que la solución se volvió de rosa salmón.

Inmediatamente después de preparar las soluciones, se leyó la absorbancia a 550 nm de la SO mediante el espectrofotómetro UV-2401PC (SHIMADZU); se hizo el blanco con la medida de la SO y se leyó la absorbancia a 550 nm (Abs550) de la SR. Se consideró el valor SR como 100% de reducción; el citocromo c se considera reducido cuando la Abs550 de la SI está entre el 90-95% de la de la SR.

### Medida de la actividad de los complejos del sistema OXPHOS

A continuación, se detalla la medida de la actividad de cada complejo por separado.

#### Actividad CI

El CI trasporta los electrones del cofactor reducido NADH a la ubiquinona. Para determinar su actividad, se registra la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm. Se sustituye la ubiquinona por decilubiquinona porque es más hidrofílica. Debido a que el NADH se oxida también por la actividad del NADH citocromo b5 oxido-reductasa (actividad insensible a la rotenona), se realizan dos ensayos en paralelo, una medida con rotenona y otra sin. La actividad específica (AE) del CI será la diferencia entre la actividad sensible a la rotenona y la insensible.

- Preparación de reactivos: medio de reacción (MR) (decilubiquinona 100  $\mu$ M,  $K_2HPO_4$  50 mM pH 7.5, BSA 3.75 mg/ml); NADH 2 mM; rotenona 2.5 mM y una mezcla 1:1 Etanol/DMSO (E-D)
- Para cada muestra, se mezclaron en un tubo de 5 ml 2.046  $\mu$ l de MR con 44  $\mu$ l de muestra a 2 mg/ml (homogenado de células). Se transfirieron 950  $\mu$ l de la mezcla a dos cubetas (634-8535, VWR), en una cubeta se añadieron 5  $\mu$ l de rotenona y en la otra 5  $\mu$ l de la mezcla E-D. Se incubaron las cubetas 5 min a 37°C dentro del espectrofotómetro, y se inició la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de NADH 2 mM a TA. Se leyó la absorbancia a 340 nm cada 15 s durante 3 min.
- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE del CI expresada en nmol/min.mg proteína:

$$AE\ C-I = 4032.3 * \frac{\text{Abs/ min sin rotenona} - \text{Abs/ min con rotenona}}{\text{mg/ml de proteína}}$$

#### Actividad CII

El CII transfiere los electrones del succinato a la ubiquinona. Para determinar su actividad se registra la reducción de DCPIP, midiendo la disminución de absorbancia del DCPIP oxidado a 600 nm. Se reemplaza la ubiquinona por decilubiquinona.

- Preparación de reactivos: MR ( $K_2HPO_4$  25 mM pH 7.5, succinato 20 mM, DCPIP 50  $\mu$ M, KCN 1mM, BSA 2 mg/ml) y decilubiquinona 25 mM a TA.
- Para cada muestra, se mezclaron en una cubeta 976  $\mu$ l de MR con 20  $\mu$ l de muestra a 2 mg/mL. Se incubaron las cubetas a 37°C dentro del espectrofotómetro durante 5 min y se leyó la absorbancia a

600 nm cada 15 s durante 3 min. Se inició la reacción añadiendo 4 µl de decilubiquinona 25 mM a TA y se leyó la absorbancia otra vez.

- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE del CII expresada en nmol/min.mg proteína:

$$AE\ C-II=1302.1 * \frac{\text{Abs/ min sin decilubiquinona}-\text{Abs/ min con decilubiquinona}}{\text{mg/ml de proteína}}$$

#### Actividad CI+III

Los CI y III transfieren los electrones del NADH (que se oxida a NAD+) al citocromo c. Esta actividad se puede cuantificar determinando el incremento de la absorbancia del citocromo c a 550 nm. La oxidación de NAD+ se inhibe en presencia de cianuro; además de esta oxidación del NADH, hay otra independiente al sistema OXPHOS. La actividad del conjunto de los CI+III es sensible a la rotenona; cuantificaremos la actividad de los dos complejos haciendo la diferencia entre la actividad sensible a la rotenona y la insensible.

- Preparación de reactivos: MR (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.5, KCN 1 mM, citocromo c 100 µM, BSA 1 mg/ml); NADH 2 mM; rotenona 2.5 mM y una mezcla 1:1 E-D.

- Para cada muestra, se mezclaron en un tubo de 5 ml 1.936 µl de MD con 44 µl de muestra a 2 mg/ml. Se transfirieron 900 µl de la mezcla a dos cubetas, en una se añadieron 5 µl de rotenona y en la otra 5 µl de la mezcla E-D. Se incubaron las cubetas a 37°C dentro del espectrofotómetro durante 5 min. Se inició la reacción añadiendo 100 µl de NADH 2 mM a TA. Se leyó la absorbancia a 550 nm cada 15 s durante 3 min.

- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE del CI+III expresada en nmol/min.mg proteína:

$$AE\ C-I+III=1351.4 * \frac{\text{Abs/ min sin rotenona}-\text{Abs/ min con rotenona}}{\text{mg/ml de proteína}}$$

#### Actividad CII+III

Los CII y III transfieren los electrones del succinato al citocromo c. La actividad se puede determinar midiendo el incremento de la absorbancia del citocromo c reducido a 550 nm. La oxidación de citocromo c, se inhibe por el cianuro.

- Preparación de reactivos: MR (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.5, KCN 1 mM, citocromo c 100 µM, succinato 20mM, BSA 2 mg/ml); para cada muestra, se mezclaron en una cubeta 880 µl de MR con 20 µl de muestra a 2 mg/ml; se realizó también una medida con manitol (sin homogenado de proteínas) para utilizarlo como blanco.

- Se incubaron las cubetas a 37°C dentro del espectrofotómetro durante 5 min, iniciamos la reacción añadiendo 100 µl de citocromo c 1 mM a TA y se leyó la absorbancia a 550 nm cada 20 s durante 3 min.

- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE del CII+III expresada en nmol/min.mg proteína:



$$AE\ C-II+III=1351.4* \frac{\text{Abs/ min con homogenado} - \text{Abs/ min sin homogenado}}{\text{mg/ml de proteína}}$$

### Actividad CIV

El CIV trasfiere los electrones del citocromo c reducido al oxígeno. Para determinar su actividad se registró la disminución de absorbancia del citocromo c a 550 nm.

- Se preparó el MR ( $K_2HPO_4$  50 mM pH 7, citocromo c reducido 100  $\mu$ M). Para cada muestra, se añadieron 980  $\mu$ l de MR en una cubeta, y se incubó 5 min a 37°C dentro del espectrofotómetro. Se inició la reacción añadiendo 20  $\mu$ l de muestra (2 mg/ml). Se leyó la absorbancia a 550 nm cada 15 s durante 3 min.

- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE del CIV expresada en nmol/min.mg proteína:

$$AE\ C-IV=1351.4* \frac{\text{Abs/min}}{\text{mg/mL de proteína}}$$

### Citrato sintasa

La enzima citrato sintasa cataliza la formación de citrato a partir de oxalacetato y acetil\_CoA en el ciclo de Krebs. Su actividad refleja la masa de mitocondrias en el tejido estudiado. El acetil\_CoA reducido derivado de la reacción, hace que el DTNB pase a TNB, este metabolito absorbe a una longitud de onda de 412 nm. Se mide la actividad de la enzima por el incremento de absorbancia del TNB a 412 nm.

- Se preparó el MR (DTNB 50 mM pH 7, acetil\_CoA 300  $\mu$ M, Triton X-110 0.1%, tris HCl 100 mM pH 8.1). Para cada muestra, se mezclaron en una cubeta 930  $\mu$ l de MR con 20  $\mu$ l de muestra (2 mg/ml), se incubó en el espectrofotómetro 5 min a 37°C y se leyó la absorbancia a 412 nm cada 15 s durante 4 min. Se inició la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de oxalacetato 10 mM y se leyó la absorbancia a 412 nm cada 15 s durante 4 min.

- Por último, se realizaron los cálculos para determinar la AE de la CS expresada en nmol/min.mg proteína:

$$AE\ CS=1838.2* \frac{\text{Abs/min con oxalacetato} - \text{Abs/min sin oxalacetato}}{\text{mg/ml de proteína}}$$

### 5.3.6.2 Estudio de la variante m.4440G>A en el gen MTTM

Se caracterizó la variante m.4440G>A en el gen *MTTM* en heteroplasmia, no descrita previamente, en un paciente con un fenotipo puramente miopático.

#### 5.3.6.2.1 Descripción clínica del paciente

Hombre de 56 años de origen marroquí; a los 53 años debutó con mialgia y debilidad muscular en las 4 extremidades. En el examen físico se observó una disminución en la fuerza del bíceps, tríceps, músculos extensores de la mano y músculos de los hombros y cadera, asociada a una atrofia severa principalmente en los músculos de la mano y el antebrazo. Presentaba una concentración elevada de CK en sangre. La EMG indicaba una condición miopática. La MRI de los músculos de las extremidades inferiores mostró una degradación de la grasa del glúteo, aductor y sóleo.

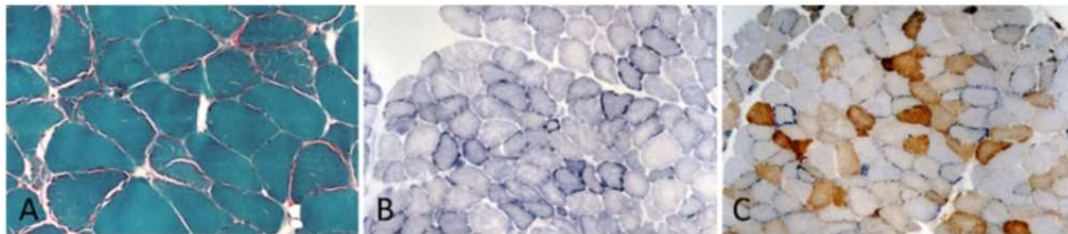
El estudio histológico e histoquímico del músculo vasto externo de cuádriceps mostró un gran número de FRR (Figura 21.A), fibras SDH+ (Figura 21.B) y COX- (Figura 21.C). La biopsia muscular presentó una disminución de la actividad de los CI, CI+CIII, CII+CIII, CIII y CIV de la CTE (Figura 21.D).

#### 5.3.6.2.2 Microdissección por captura láser (LCM)

A partir de la biopsia muscular congelada del paciente, se obtuvieron secciones transversales seriadas de un espesor de 20 micras y se realizó una tinción con citocromo oxidasa, tal y como se ha descrito en la bibliografía (174), para evidenciar la actividad COX en las fibras musculares. Una vez teñidas las preparaciones, se fijaron y deshidrataron (175).

A partir de las preparaciones teñidas, se llevaron a cabo dos microdisecciones independientes, una de fibras COX positivas y otra de COX negativas, por captura láser visualizando directamente las preparaciones bajo un microscopio (PALM Robot Microbeam, PALM Microlaser Technologies AG, Munich, Germany). Las fibras microdisccionadas, se recogieron simultáneamente en un tubo de 0.5 ml.

Figura 21 - Tinción de la biopsia del paciente y actividades de los complejos de CTE



D

Complejo	nmol/min.mg prot	
	Paciente	Referencia
NADH ubiquinona oxidoreductasa (CI)	0.4	25-42
NADH citocromo C oxidoreductasa (CI+III)	0.7	12-24
Succinato ubiquinona oxidoreductasa (CII)	125	43-71
Succinato citocromo C oxidoreductasa (CII+III)	21	22-34
Ubiquinol citocromo C oxidoreductasa (CIII)	72	100-154
Citocromo C oxidasa (CIV)	19	71-202
Citrato sintasa(CS)	413	178-321

\*A: la tinción tricrómica de Gomori muestra FRR. B: tinción SDH desvela fibras ragged blue e incremento de la tinción en los alrededores de la célula, que desvelan una acumulación subsarcolémica de mitocondrias. C: la doble tinción SDH/COX nos marca las fibras COX-. D: los resultados de la actividad enzimática de los complejos de la CTE se expresan en nmoles por minutos por miligramo de proteína total. En rojo, se marcan los complejos que tienen una actividad inferior a los valores de referencia.

#### 5.3.6.2.3 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de muestra de músculo con el kit QIAamp ADN Blood mini (sección 4.2.1) y el de las fibras COX+ y COX- con el kit QIAamp ADN Micro Kit (56304, QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### 5.3.6.2.4 Análisis de variante m.4440G>A con PCR- RFLP

Se estudió la variante m.4440G>A en muestra de músculo y fibras COX+ y COX- microdisccionadas mediante PCR-RFLP.

- Se amplificó el gen *MTTM* utilizando la pareja cebadores m.4440 y los reactivos del apartado 4.2.3.1 sin DMSO ni GC-rich. La amplificación generó un fragmento de 272 pb.
- Se purificó el producto de PCR con el kit UltraClean 96 PCR Cleanup (12596, QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Se digirió con la enzima BstXI (R0113S, New England Biolabs), 1µg del producto de PCR purificado (272 pb) durante 10 min a 37°C. Se inactivó la reacción incubándola 20 min a 80°C. La digestión del producto de PCR salvaje (sin la mutación), generó 2 fragmentos de 246 y 26pb, en cambio, la digestión del producto de PCR con la variante m.4440G>A, generó 3 fragmentos de 215, 31 y 26 pb.
- Se visualizaron los fragmentos generados en las digestiones mediante electroforesis en un gel de agarosa el 2.5% (p/v). Los fragmentos se cuantificaron con el kit Agilent ADN 1.000 en el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA).

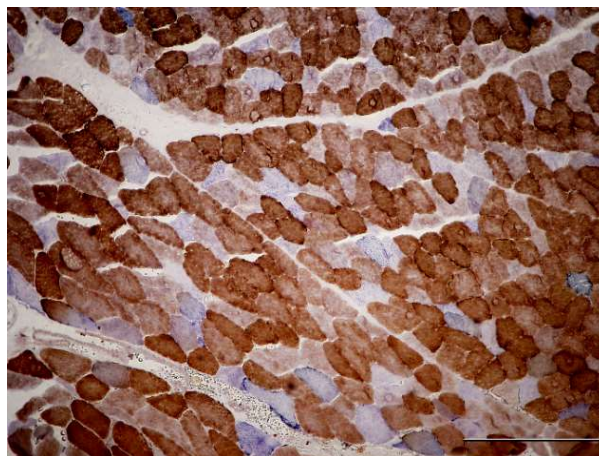
### 5.3.6.3 Estudio de las variantes en el gen *RNASEH1*

La aplicación en el diagnóstico del panel de genes a la carta detectó dos variantes en el gen *RNASEH1* en un paciente con PEO y deleciones múltiples.

#### 5.3.6.3.1 Descripción clínica del paciente

Hombre de 53 años de edad con una historia clínica de 2 años de evolución de ptosis palpebral progresiva sin diplopía, asociada a una sensación de fatiga precoz sin esfuerzo, disfagia leve y disartria con voz gangosa. La exploración física mostraba una ptosis palpebral moderada, no fatigable, asociada a una limitación al movimiento ocular bilateral. No presentó debilidad muscular franca exceptuando una debilidad lingual leve. El paciente tenía unas CK ligeramente elevadas (<500 u/L). La biopsia muscular realizada era compatible con miopatía mitocondrial, ya que presentaba FRR y COX- *Figura 22*. El paciente ha progresado poco, ya que está más o menos igual desde la primera visita realizada tres años antes; lo único que ha desarrollado, es una debilidad de la musculatura respiratoria por lo que necesita de ventilación nocturna no invasiva.

*Figura 22 - Biopsia muscular del paciente 1571*



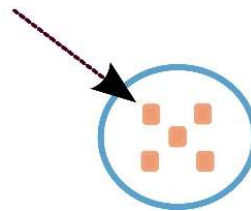
\* Aumento 100X. La barra de escala, indica 200 µm

#### 5.3.6.3.2 Obtención de fibroblastos a partir de biopsia de piel

- En primer lugar, se cortó la biopsia de piel en fragmentos de 1mm en una placa de petri llena de medio completo de cultivo de fibroblastos (MCF) (DMEM High-glucose, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina/antifungico, 1% glutamina, 1% piruvato).
- Se preparó una mezcla 1:2 de plasma humano y gelatina 1.5%, y se añadió una gota en el centro de una placa de Petri de 35mm. Se esparció bien la mezcla por toda base y antes de que se solidificara, se colocaron 5 trozos de piel simulando la cara 5 de un dado (Figura 23).

Figura 23 – Disposición de la biopsia de piel

Fragmentos 1mm de biopsia de piel



- Se añadieron unas gotas de MCF, y se dejó la placa 30 min en el incubador a 37º para que los fragmentos de piel quedaran bien pegados. A continuación, se añadieron 3 ml de MCF a la placa.
- Se dejaron crecer los fibroblastos unos días, hasta que se observó que las células derivadas de los diferentes trozos de piel llegaban a tocarse. En ese momento se pudo expandir el cultivo, y los trozos de piel se volvieron a cultivar repitiendo el proceso. Los fibroblastos que se obtuvieron, se congelaron en medio de congelación (90% FBS, 10% DMSO).

#### 5.3.6.3.3 Síntesis de la proteína RNASEH1 humana salvaje y mutada

##### **Obtención de los ADNc del gen RNASEH1 salvaje y mutado**

- Se extrajo el ARN de los fibroblastos del paciente con las variantes en el gen *RNASEH1* y de fibroblastos controles. La extracción se realizó utilizando el kit RNeasy Mini (Quiagen), siguiendo el protocolo de extracción de ARN total de células animales, a partir de los fibroblastos de una placa de Petri de 60 mm confluyente.

- Para obtener el ADNc a partir del ARN, se realizó una reacción de retrotranscripción a partir de 10 µl de ARN de los fibroblastos, utilizando el kit High-Capacity ADNc Reverse Transcription (Applied Biosystem), siguiendo el protocolo del fabricante y añadiendo 1µl de inhibidor de ARNasa a la master mix.

- Los ADNc generados, se amplificaron mediante el sistema PCR Expand High Fidelity para obtener solo el ADNc de gen *RNASEH1*, tal y como se explica en el apartado 4.2.3.2. En la amplificación se utilizó la pareja de cebadores ADNcRNASEH1. Mediante secuenciación Sanger (sección 4.2.4) y utilizando la misma pareja de cebadores que en la amplificación, se comprobó que no se hubieran incorporado nuevas variantes durante la amplificación.

## Clonaje de los ADNc salvaje y doble mutado de la RNASEH1 humana

### Ligación de los ADNc de la RNASEH1 con el plasmido pCR2.1-TOPO TA

La ligación se realizó utilizando el kit de clonación TOPO TA (45-1641, Invitrogen). Se prepararon reacciones de 6µl (4 µl ADNc, 1µl solución salina y 1µl vector TOPO), que se incubaron 5 min a TA y se mantuvieron en hielo.

### Transformación de bacterias y selección de clones

Se realizó la transformación de bacterias Escherichia Coli quimiocompetentes One Shot Top 10 (C404010, Invitrogen).

- Se descongeló un vial de 50 µl de bacterias en hielo, al que se añadieron 2 µl de reacción de ligación. Se incubó la mezcla 30 minutos en hielo, e inmediatamente se realizó un choque térmico de 30 segundos en un baño a 42°C y 5 minutos en hielo.
- Se añadieron 250 µl de LB (20g/L) y se agitó el vial en posición horizontal durante 1 hora a 37°C en movimiento (200 rpm).
- Por último, se sembraron 50 y 200 µl de cultivo en placas de agar 2% (p/v) más LB con kanamicina (100 ug/ml), ampicilina (100 ug/ml) y X-gal (25 ug/ml), y se incubaron toda la noche a 37°C.
- Al día siguiente, se seleccionaron 10 colonias blancas y se sembró cada una en 5 ml de LB con ampicilina y kanamicina. Se incubaron los cultivos toda la noche a 37°C en movimiento.
- Al día siguiente, se extrajo el ADN de 2 ml de cultivo mediante el kit ilustra plasmidPrep Mini Spin (Miniprep) (28-9042-70, GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### Comprobación de la ligación

- Se comprobó que el ADNc se había ligado correctamente en el plásmido mediante secuenciación Sanger (sección 4.2.4), utilizando los cebadores del kit de clonación TOPO TA.
- De aquí en adelante, se trabajó con los clones que se ligaron con extremo 3' del ADNc más próximo a la posición +1 del vector. Esto permitió añadir la diana de restricción de la enzima BamHI al final de la secuencia del ADNc del gen *RNASEH1*.

### Mutagénesis dirigida

Se generaron las dos variantes encontradas en el paciente, en dos plásmidos ligados previamente con el ADNc control, mediante mutagénesis dirigida.

- A partir del plasmido ligado con el ADNc control, se introdujo la variante c.487T>C y la c.258\_260del, utilizando el kit Q5-Site Directed Mutagenesis (E0552S, New England BioLabs). El ADNc se amplificó con un par de cebadores específicos, que introducían la variante o amplificaban el ADNc a excepción de la zona de la delección.
- Se prepararon reacciones de 10µl, con una concentración final 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix, 0.5 µM de cada cebador (*Tabla 18*) y 25 ng de ADNc.

*Tabla 18 - Cebadores utilizados en la mutagénesis dirigida*

	Cebador forward	Cebador reverse	Tº hibridación
c.487T>C	5'AATCGGCGTTCACTGGGGGCC3'	5'CCTGCTCGCGGCCCTTCTACGC3'	65°C
c.258_260del	5'TGGACAAGAATCGGAGGCGAAA3'	5'TGATTTTCATGCCCTTCTGAAACTCC3'	58°C

- Las reacciones se amplificaron durante 1min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 65 o 58°C y 1min a 72°C, y un ciclo final de 2min a 72°C.
- A continuación, se volvió a ligar el plásmido con una mezcla de enzimas KLD (quinasa, ligasa y DpnI) incluida en el kit. Se generó una reacción de 10 µl, añadiendo 1 µl del producto de PCR anterior, 5 µl de tampón de reacción KLD 2X, 1 µl de la mezcla de enzimas KLD y 3 µl de agua. Se incubó la reacción 5 min a TA.
- Para acabar, se llevó a cabo la transformación de bacterias y la selección de clones, como se detalla en la sección 4.3.8.3.2.

### **Generación de la diana de restricción de la enzima NdeI en los constructos**

- Se añadió la diana de la enzima de restricción NdeI a los constructos (vector pCR 2.1-TOPO TA + ADNc RNASEH1), mediante el sistema PCR Expand High Fidelity, tal y como se explica en el apartado 4.2.3.2. En la amplificación se utilizó la pareja de cebadores DNdeI.
- Se comprobó la adición de la diana mediante secuenciación Sanger (sección 4.2.4), utilizando los cebadores del kit de clonación TOPO TA. La adición de esta diana en el extremo 5' del ADNc permite su posterior clonaje en el vector de expresión.

### **Obtención de los diferentes ADNc con las dianas de restricción**

- Se cargaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% (p/v) con el 5% de BrEt, y se aplicó un voltaje constante de 80 V durante 2 horas. Se visualizó el gel en el transiluminador y se recortaron los trozos de gel con el ADNc; a continuación, se extrajo el ADN del gel, mediante el kit QIAquick gel extraction (Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- El producto de PCR purificado del gel, se clonó en el vector pCR2.1-TOPO TA, se seleccionaron las colonias y se comprobó la dirección de la incorporación del inserto en el vector, como se especifica en el apartado 4.3.8.3.2.
- Se digirieron los diferentes constructos (vector pCR 2.1-TOPO TA + ADNc RNASEH1-dianaNdeI) con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Para ello, se prepararon reacciones de 50 µl (500 ng de ADN procedente de la extracción de ADN de las bacterias, 1 µl de cada enzima, 5 µl de tampón cutsmart 10X), que se incubaron a 37°C toda la noche. La digestión con las dos enzimas generó unos fragmentos de 3.8kb, 826pb y 65pb.
- Se cargó el producto de la digestión en un gel de agarosa al 1% (p/v) con el 5% de BrEt, aplicando un voltaje constante de 80 V durante 2 horas. Se visualizó el gel en el transiluminador y se recortaron los trozos de gel correspondientes al ADNc (826 pb)
- Por último, se extrajo el ADN de la banda del gel, utilizando el kit QIAquick gel extraction (Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante, y se comprobó la adición de la diana mediante secuenciación Sanger (sección 4.2.4), utilizando los cebadores del kit de clonación TOPO TA.

### **Clonaje de los del producto de digestión en el vector de expresión**

Se realizó el clonaje de cada producto de digestión purificado del gel de agarosa, mediante el sistema pET Expression System 15b (70755-3, Novagen). Este vector incorpora en el extremo N-terminal de la proteína (extremo 5' del ADNc) una cola de histidinas, que permitirá su posterior purificación mediante columnas de afinidad.

- Se digirió el vector pET-15b con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, tal y como se ha explicado en el apartado anterior. Se obtuvo un único fragmento de 5.708 pb que corresponde al vector linealizado. Se recortó el trozo de gel correspondiente al fragmento de 5.708 pb y se extrajo el ADN con el kit QIAquick gel extraction (Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Una vez obtenido el vector y los insertos (ADNc) digeridos con las mismas enzimas, se realizó la ligación de ambos, utilizando el kit Rapid ADN Dephos & Ligation Kit (04898117001, Roche). Se mezclaron los reactivos de la Tabla 19 y se incubó 5 minutos a TA.

*Tabla 19 - Reactivos utilizados en la reacción de ligación*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
ADN vector	1 $\mu$ l	50 ng
ADN inserto	15 $\mu$ l	150 ng
Tampón dilución ADN 5X	4 $\mu$ l	1X
Se mezcla bien y se añade:		
Tampón ligación ADN T4 2X	20 $\mu$ l	1X
ADN ligasa T4	2 $\mu$ l	5 U

- Se realizó la transformación de bacterias las Escherichia Coli quimiocompetentes One Shot BL21(DE3)pLysS (44-0307, Invitrogen) con cada constructo, como se ha explicado en el apartado 4.3.8.3.3.
- Para acabar, se sembraron 50 y 200  $\mu$ l de cultivo en placas de agar 2% (p/v) más LB ampicilina (100 ug/ml) y X-gal (25 ug/ml), y se incubaron las placas toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron 10 colonias y se sembraron individualmente en 5 ml de LB con ampicilina, que se incubaron toda la noche a 37°C en movimiento.
- Al día siguiente, se extrajo el ADN de todo el cultivo mediante el kit ilustra plasmidPrep Mini Spin (Miniprep) (28-9042-70, GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Se comprobó la ligación mediante secuenciación Sanger (sección 4.2.4), utilizando la pareja de cebadores Lgp15.

#### **Inducción de la expresión de la proteína RNASEH1 en el vector de expresión**

- Se prepararon 5 ml de cultivo en LB, de cada una de las transformaciones en bacterias Escherichia Coli BL21(DE3)pLysS. Se incubaron los cultivos a 37°C en movimiento, hasta que la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD600) llegó a 0.5.
- Cuando la OD600 llegó a 0.5, se transfirieron los 5 ml de cada cultivo a 1L de LB cada uno, y se incubó a 37°C en movimiento hasta que la OD600 llegó a 0.5.
- Cuando la OD600 llegó a valores de 0.5, se añadieron IPTG a una concentración final de 1mM y se incubó en las mismas condiciones durante 3 horas.
- Por último, se centrifugó todo el cultivo a 4.000 g durante 10 minutos y se recuperó el pellet.

#### **Purificación de las proteínas recombinantes**

- Se realizó la purificación de las diferentes proteínas con el kit Ni-NTA Fast Start (30600, Qiagen). El kit contiene columnas de afinidad a colas de histidinas, como las incorporadas en las proteínas. La purificación se llevó a cabo con el pellet recuperado en el apartado anterior, siguiendo el protocolo de

purificación de proteínas en condiciones nativas del kit. Se recogieron alícuotas de los dos lavados y las dos eluciones.

- Se comprobó la purificación de la proteína RNASEH1 mediante Western Blot.

### Western Blot

El western blot, se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.7. Pero la electroforesis, se llevó a cabo con un gel de acrilamida al 10% comercial (Gel Mini-PROTEAN TGX, 456-1036, BIO-RAD). La transferencia realizada es de tipo semi-seca. En la inmunodetección, se utilizó el anticuerpo monoclonal murino contra la RNASEH1 humana (ab56560, abcam) diluido 1/10.000 en solución de bloqueo. Se cuantificaron las proteínas con el reactivo Comassie (sección 4.3.6.1.6).

#### 5.3.6.3.4 Ensayo enzimático de la proteína RNASEH1

Para llevar a cabo este experimento, se siguió el método descrito por Alla y colaboradores (176).

### Síntesis del sustrato de la enzima

Se utilizó un híbrido ARN:ADN de 21 pb como sustrato de la enzima RNASEH1 humana. Se realizó el marcaje de ese sustrato para poder visualizar la actividad de las diferentes proteínas.

- Se marcó el oligonucleótido de cadena simple de ARN (5'GAAAUACGGUCCGAAACG UUG3') con ATP radioactivo (marcado con fósforo 32 en la posición Y). Se prepararon reacciones de 30 µl con: 200 pmol de ARN, 10 U de la T4 polinucleótido quinasa, 3 pmol ATP [Y-32P], 290 pmol ATP sin marcar. A las reacciones se añadieron 3 µl de tampón quinasa T4 10X y se incubaron 1 hora a 37°C.

- Se purificó el ARN marcado (ARN\*) utilizando las columnas Quick Spin Columns for radiolabeled RNA purification (11273990001, Roche). Se introdujeron los 30 µl de reacción en las columnas y se centrifugaron 4 minutos a 1.100 g.

- Se preparó 50 µl del híbrido ARN\*:ADN a partir de 1 uM ARN\* y 2 uM del oligonucleótido de ADN complementario (5'CAACGTTTCGGACCGTATTTTC3') en tampón de alineamiento (50 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM EDTA) y se incubó la mezcla 5 minutos a 90°C, después se dejó enfriar hasta 37°C y se colocó en hielo.

### Ensayo de la actividad enzimática de la proteína RNASEH1

- Se prepararon 25 µl de reacción con 40 nM de la enzima y 250 nM del sustrato, en un tampón con una concentración final de 150 mM KCl, 25 mM HEPES, 10 mM DTT y 10 nM MgCl<sub>2</sub>. Se incubaron las reacciones durante 1 hora a 37°C, y se paró la reacción añadiendo 25 µl de solución de parada (95% formamida, 20 mM EDTA).

Se visualizó la actividad enzimática de cada enzima, utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% con 7M de urea.

- Se prepararon las muestras, mezclando 5 µl de cada reacción con 5 µl de tampón de carga (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.1% azul de bromofenol, 0.1% xileno cianol). Como referencia, se utilizó el ARN\*.



- Se preparó un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15% de 1mm de grosor. La composición del gel fue la siguiente: 7 M urea, 30% acrilamida (40:1), 30% APS, 10% TBE y 0.05% TEMED. Se dejó polimerizar 1 hora aproximadamente.
- Se cargaron 10 µl de cada muestra en el gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15% y se realizó la electroforesis en tampón de electroforesis (Glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v), Tris 25 mM; pH 8.3) a una potencia de 25W hasta que se vio la separación de los dos colorantes.
- Se secó el gel durante toda la noche en un secador de geles. Al día siguiente, se expuso una película fotográfica con el gel, durante 1 hora en frío y se reveló la película en una reveladora automática.

#### 5.3.6.3.5 Inducción de la depleción del ADNmt en fibroblastos y estudio de la recuperación

Para estudiar el efecto de las variantes encontradas en el gen *RNASEH1* en la replicación del ADNmt, se indujo la depleción del ADNmt en fibroblastos del paciente con BrEt.

- Se sembró por duplicado 250.000 fibroblastos de 2 sujetos sanos (controles) y del paciente, en placas de petri de 60 mm de diámetro, con medio completo de cultivo de fibroblastos (MCF) (DMEM High-glucose, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina/antifúngico, 1% glutamina, 1% piruvato).
- A los 3 días, se tripsinizaron las células con 500 µl de tripsina 1X y se recogieron con 3.5 ml de MCF. La mitad del volumen se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos y se congeló el pellet (tiempo 0), la otra mitad se sembró en una nueva placa con 3ml de MCF al que se añadió 100 ng/ml de BrEt.
- Se cultivaron las células con BrEt durante 4 días, cada dos días se repitió el paso anterior (tripsinizar + centrifugar + congelar + sembrar). Se recogió el pellet a día 2 y 4 (tiempo 2 y 4 de depleción).
- El día 4, cuando se sembraron las células de nuevo se añadió solo MCF. Se repitió la tripsinización, centrifugación, recolección del pellet y siembra, los días 3, 5 y 10 después de retiró el bromuro (tiempo 7, 9 y 14 de recuperación).
- Se extrajo el ADN de los pellets de células (sección 4.2.1) y se estudió el número de copias de ADNmt mediante RT-PCR (sección 4.7.4).

#### 5.3.6.3.6 Crecimiento celular en medio glucolítico y oxidativo

Se realizaron estudios de crecimiento de los fibroblastos del paciente y dos líneas de fibroblastos controles en medio glucolítico (con glucosa) y oxidativo (con galactosa), tal y como se describe en el apartado 4.3.6.4.

### 5.3.6.4 **Caracterización de factores modificadores del fenotipo en sujetos con la variante m.1555A>G en el gen *MTRNR1***

Se estudiaron posibles efectos modificadores del fenotipo en pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica de herencia materna portadores de la variante m.1555A>G en el gen *MTRNR1*.

#### 5.3.6.4.1 Secuenciación del ADNmt de pacientes con m.1555A>G

Se secuenció el ADNmt de todos los pacientes con la variante m.1555A>G, utilizando el kit de preparación de librerías Nextera XT ADN Library Preparation y la plataforma de secuenciación MiSeq (Illumina) tal y como se describe en la sección 4.3.2.1. Además, se determinó el haplogrupo mitocondrial utilizando el software Mitotool (<http://www.mitotool.org/genomerCRS.html>).

5.3.6.4.2 Estudio del polimorfismo c.28C>T en el gen TRMU

Se estudió mediante secuenciación Sanger la variante c.28C>T en el exón 1 del gen *TRMU*, en todos los pacientes con la variante m.1555A>G. Se amplificó la muestra con la pareja de cebadores TRMU-E1, con la mezcla de reactivos para ADNn sin DMSO ni GR-rich, tal y como se ha descrito en la sección 4.2.3.1. Posteriormente, se secuenciaron los fragmentos mediante el método Sanger, utilizando los mismos cebadores (sección 4.2.4).

## **6 RESULTADOS**



## 6.1 Secuenciación masiva del ADNmt con la plataforma MiSeq.

### 6.1.1 Validación de la secuenciación masiva del ADNmt

Se ha puesto a punto la secuenciación completa del genoma mitocondrial utilizando la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina. En la fase de validación, se han secuenciado 24 muestras de pacientes con EM, estudiados genéticamente con anterioridad. A continuación, se detallan las 24 muestras utilizadas (Tabla20).

*Tabla 20 - Muestras utilizadas en la validación de la secuenciación del ADNmt mediante la plataforma MiSeq*

ID	Variante patogénica	% heteroplasmia	Método	Secuenciación completa ADNmt	Tejido
762	m.1555A>G	100	Sanger	No	Sangre
763	m.1555A>G	100	Sanger	No	Sangre
990	m.3243 A>G	6	Sanger	No	Sangre
1338	m.3243 A>G	17.4	Sanger	No	Mucosa bucal
991	m.3243 A>G	30	Mitochip/PGM	Si	Mucosa bucal
1134	m.3243A>G	78	Mitochip/PGM	Si	Músculo
1488	m.3243 A>G	80	Sanger	No	Músculo
1273	m.5658 T>C	17	Mitochip/PGM	Si	Orina
7123	m.7191T>C	90	Sanger/PGM	Si	Sangre
530	m.8344A>G	41	Mitochip	No	Desconocido
1128	m.8993 T>C	100	Mitochip	No	Músculo
1438	m.8993 T>C	100	Sanger	No	Músculo
1503	m.8993 T>C	100	Sanger	No	Músculo
507	m.13094T>C	85	Mitochip/PGM	Si	Músculo
1341	m.14484 T>C	100	Sanger	No	Sangre
7000	m.15853C>A	100	Sanger/PGM	Si	Sangre
1368	-	-	Mitochip/PGM	Si	Músculo
1466	-	-	Mitochip/PGM	Si	Músculo
6873	-	-	Sanger/PGM	Si	Sangre
8303	-	-	Sanger/PGM	Si	Sangre
8772	-	-	Sanger/PGM	Si	Desconocido
8863	-	-	Sanger/PGM	Si	Desconocido
9226	-	-	Sanger/PGM	Si	Desconocido
9512	-	-	Sanger	No	Músculo

\* Método: metodología utilizada en el diagnóstico genético de los pacientes

### 6.1.2 Confirmación de variantes patogénicas

Se han confirmado las variantes patogénicas de las muestras de los pacientes estudiados con anterioridad, obteniendo una total concordancia entre los métodos utilizados.

Detección del porcentaje de heteroplasmia

Se ha detectado el mismo porcentaje de heroplasmia de las variantes patogénicas de las muestras estudiadas, a excepción de la variante m.3243 A>G de la muestra 990, ya que por RFLP fue del 7% y con la plataforma MiSeq del 16% (Tabla 211).

Tabla 21 - Porcentaje de heteroplasma de las variantes patogénicas de las muestras estudiadas

ID	Mutación	RFLP		MiSeq	
		% heteroplasma	% heteroplasma	Cobertura	
762	m.1555A>G	100	99	1543	
763	m.1555A>G	100	100	3569	
990	m.3243 A>G	7	16	9703	
1338	m.3243 A>G	17	19	7900	
991	m.3243 A>G	30	30	3010	
1134	m.3243A>G	78	70	2348	
1488	m.3243 A>G	80	72	13217	
1273	m.5658 T>C	17	11	1831	
7123	m.7191T>C	90	92	1289	
530	m.8344A>G	41	48	1373	
1128	m.8993 T>C	100	100	6265	
1438	m.8993 T>C	100	99	2072	
1503	m.8993 T>C	100	100	10654	
507	m.13094T>C	78	78	3106	
1341	m.14484 T>C	100	100	6123	
7000	m.15853C>A	100	100	2142	

\* Cobertura: número de lecturas en la posición de la mutación.

### 6.1.3 Detección de variantes totales

Se analizaron las variantes del ADNmt obtenidas con la plataforma MiSeq, y se comparó con las detectadas con los métodos Sanger o Mitochip (método de referencia) y otra plataforma de secuenciación masiva (PGM), en 13 muestras.

Tabla 22 - Variantes encontradas en el ADNmt

Plataforma	Variantes Totales	Variantes S/M	F+	F-	Sensibilidad	Especificidad
<b>TOTAL</b>						
Ion PGM	328	325	10	7	97.9%	99.9%
Miseq	334		9	0	100%	99.9%
<b>NCR</b>						
Ion PGM	99	96	9	6	94.1%	99.9%
Miseq	103		7	0	100%	99.9%
<b>CR</b>						
Ion PGM	229	229	1	1	99.6%	99.9%
Miseq	231		2	0	100%	99.9%

\* S/M: variantes encontradas con el método Sanger o Mitochip; NCR: variantes en la región no codificante (entre las posiciones 16024 y 576); CR: variantes en la región codificante (entre posiciones 577 y 16023). F+: falsos positivos, variantes solo encontradas con secuenciación masiva; F-: falsos negativos, variantes solo encontradas con los métodos de referencia

Las plataformas de secuenciación masiva, detectan más variantes que las técnicas de referencia; se han encontrado 9 variantes catalogadas como falsos positivos con la plataforma MiSeq y 10 con Ion PGM. Sin embargo, solo se han detectado variantes catalogadas como falsos negativos con la plataforma Ion PGM (7 variantes) (Tabla 22).

De las 12 variantes diferentes catalogadas como falsos positivos, 7 se han detectado con ambas plataformas (Tabla 23). Todas las variantes falsas positivas se han encontrado en las muestras secuenciadas previamente con la técnica Mitochip, a excepción de la variante m.263A>G (Tabla 23).

*Tabla 23 - Variantes catalogadas como falsos positivos*

Variante	Ion PGM (% heteroplasmia)	Miseq (% heteroplasmia)
m.248delA	100%	96%
m.263A>G	100%	100%
m.8271delACCCCCTCTC	100%	51%
m.16356T>C	64%	84%
m.16357T>C	54%	90%
m.16503G>A	59%	53%
m.16565C>G	97%	100%
m.310T>C	67%	-
m.514delCA	100%	-
m.10400C>T	-	100%
m.16189T>TC	-	94%
m.16365C>T	73%	-

\* Variantes encontradas en el ADNmt de los pacientes con EM solo con las plataformas de secuenciación masiva. Detrás de cada variante aparece el porcentaje de heteroplasmia en que se ha encontrado. En rojo, aparecen las variantes encontradas solo con una de las dos plataformas.

Por otro lado, la plataforma PGM no ha detectado 7 variantes que si se han encontrado con MiSeq y con las técnicas de referencia. Estas variantes se han catalogado como falsos negativos (m.150C>T, m.295C>T, m.9545A>G, m.16182A>C, m.16183delA, m.16183A>C, m.16189T>C). La mayoría de las variantes, excepto la m.150C>T y m.9545A>G, se encuentran en zonas de homopolímeros.

Al comparar las dos plataformas de secuenciación masiva, se observa que la secuenciación con la plataforma MiSeq presenta una mayor sensibilidad en la detección de variantes que PGM, que se hace más evidente en la NCR, aunque presentan la misma especificidad (Tabla 22).

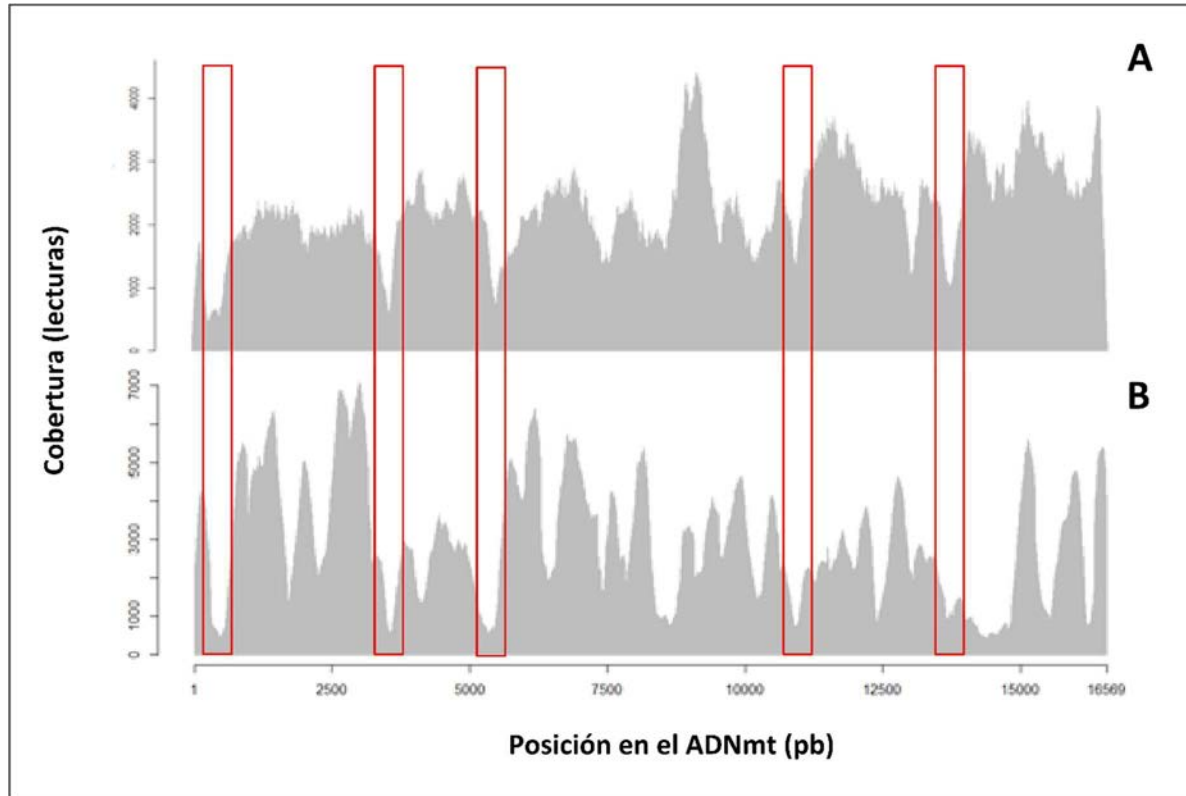
#### **6.1.4 Análisis de la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt**

Se ha analizado la cobertura obtenida en toda la molécula de ADNmt en las 13 muestras secuenciadas con la plataforma MiSeq (Figura 24.A) y se ha comparado con la obtenida con la plataforma Ion PGM (Figura 24.B). Las 13 muestras son las que se han utilizado en la detección de variantes totales.

Se puede observar que en las dos plataformas la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt no es homogénea, dando lugar a picos de máxima cobertura (4.000X en MiSeq y 7.000X en PGM) y mínima (500X). Aunque, la secuenciación con la plataforma MiSeq, proporciona una distribución de la cobertura algo más homogénea. Esta heterogeneidad de cobertura, hace que en las regiones en que la cobertura es inferior a la deseada, puede afectar a la detección de variantes en bajos porcentajes de heteroplasmia.

Hay zonas en las que la cobertura disminuye en la secuenciación con las dos plataformas (Figura 24), sobre todo entre las posiciones del ADNmt 200-600, 3.400-3.600, 5.000-5.700, 10.000-11.000 y 13.500-14.000.

Figura 24 - Perfiles de cobertura

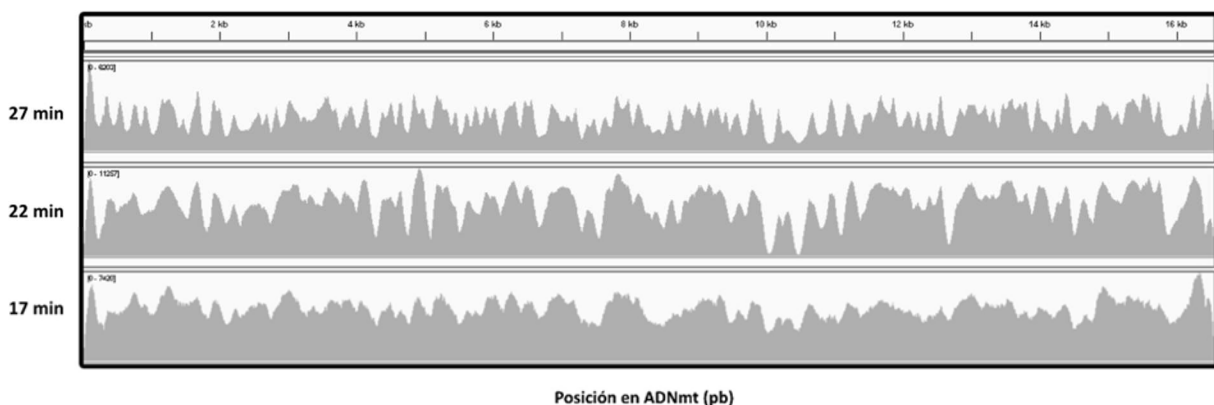


\*Los dos gráficos de la figura, muestran la cobertura obtenida a lo largo de la secuencia del ADNmt. En la parte superior, aparece la cobertura de las muestras secuenciadas con la plataforma Miseq. En la parte inferior, la cobertura de las muestras secuenciadas con Ion PGM. Los rectángulos rojos, muestran las zonas de cobertura baja que comparten las dos plataformas.

### 6.1.5 Optimización de la cobertura en la secuenciación del ADNmt

Debido a que la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt no era homogénea, se decidió optimizar la técnica de fragmentado del ADNmt en el proceso inicial de preparación de librerías utilizando la enzima dsDNA fragmentasa.

Figura 25 - Perfil cobertura del ADNmt fragmentando con la enzima dsDNA fragmentasa





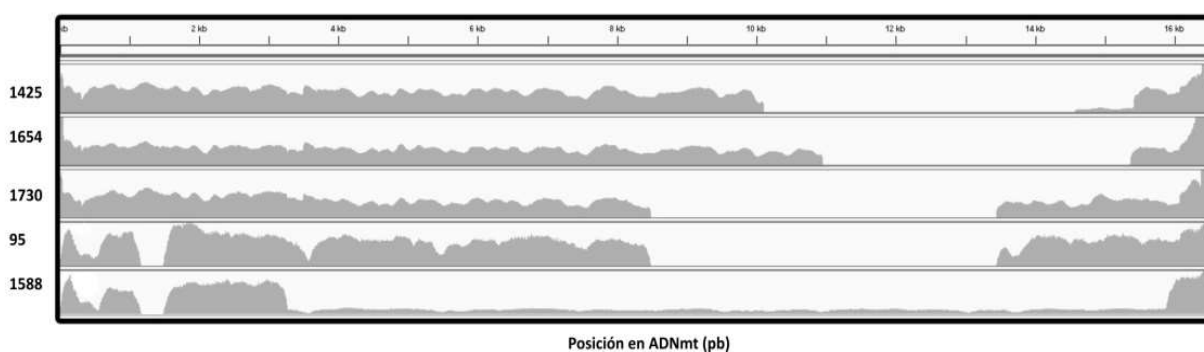
En primer lugar, se optimizó la fragmentación del ADNmt con la enzima ensayando diferentes tiempos, se dejó actuar la enzima dsDNA fragmentasa 17, 22 y 27 minutos antes de parar la reacción. Como se observa en la 6, fragmentando el ADNmt 17 minutos se obtiene una cobertura más homogénea a lo largo de toda la secuencia de ADNmt, que si se deja actuar la enzima más tiempo (22 o 27 minutos), en que la cobertura es más variable, debido a que se fragmenta el ADNmt demasiado (Figura 25) y los fragmentos obtenidos son más pequeños, de unos 160 pb, en comparación con los 250 pb obtenidos fragmentando 17 minutos.

### 6.1.6 Aplicación de la secuenciación masiva del ADNmt al estudio de deleciones únicas del ADNmt

Se secuenció el ADNmt procedente de músculo, de 5 muestras de pacientes previamente diagnosticados con deleción única en el ADNmt.

En la Figura 26, se pueden observar los perfiles de cobertura del ADNmt de las muestras analizadas. En la región de la deleción se aprecia una marcada disminución de la cobertura, que facilita su mapeo tal y como se muestra en la Tabla 24.

Figura 26 - Visualización secuencia ADNmt de pacientes con deleciones únicas



\* Las librerías de las muestras 1425, 1654 y 1730 se prepararon con el kit NEBNext Ultra II DNA Library Prep (New England Biolabs) y la de las muestras 95 y 1588 con el kit Nextera XT DNA Library Prep (Illumina).

Tabla 24 - Estudio de las deleciones únicas del ADNmt utilizando las NGS

Muestra	Tamaño de la deleción por SB	Tamaño de la deleción por NGS	Posición inicio	Posición final	Cobertura zona deleción	Cobertura fuera de la deleción
1588	ND	12.5 Kb	m.3280	m.15870	1.000X	10.000X
95	5.7 Kb	5 Kb	m.8480	m.13450	20X	5.000X
1730	5 Kb	5 Kb	m.8480	m.13440	5X	4.000X
1425	3.7 Kb	4.5 Kb	m.10100	m.14560	50X	6.000X
1654	5 Kb	4.4 Kb	m.10950	m.15360	100X	6.000X

## 6.2 Diseño y validación de un panel de genes a la carta implicados en mantenimiento y la biogénesis del ADNmt

Se diseñó un panel de genes a la carta específico para la secuenciación con la plataforma de NGS MiSeq, en el que se incluyeron los 13 genes implicados en la biogénesis y el mantenimiento del ADNmt: *DGUOK*, *MFN2*, *MPV17*, *OPA1*, *POLG*, *POLG2*, *RRM2B*, *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TK2*, *TWNK*, *TYMP*.

El panel estudia las zonas exónicas de estos genes mediante la generación de 606 amplicones solapantes de un tamaño de entre 100 y 150 pb.

### 6.2.1 Validación del panel de genes a la carta V1

Se validó el panel, secuenciando 6 muestras de pacientes estudiados anteriormente (Tabla 25) 3 de las 6 muestras presentaban variantes patogénicas. En el proceso de validación, además de comprobar la eficacia del método en la detección de variantes, se estudió la cobertura del panel.

Tabla 25 – Muestras utilizadas en la validación del panel de genes V1

Muestra	Variante patogénica	Gen	Método
78	c.323C>T p.(Thr108Met)/ c.575G>A p.(Arg192Lys)	TK2	Sanger
1331	c.604_606del p.(Lys202del)/ c.604_606del p.(Lys202del)	TK2	Sanger
1475	c.82C>A p.(Pro28Thr)/ c.82C>A p.(Pro28Thr)	SLC25A4	Ion PGM
1464	No	-	Ion PGM
1465	No	-	Ion PGM
1491	No	-	Ion PGM

\* Las muestras 78 y 1331 se estudiaron con anterioridad mediante secuenciación Sanger y las muestras 1475, 1464, 1465 y 1491 con la plataforma Ion PGM.

#### 6.2.1.1 Confirmación de las variantes patogénicas

Todas las variantes patogénicas se han confirmado con la secuenciación mediante el panel de genes, obteniendo una concordancia total entre los métodos utilizados.

#### 6.2.1.2 Detección de variantes totales

Con el panel V1 se detectaron la mayoría de las variantes de los 13 genes del panel de las 4 muestras previamente estudiadas con la plataforma PGM. Se puede apreciar que no todas las variantes en el gen *TYMP* se detectaron en las muestras 1464, 1475 y 1491 (Tabla 26).

Tabla 26 – Variantes encontradas con el panel V1 en las muestras utilizadas en la validación

Muestra	Variantes PGM	Variantes Miseq
1464	1 <i>RRM2B</i> , 1 <i>SUCLA2</i> , 1 <i>TYMP</i>	1 <i>RRM2B</i> , 1 <i>SUCLA2</i>
1465	2 <i>OPA1</i> , 1 <i>SUCLA2</i>	2 <i>OPA1</i> , 1 <i>SUCLA2</i>
1475	3 <i>OPA1</i> , 1 <i>RRM2B</i> , 1 <i>SUCLA2</i> , 1 <i>POLG</i> , 2 <i>POLG2</i> , 2 <i>TYMP</i>	3 <i>OPA1</i> , 1 <i>RRM2B</i> , 1 <i>SUCLA2</i> , 1 <i>POLG</i> , 2 <i>POLG2</i> , 1 <i>TYMP</i>
1491	1 <i>SUCLA2</i> , 1 <i>POLG</i> , 1 <i>TYMP</i>	1 <i>SUCLA2</i> , 1 <i>POLG</i>

\* En rojo se marcan las variantes no detectadas con la plataforma MiSeq

#### 6.2.1.3 Análisis de la cobertura del panel

La cobertura media de las 6 muestras estudiadas con el panel fue de 408X; el 85.8% de los amplicones tenían una cobertura superior a 30X, el 11.6% presentaba una cobertura inferior a 30X y el 2.6% de los amplicones no estaban cubiertos (Tabla 27).

Tabla 27 - Cobertura obtenida en la fase de validación de la secuenciación con el panel V1

ID	Cobertura media	% amplicones con cobertura >30X	% amplicones con cobertura <30X	% amplicones sin cobertura
78	444	94	4.6	1.3
1331	307	78	18.5	3.1
1475	265	90	8.3	1.2
1464	316	82	14.4	3
1465	580	92	6.3	1.8
1491	536	77	17.8	5

En el diseño del panel, la cobertura teórica era del 97.5%, 15 exones de los 13 genes no estaban completamente cubiertos; sin embargo, se observó que la cobertura real era del 95%, ya que en 10 exones adicionales, no se obtuvo una cobertura superior a 30X (Tabla 28).

Tabla 28 - Resumen de los exones no cubiertos completamente por el panel V1

Gen	Exón no cubierto por diseño	Exón con cobertura <30X	Nº total de exones no cubiertos
<i>MFN2</i>	-	-	-
<i>MPV17</i>	-	-	-
<i>DGUOK</i>	-	4	1
<i>SUCLG1</i>	2	-	1
<i>OPA1</i>	10/14/17/20	8	5
<i>SLC25A4</i>	1	-	1
<i>RRM2B</i>	6/9	-	2
<i>TWINKLE</i>	-	-	-
<i>SUCLA2</i>	9	1/6	3
<i>POLG</i>	2	14	2
<i>TK2</i>	-	1	1
<i>POLG2</i>	3/4/5	1	4
<i>TYMP</i>	8/9	3/7/10	5

Para el estudio completo de los 13 genes incluidos en el panel, se necesitaba realizar 25 secuencias Sanger adicionales, 15 para cubrir las zonas no cubiertas en el diseño, y 10 para cubrir las zonas donde la cobertura era inferior a 30 X. Una cobertura inferior a 30X es insuficiente para poder hacer un diagnóstico genético fiable y robusto.

## 6.2.2 Optimización del panel de genes a la carta

Se rediseñó el panel genes a la carta, incluyendo nuevos genes implicados en la biogénesis y mantenimiento del ADNmt asociados a fenotipos clínicos de EM, y mejorar la cobertura de las regiones. El diseño de la V2 del panel, se realizó con una versión mejorada del software de diseño (QIAseq Targeted DNA Custom Panel Builder), que permite generar amplicones solapantes más largos (de hasta 225 pb).

En la versión V2 del panel se incluyeron 17 genes: *DGUOK*, *DNA2*, *FBXL4*, *MGME1*, *MFN2*, *MPV17*, *OPA1*, *POLG*, *POLG2*, *RNASEH1*, *RRM2B*, *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *SPG7*, *TK2* y *TWINK*. En total, en el panel se generaban 400 amplicones.

En la fase de validación del panel V2 se utilizaron 12 muestras de pacientes secuenciadas con el panel V1.

### 6.2.2.1 Confirmación de las variantes

Se confirmaron las 60 variantes en zonas codificantes de los 12 genes en común con el panel V1, además se encontró una variante potencialmente patogénica en el gen *TWINK* en el paciente 55 (c.1342A>G, p.(Asn448Asp)).

### 6.2.2.2 Análisis de la cobertura del panel

La cobertura media obtenida en las 12 muestras fue de 630X; el 97.5% de los amplicones tenían una cobertura superior a 30X, el 1.7% presentaban una cobertura inferior a 30X y el 0.7% de los amplicones no estaban cubiertos (Tabla 29).

Tabla 29 - Cobertura obtenida en la fase de validación de la secuenciación con el panel V2

Paciente	Cobertura media	% amplicones con cobertura >30X	% amplicones con cobertura <30X	% amplicones sin cobertura
20	177	97.3	2.3	0.5
37	800	97.3	2.0	0.8
38	193	97.0	2.5	0.5
39	432	97.3	2.3	0.5
41	914	98.5	0.8	0.8
45	721	97.0	2.3	0.8
46	721	98.0	1.3	0.8
54	727	97.8	1.3	1.0
55	696	97.5	1.5	1.0
56	743	97.0	2.0	1.0
57	685	97.3	1.8	1.0
76	735	97.8	1.5	0.8

La cobertura teórica del panel era del 99% y la cobertura real fue del 97.5%. El diseño del panel no cubría completamente 6 exones de los 17 genes, además en algunas muestras la amplificación con el panel no era óptima y la cobertura del exón 2 del gen *SUCLG1* y el exón 1 del gen *RNASEH1* no presentan una cobertura mínima de 30X (Tabla 30).

Tabla 30 - Resumen de los exones no cubiertos por el panel V2

Gen	Exón no cubierto por diseño	Exón con cobertura <30X	Nº total de exones no cubiertos
<i>DGUOK</i>	-	-	-
<i>DNA2</i>	-	-	-
<i>FBXL4</i>	-	-	-
<i>MGME1</i>	-	-	-
<i>MNF2</i>	-	-	-
<i>MPV17</i>	1	-	1
<i>OPA1</i>	-	-	-
<i>POLG</i>	2	-	1
<i>POLG2</i>	-	-	-
<i>RNASEH1</i>	-	1	1
<i>RRM2B</i>	-	-	-
<i>SLC25A4</i>	1	-	1
<i>SUCLA2</i>	1	-	1
<i>SUCLG1</i>	-	2	1
<i>SPG7</i>	1	-	1
<i>TK2</i>	1	-	1
<i>TWINKLE</i>	-	-	-

Para el estudio de los 17 genes incluidos en el panel, se deben realizar 6 secuencias Sanger adicionales, y ocasionalmente el número de secuencias puede llegar a un total de 8.

### 6.3 Aplicación de la secuenciación masiva en el diagnóstico de pacientes con EM

Una vez puesta a punto la secuenciación del ADNmt y la validación del panel de genes a la carta, se aplicaron estas técnicas, junto con la secuenciación del exoma clínico y del exoma completo, en el diagnóstico de pacientes con EM.

#### 6.3.1 Estudio del ADNmt en pacientes con EM

Se estudió el ADNmt de 32 pacientes con sospecha clínica de EM debida a alteraciones en el ADNmt. Se encontraron variantes patogénicas asociadas al fenotipo clínico en 15 pacientes (Tabla 31). Todas las variantes habían sido previamente descritas como variantes patogénicas del ADNmt.

Tabla 31 – Variantes patogénicas encontradas en los pacientes estudiados

Paciente	Sospecha diagnóstica	Mutación	Heteroplasmia (%)	Referencia
25	Debilidad de cinturas	m.3243A>G	71 (M)	(177, 178)
24	Debilidad de cinturas	m.8344A>G	81 (M)	(178)
31	Enfermedad mitocondrial	m.3243A>G	53 (M)	(177, 178)
21	Miopatía mitocondrial	m.3243A>G	20 (S)	(177, 178)
13	Síndrome de Leigh	m.10197G>A	76 (S), 88 (O), 94 (MB)	(179)
10	Síndrome de Leigh	m.10197G>A	100 (LCR/MB/O/S)	(179)
12	Síndrome de Leigh	m.10197G>A	100 (MB/O/S)	(179)
11	Síndrome de Leigh	m.12706T>C	72 (M)	(180)
16	Síndrome de LHON	m.13513G>A	29 (S)	(181)
9	Síndrome de MELAS	m.3243A>G	10 (S)	(177)
2	Síndrome de MELAS	m.3243A>G	85 (M)	(177)
3	Síndrome de MELAS	m.3243A>G	87 (M)	(177)
1	Síndrome de MELAS	m.3243A>G	90 (M)	(177)
6	Síndrome de MELAS	m.3260A>G	9 (S)	(182)
8	Síndrome de MELAS	m.8356T>C	78 (M)	(183)

\* MB: mucosa bucal; O: orina; S: sangre

Todas las variantes encontradas se asocian al fenotipo de los enfermos, a excepción del paciente 16 con un fenotipo clínico de síndrome de LHON, ya que la variante m.13513G>A se describió por primera vez en un paciente con síndrome de MELAS, pero también se ha encontrado en pacientes con síndrome de Leigh y con fenotipos solapantes de los síndromes de MELAS y LHON, pero nunca se ha descrito en pacientes con síndrome de LHON aislado.

#### 6.3.2 Aplicación del panel de genes en el diagnóstico de pacientes con EM y deleciones múltiples o depleción del ADNmt

Se aplicó el panel V1 en el diagnóstico de 27 pacientes con fenotipo clínico de EM, que presentaban deleciones o depleción del ADNmt, o en aquellos con EM relacionada con defectos en alguno de los genes incluidos en el panel. Los pacientes estudiados han sido: 17, 20, 37 - 39, 41, 42, 45, 46, 49, 54 - 57, 65 - 68, 75 - 76, 79, 83 - 87.

Se encontraron variantes patogénicas en 4 de los 27 pacientes estudiados (Tabla 32). Las variantes que se han encontrado han sido descritas previamente como mutaciones patogénicas, asociadas a los fenotipos clínicos que presentaban los pacientes.

*Tabla 32 - Variantes patogénicas encontradas en los pacientes secuenciados con panel GeneRead V1*

Paciente	Variantes	Gen	Referencias
74	c.2864A>G, p.(Tyr955Cys)/-	<i>POLG</i>	(184) (185)
66	c.752C>T, p.(Thr251Ile)/c.1760C>T, p.(Pro587Leu)	<i>POLG</i>	(186)
65	c.388C>T, p.(Arg130Trp)/c.415G>A, p.(Ala139Thr)	<i>TK2</i>	(187-190)
56	c.1001G>C, p.(Arg334Pro)/-	<i>TWNK</i>	(191)

Una vez puesto a punto la versión V2 del panel, se aplicó al diagnóstico genético de 37 pacientes con EM y deleciones múltiples o depleción del ADNmt, o en aquellos pacientes con EM relacionada con defectos en alguno de los genes incluidos en el panel (18, 20, 35 - 40, 44 - 48, 50 - 52, 54, 55, 57 - 64, 69 - 73, 76 - 78, 88 - 90).

De los 37 pacientes estudiados se encontraron variantes potencialmente patogénicas asociadas al fenotipo en 9 pacientes con deleciones múltiples en el ADNmt y en 1 paciente con atrofia óptica (Tabla 33). Las variantes encontradas en 5 de los pacientes se han descrito previamente como variantes patogénicas. Así, de los 23 pacientes estudiados con deleciones múltiples, creemos haber podido encontrar la causa genética de 9, que representan el 40% de pacientes de este grupo.

*Tabla 33 - Variantes potencialmente patogénicas encontradas en los pacientes estudiados con el panel GeneRead V2*

Paciente	Fenotipo	Gen	Variantes	Referencias
72	PEO, miopatía, DL	<i>MFN2</i>	c.1528C>T, p.(Arg510Trp)/-	-
59	Ptosis bilateral, dislipemia, DL	<i>MFN2</i>	c.5C>T, p.(Ser2Phe)/-	-
36	Atrofia óptica	<i>OPA1</i>	c.267G>T, p.(Trp89Cys)/-	-
71	PEO, DL	<i>POLG</i>	c.844T>G, p.(Tyr282Asp) / c.2803A>T, p.(Thr935Ser)	(192)
61	Ptosis, hipoacusia, migrañas, fatiga muscular, DL	<i>POLG</i>	c.2542G>A, p.(Gly848Ser) / c.1760C>T, p.(Pro587Leu) / c.752C>T, p.(Thr251Ile)	(186, 193)
69	PEO, DL	<i>RRM2B</i>	c.514G>A, p.(Ala244Thr)/-	-
54	Ptosis, PEO, disfagia, debilidad muscular distal, DL	<i>RNASEH1</i>	c.487T>C, p.(Tyr163His) / c.258_260del, p.(Gln86del)	-
58	Ptosis bilateral, ataxia, disfagia, diplopía, DL	<i>SPG7</i>	c.1529C>T, p.(Ala510Val) / c.2254_2255insA, p.(His752Glnfs*82)	(194) (195)
63	Ptosis y debilidad de cinturas, DL	<i>TK2</i>	c.604_606del, p.(Lys202del) / c.604_606del, p.(Lys202del)	(196)
55	Ptosis bilateral, oftalmoplejía, DL	<i>TWNK</i>	c.1342A>G, p.(Asn448Asp)	(197)

\* DL: Deleciones múltiples

### 6.3.3 Aplicación del exoma clínico en el diagnóstico de pacientes con EM

Se realizó el estudio del exoma clínico en 8 pacientes con diferentes síndromes mitocondriales (17, 18, 33, 34, 53 y 80 - 82). Los fenotipos clínicos de estos pacientes, eran muy variados y algunos inespecíficos, hecho que dificulta el abordaje de un diagnóstico genético estudiando un número reducido de genes.

Las coberturas medias obtenidas en las muestras estudiadas varían entre 65X y 138X (Tabla 34).

Tabla 34 – Características de la secuenciación de las 8 muestras

Paciente	% lecturas alineadas en región diana	Cobertura media	TMF (pb)	Nº total variantes
513	74%	73	346	10204
1305	75%	138	302	9660
1473	72%	34	422	9732
1486	76%	65	328	9839
1512	76%	119	301	9781
1601	78%	36	269	9174
1681	74%	67	385	9656
1700	75%	83	411	10391

\* TMF: tamaño medio de los fragmentos generados.

En el estudio de exoma clínico, se obtuvieron entre 9.000 y 10.000 variantes; el análisis de las variantes, se focalizó en aquellas que presentaban los genes que codifican proteínas que se localizan y desarrollan su función en la mitocondria, hasta la fecha se han confirmado 1.128 (129), de estos 1.128 genes, 325 estaban incluidos en el panel TSO, y son en los que se ha centrado el estudio del análisis de las variantes (Tabla 35).

Tabla 35 - Genes nucleares involucrados en mitocondria incluidos en el panel TSO

AASS	ABAT	ABCB6	ABCD1	ABCD3	ACACA	ACACB	ACAD8	ACAD9	ACADL	ACADM	ACADS
ACADSB	ACADVL	ACAT1	ACAT2	ACLY	ACO2	ACSL4	ACSL5	ACSM3	ADSL	AFG3L2	AGPS
AGXT	AGXT2	AIFM1	AK2	AKAP10	AKR7A2	ALAS2	ALDH18A1	ALDH2	ALDH3A2	ALDH4A1	ALDH5A1
ALDH6A1	ALDH7A1	AMACR	AMT	ANKRD26	AS3MT	ASAH2	ATIC	ATP10D	ATP5E	ATPAF2	AUH
BAX	BCAT1	BCAT2	BCKDHA	BCKDHB	BCL2	BCS1L	C7orf10	CASP8	CHAT	CHDH	CLYBL
COMT	COQ2	COQ4	COQ5	COQ6	COQ9	COX10	COX15	COX4I1	COX4I2	COX6B1	COX7A1
COX7A2	CPOX	CPS1	CPT1A	CPT1B	CPT2	CYCS	CYP11A1	CYP11B1	CYP11B2	CYP24A1	CYP27A1
CYP27B1	DARS2	DBT	DDAH1	DECR1	DGUOK	DHODH	DIABLO	DLAT	DLD	DMGDH	EARS2
ECSIT	ELAC2	ELN	ETFA	ETFB	ETFDH	ETHE1	FARS2	FASN	FASTKD2	FECH	FH
FOXRED1	FPGS	FBX1	FXN	GALC	GARS	GATM	GCDH	GFER	GLF1	GK	GLDC
GLRX5	GLS	GLUD1	GLYCK	GPAM	GPD1	GPD2	GPX1	GPX4	GSR	GSTK1	HADH
HADHA	HADHB	HCCS	HIBCH	HIGD2A	HK1	HK2	HMGCL	HMGCS2	HSD17B10	HSD17B4	HSD3B1
HSPA9	HSPB7	HSPD1	HTRA2	IDE	IDH1	IDH2	IDH3B	IMMP2L	IMMT	ISCU	IVD
KARS	KIF1B	KRT5	KYNU	L2HGDH	LARS2	LDHA	LDHB	LETM1	LIAS	LRPPRC	MAOA
MAOB	MARS2	MCCC1	MCCC2	MCEE	MDH1	MFN2	MLYCD	MMAB	MMACHC	MPST	MPV17
MRPL3	MRPL48	MRPS16	MRPS22	MRRF	MTC2	MTFMT	MTHFD1	MTHFD1L	MTHFS	MTO1	MUT
MUTYH	NAGS	NARS2	NDUFA1	NDUFA10	NDUFA11	NDUFA12	NDUFA13	NDUFA2	NDUFA4	NDUFA6	NDUFA7
NDUFA8	NDUFA9	NDUFAF1	NDUFB3	NDUFB6	NDUFB9	NDUFC2	NDUFS1	NDUFS2	NDUFS3	NDUFS4	NDUFS5
NDUFS6	NDUFS7	NDUFS8	NDUFV1	NDUFV2	NDUFV3	NFU1	NIPSNAP1	NIPSNAP3A	NLRX1	NME1	NTHL1
NUBPL	OAT	OGG1	OPA1	OPA3	OTC	OXCT1	PACRG	PAK7	PANK2	PARK7	PARL
PC	PCCA	PCCB	PCK2	PDHA1	PDHB	PDHX	PDSS1	PDSS2	PEX11B	PHB	PHYH
PINK1	PMPCA	PNKD	POLG	POLG2	POLRMT	PPOX	PRODH	PTGES2	PTS	PYCR1	QDPR
RAB11FIP5	RPL35A	SARDH	SARS2	SCO1	SCP2	SDHA	SDHB	SDHC	SDHD	SECISBP2	SHMT1
SIRT3	SIRT5	SLC16A1	SLC22A4	SLC25A12	SLC25A13	SLC25A15	SLC25A19	SLC25A20	SLC25A22	SLC25A3	SLC25A39
SLC25A4	SOD1	SOD2	SPG7	SPR	SPTLC2	STAR	SUCLA2	SUCLG1	SUOX	SURF1	TAP1
TCIRG1	TFAM	TFB1M	TIMM44	TIMM8A	TK2	TMEM126A	TMEM70	TOMM40	TOP1MT	TRMU	TSMF
TSPO	TST	TTC19	TUFM	TXN2	TXNRD2	UCP1	UCP2	UCP3	UNG	UQCRB	UQCRQ
YARS2											

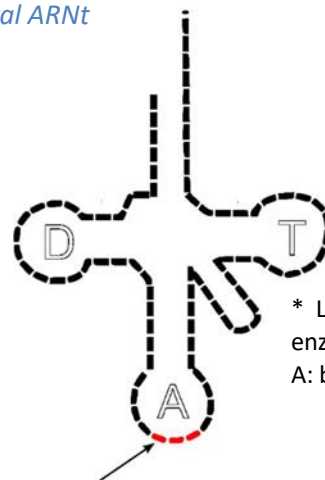
Se encontraron variantes potencialmente patológicas en 2 de los 8 pacientes estudiados (Tabla 36).

Tabla 36 - Variantes potencialmente patológicas encontradas mediante el exoma clínico

Paciente	Fenotipo	Gen	Variantes	Referencias
80	Síndrome de Leigh, déficit enzimático CI	NDUFV1 (NM_007103.3)	c.1157G>A, p.(Arg386His) / c.1157G>A, p.(Arg386His)	(198)
18	Síndrome de Leigh, déficit multienzimático, depleción	TRMU (NM_018006.4)	c.160_161delTG, p.(Cys54*) / c.680G>C, p.(Arg227Thr)	-

La variante encontrada en el paciente 80 está descrita como mutación patogénica, y se ha encontrado en niños con síndrome de Leigh con deficiencia en la actividad del CI del sistema OXPHOS; el gen *NDUFV1*, codifica una subunidad proteica estructural de 51 kDa del CI o NADH: ubiquinona oxidorreductasa, esta subunidad forma parte de la fracción flavoproteica del complejo, además juega un papel catalítico en la oxidación de NADH, ya que está asociada con la flavoproteína y la unión a NAD (199). Las variantes que se encontraron en el gen *TRMU* en el paciente 18, no están descritas en las bases de datos de frecuencias poblacionales. El gen *TRMU* codifica la proteína 5-metilaminometil-2-tiouridilato metiltransferasa, enzima necesaria para la maduración y modificación de los ARNt mitocondriales, siendo su función fundamental para la traducción mitocondrial. Concretamente, esta enzima realiza la tiouridilación del carbono 2 la uridina 34, que está situada en la posición de balanceo del anticodón de los ARNt mitocondriales lisina, glutamina y ácido glutámico (200).

Figura 27 - Esquema general ARNt



\* La flecha muestra la posición del anticodón, donde la enzima TRMU realiza la modificación. D: brazo D del ARNt; A: brazo A del ARNt; T: brazo T del ARNt.

En los pacientes en que no se encontraron variantes que se pudieran asociar a su fenotipo, se amplió el análisis al resto de genes del panel y no se encontraron variantes potencialmente patogénicas que se pudieran relacionar con su clínica.

### 6.3.4 Aplicación del exoma completo en el diagnóstico de pacientes con EM

Se utilizó la secuenciación del exoma completo en el proceso diagnóstico de pacientes con EM con o sin defectos cuantitativos o cualitativos en el ADNm, con el propósito de estudiar grandes grupos de genes implicados tanto en defectos del OXPHOS como en la replicación y mantenimiento del ADNmt. Se secuenciaron 9 pacientes (39, 40, 43, 47, 49, 60, 64, 73 y 78), 7 con deleciones múltiples en al ADNmt, 1 con depleción del ADNmt y 1 con déficit OXPHOS multienzimático.

La cobertura media que se obtuvo fue de 40 - 50X (Tabla 37).

Tabla 37 - Resumen de los resultados de cobertura y % de lecturas alineadas en la región diana de los exomas

Paciente	39	40	43	47	49	60	64	73	78
Cobertura media	43.01	39.30	28.50	65.34	51.40	77.47	50.89	63.82	64.42
BC 2X %	96	96	94	96	97	97	97	96	96
BC 30X %	59	55	39	72	66	77	66	64	70
BC 100X %	6	4	1	21	11	28	10	21	21
Lecturas alineadas en la región diana	75%	77%	80%	82%	78%	84%	78%	76%	85%

\* BC: Porcentaje de bases cubiertas



Se analizaron las variantes de los 1.128 genes descritos que se han relacionado con la función mitocondrial (129). En el filtrado de las variantes, se descartaron aquellas que estaban presentes en más de un paciente, aquellas con una frecuencia poblacional mayor del 1% (gnomAD), y las que no habían pasado los filtros de calidad (Q30).

Una vez realizado el análisis, se encontraron variantes potencialmente patogénicas en 2 de los 9 pacientes. Ninguna de las variantes había sido descrita con anterioridad en las bases de datos consultadas.

*Tabla 38 - Variantes encontradas con el estudio de exoma*

Paciente	Fenotipo	Gen	Variante
49	Anemia, insuficiencia pancreática, miopatía, déficit OXPHOS multienzimático, deleciones múltiples	<i>YARS2</i> (NM_001040436)	c.314delG, p.(Gly105Alafs*4)/ c.1391T>C, p.(Ile464Thr)
43	Epilepsia, fatiga, debilidad. Déficit OXPHOS multienzimático	<i>COQ10A</i> (NM_144576)	c.559T>C, p.(Cys187Arg) / c.559T>C, p.(Cys187Arg)

Aunque la variante encontrada en el paciente 49 no esa descrita como patogénica, se han descrito en otras en el mismo gen, se han descrito en pacientes con miopatía, acidosis láctica y anemia, tanto en pacientes pediátricos como adultos. El gen *YARS2* codifica la proteína tirosil-ARNt sintetasa, que cataliza la adhesión del aminoácido tirosina en el ARNt (Tyr). Cuando la función de esta enzima se ve alterada la síntesis de proteínas mitocondriales se ve afectada.

La variante encontrada en el paciente 43 está localizada en el gen *COQ10A*; el gen codifica una subunidad requerida para la formación de la coenzima Q10, aunque la función no se conoce perfectamente, se cree que ayuda a la correcta disposición de la coenzima Q10 en la membrana mitocondrial interna. En este gen no se han descrito variantes patogénicas asociadas a fenotipos clínicos.

## 6.4 Caracterización de variantes no descritas

### 6.4.1 Estudio in silico de las variantes potencialmente patogénicas

Se ha estudiado la posible patogenicidad *in silico* de las variantes no descritas encontradas en el diagnóstico genético con las técnicas de secuenciación masiva utilizadas (Tabla 39).

De las 15 variantes, 6 presentan una frecuencia poblacional en la base de datos de variantes gnomAD; el resto no han sido descrito con anterioridad.

*Tabla 39 - Variantes no descritas*

Gen	Variantes	Frecuencia poblacional (gnomAD)	SIFT/POLYPHEN/MUT.TASTER /CONSERVACIÓN
<i>MFN2</i>	c.1528C>T, p.(Arg510Trp)	0.04% (rs376598131)	0.04/0.91/patogénica/conservada
<i>MFN2</i>	c.5C>T, p.(Ser2Phe)	0.0008% (rs758996830)	0.00/0.92/patogénica /conservada
<i>OPA1</i>	c.267G>T, p.(Trp89Cys)	-	0.02/0.92/patogénica /conservada
<i>RRM2B</i>	c.514G>A, p.(Ala244Thr)	-	0.01/0.82/patogénica /conservada
<i>RNASEH1</i>	c.487T>C, p.(Tyr163His)	-	0.00/1.00/patogénica /conservada
<i>RNASEH1</i>	c.258_260del, p.(Gln86del)	0.01% (rs568073028)	-/-/polimorfismo/no conservada
<i>TRMU</i>	c.160_161delTG, p.(Cys54*)	-	-/-/patogénica /conservada

			Afecta pauta de lectura: 422 aa WT y 54 aa MUT
<i>TRMU</i>	c.680G>C, p.(Arg227Thr)	-	0.04/0.77/patogénica /Conservada
<i>YARS2</i>	c.314delG, p.(Gly105Alafs*4)	0.0009% (rs759877435)	-/-/ patogénica /conservada Afecta pauta de lectura: 478 aa WT y 108 aa MUT
<i>YARS2</i>	c.1391T>C, p.(Ile464Thr)	-	0.04/0.30/ patogénica /conservada en mamíferos
<i>COQ10A</i>	c.559T>C, p.(Cys187Arg)	0.002% (rs544870712 )	0.00/1.00/ patogénica /conservada en mamíferos
<i>POLG</i>	c.2803A>T, p.(Thr935Ser)	-	0.00/0.99/ patogénica /conservada
<i>SPG7</i>	c.2254_2255insA, p.( His752Glnfs*82)	-	-/-/ patogénica /conservada Afecta pauta de lectura:796 aa WT y 833 aa MUT

Todas las variantes cumplen criterios de patogenicidad, ya que o no están descritas en las bases de datos poblaciones o lo están en un bajo porcentaje, los predictores las clasifican como posible o probablemente patogénicas, además la posición del aminoácido esta conservada; a excepción de la variante p.(Gln86del) en el gen *RNASEH1* que está clasificada como polimorfismo y la posición del aminoácido en la proteína no está conservada.

#### 6.4.2 Caracterización de la patogenicidad de la mutación m.3634A>G en el gen *MTND1*

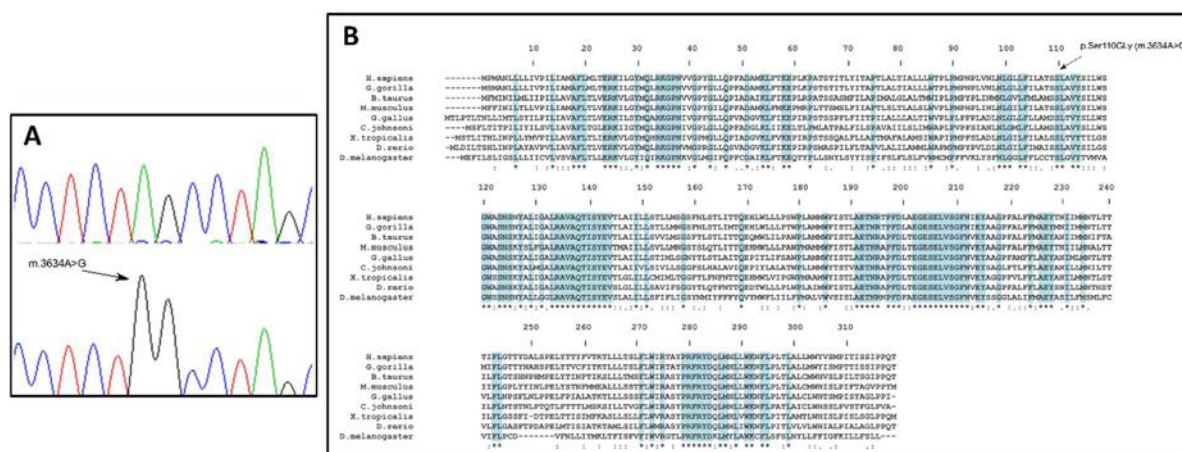
En un paciente con pérdida de visión repentina y mareos con sospecha de fenotipo clínico de LHON, durante el estudio de las tres mutaciones puntuales más comunes involucradas con este síndrome (m.3460G>A en *MTND1*, m.11778G>A en *MTND4*, and m.14484T>C en *MTND6*), se detectó la variante no descrita m.3634A>G (p.Ser110Gly) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..A**), en el gen *MTND1*. Se analizó completamente el ADNmt, para descartar variantes adicionales mediante el array de resecuenciación Mitochip V2; todas las variantes que se encontraron estaban catalogadas como polimorfismos según la base de datos Mitomap, con la excepción de la variante m.3634A>G. La presencia de los polimorfismos m.1715C>T, m.2706A>G, m.7028C>T, m.7094T>C, y m.16069C>T indicaban que el paciente pertenecía al haplogrupo HV4b.

##### 6.4.2.1 Conservación filogenética y análisis in silico de la variante

Se analizó la conservación filogenética de la secuencia de la proteína ND1 y de la posición nucleotídica m.3634 en 9 especies, estando representados desde mamíferos hasta insectos. Se vio que la serina 110 (m.3634A) es uno de los 109 aminoácidos completamente conservados en la secuencia de la proteína ND1 humana (ND1 contiene 318 aminoácidos, con el 34% conservados) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..B**), y la adenina 471 (m.3634A) en el gen *MTND1* humano, también estaba conservada en las especies analizadas. Por otro lado, al análisis bioinformático de la variante con distintos predictores de patogenicidad, desveló que el cambio en las propiedades fisicoquímicas de la proteína, coincidía con una sustitución de aminoácidos potencialmente dañina.

Para el estudio funcional de la variante, se generó una línea de cíbridos transmitocondriales a partir de plaquetas del paciente.

Figura 28 - Electroferograma y análisis de conservación de la variante m.3634A&gt;G p.(Ser110Gly)

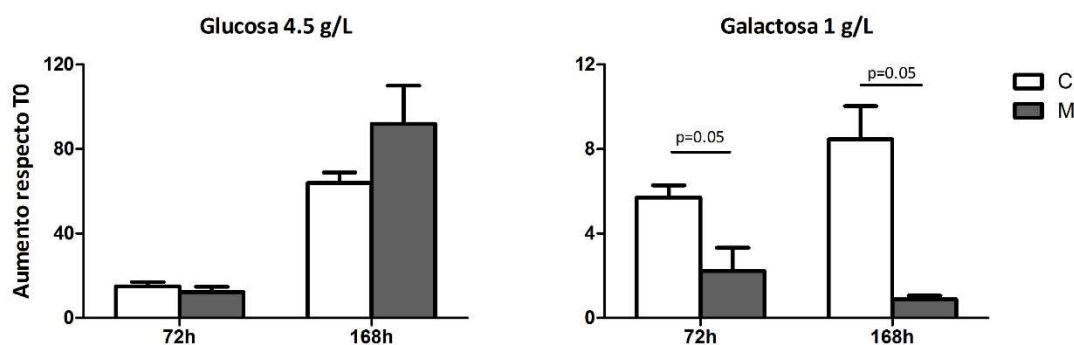


#### 6.4.2.2 Proliferación celular

Se estudió el crecimiento de la línea de cíbridos mutados, en medio glucosa (4.5 g/L) y galactosa (1 g/L).

En el medio glucolítico (glucosa 4.5 g/L), no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proliferación celular, ya que tanto en los cíbridos controles como en mutados, se observó un aumento de entre 80 y 100 veces más células que a tiempo 0. En cambio, después de 168 horas de crecimiento en medio oxidativo (galactosa 1 g/L) se encontraron diferencias significativas en la proliferación celular ( $P=0.05$ ) de los cíbridos controles respecto los mutados, ya que en líneas controles se observó un aumento de 8 veces el número de células respecto a tiempo 0, en los cíbridos mutados no se observó una proliferación celular, sino todo lo contrario, ya que el número de células había disminuido un 12% respecto al tiempo inicial (Figura 29).

Figura 29 - Crecimiento cíbridos en medio glucosa y galactosa



\* Crecimiento en medio con glucosa o galactosa después de 72 y 168 horas de cultivo. Los resultados se expresan como el incremento de células respecto al total de células contadas a tiempo 0. Se ha realizado el análisis a partir de 3 clones de la línea de cíbridos mutada (M) y 3 líneas de cíbridos controles (C).

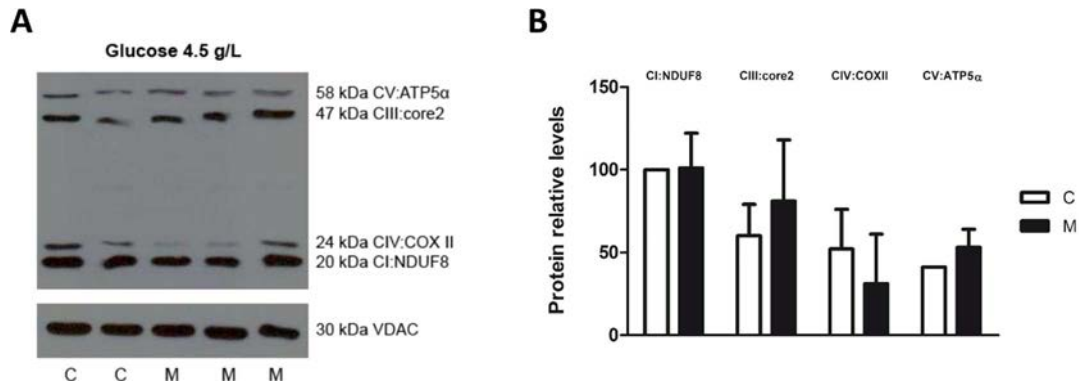
#### 6.4.2.3 Número de copias de ADNmt

Se observó que el número de copias de ADNmt, expresado como la proporción ADNmt/ADNn, era más alto en los clones mutados ( $389\pm 27$ ) que en los cíbridos controles ( $234\pm 62$ ) ( $P<0.05$ ).

#### 6.4.2.4 Contenido de proteínas OXPHOS

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de las proteínas OXPHOS codificadas por el ADNn (NDUF8: subunidad complejo I; ATP5 $\alpha$ : subunidad CV; Core 2: subunidad CIII) o por el ADNmt (COII: subunidad II del CIV) en los clones mutados (M) respecto los controles (C) (Figura 30). Los resultados se expresan como el porcentaje del valor medio de la densidad de la proteína NDUF8 obtenidos con los cíbridos controles.

Figura 30 - Niveles de proteínas OXPHOS



\*La proteína VDAC se usa como control de carga.

#### 6.4.2.5 Actividades de los complejos de la CTE

Se observó una disminución significativa en la actividad de los CI y CI+III en los clones mutados comparados con los cíbridos controles ( $P < 0.05$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias en la actividad de los CII, II+III y IV, cuando se expresó la actividad respecto a la de la citrato sintasa (Tabla 40).

Tabla 40 - Actividades enzimáticas de los complejos de la CTE

Complejo	Actividad (nm/min.mg)		Complejo/CS	Actividad relativa	
	M	C		M	C
CI	5.0 ± 0.3*	12.3 ± 0.8	CI/CS	0.04 ± 0.01*	0.11 ± 0.04
CI+III	5.4 ± 1.4*	13.7 ± 2.9	CII/CS	0.05 ± 0.01*	0.12 ± 0.05
CII	10.9 ± 2.6	11.9 ± 4.5	CIV/CS	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.05
CII+III	13.9 ± 4.8	20.7 ± 9.2	CI/CS	0.12 ± 0.04	0.17 ± 0.08
CIV	52.1 ± 12.2*	76.3 ± 17.4	CII/CS	0.42 ± 0.07	0.66 ± 0.24
CS	121.3 ± 8.6	126.6 ± 44.4			

\* $p \leq 0.05$ ; en la tabla aparecen los valores medios de actividad y la desviación estándar de los valores obtenidos de los 3 clones de la línea de cíbridos mutada y las 3 líneas de cíbridos controles.

#### 6.4.2.6 Potencial de membrana mitocondrial

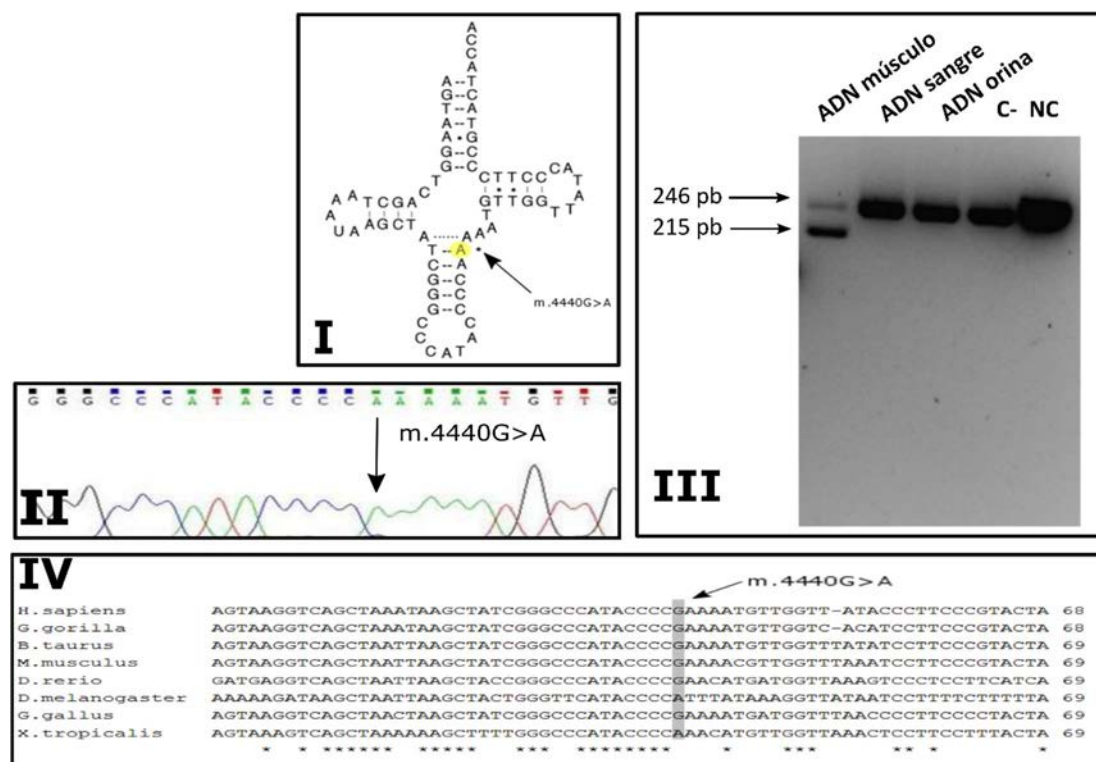
El potencial de membrana mitocondrial fue significativamente menor en los clones mutados, ya que se encontró una disminución del 70%  $\Delta\Psi_m$  en relación con los cíbridos controles

#### 6.4.3 Estudio de la mutación m.4440G>A en el gen *MTTM*

En un paciente con un fenotipo puramente miopático, hallazgos histológicos compatibles con miopatía mitocondrial y déficit multienzimático de la cadena de transporte mitocondrial en músculo, se secuenciaron los ARNt mitocondriales, y se encontró la variante m.4440G>A en el gen *MTTM* no

descrita anteriormente (<https://www.mitomap.org>) (Figura 31.I), solo en ADN de músculo en un 80% heteroplasmia (Figura 31.III), ya que no se detectó en sangre ni en orina. La variante está situada en el brazo del anticodón del ARNt mitocondrial metionina (Figura 31.II). La posición 39 del ARNt esta conservada en mamíferos, pero no en anfibios ni insectos (Figura 31.IV)

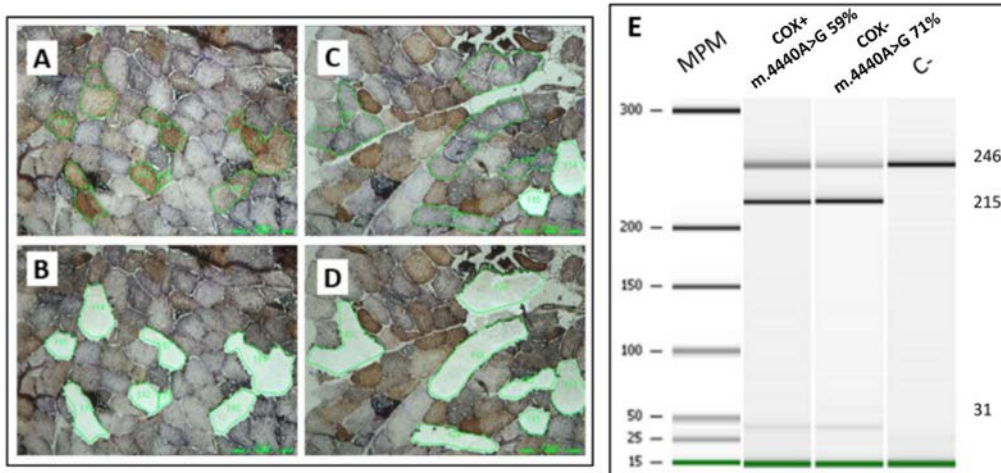
Figura 31 - Estudio de la mutación m.4440A>G



A partir de la doble tinción específica SDH-COX de diferentes secciones de la biopsia muscular del paciente, se realizó la microdissección de las fibras COX- (fibras no teñidas por falta de actividad COX) y las COX+ (fibras teñidas con el colorante). Las primeras, aparecen solo teñidas con el colorante de la tinción SDH (azul-liloso) (**iError! No se encuentra el origen de la referencia..A**), en cambio las COX+ se tiñen del color marrón característico de la tinción COX (**iError! No se encuentra el origen de la referencia..C**). A partir del material microdisseccionado, se extrajo el ADN para realizar el ensayo PCR-RFLP específico para esta mutación (**iError! No se encuentra el origen de la referencia..E**).

El análisis de la molaridad obtenida al cuantificar los fragmentos de PCR-RFLP se utilizó para calcular el porcentaje de mutación, se observó que las fibras COX-, tenían un porcentaje de la mutación del 71%, mientras que en las fibras COX+, el porcentaje era menor, del 59%.

Figura 32 - Microdissección y RFLP de la variante m.4440A&gt;G



\*A-B: Fibras COX+ y C-D: Fibras COX- antes y después de la microdissección respectivamente. E: PCR-RFLP del ADN de las fibras COX+ y COX- microdisseccionadas; C-: control negativo (línea cibridos sin mutaciones en al ADNmt).

#### 6.4.4 Estudio de las variantes c.487T>C y c.259\_261del en la proteína RNASEH1.

En un paciente con PEO y deleciones múltiples del ADNmt se encontraron dos variantes en el gen *RNASEH1* que podían estar relacionadas con el fenotipo que presentaba el paciente. Para el estudio del efecto de estas variantes sobre la actividad enzimática de la proteína RNASEH1, se obtuvieron fibroblastos del paciente y se produjeron proteínas RNASEH1 recombinantes humanas salvaje y mutadas en *E.Coli*. A continuación, se describen los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados.

##### 6.4.4.1 Estudio de la actividad de la proteína RNASEH1

###### 6.4.4.1.1 Síntesis de la proteína humana recombinante RNASEH1 salvaje y mutada

A partir del ARN extraído del pellet de los fibroblastos del paciente y el control sano, se obtuvo el ADNc mutado (con las dos variantes del paciente) y salvaje del gen *RNASEH1* humano (Figura 33).

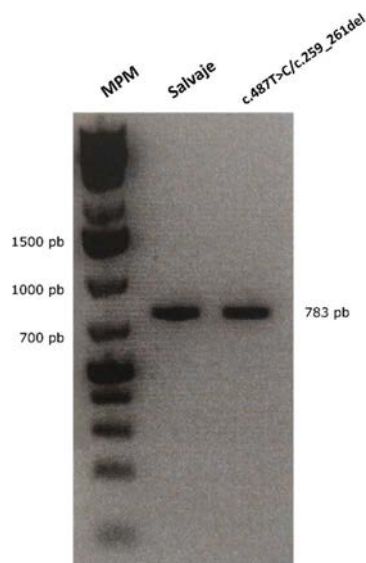
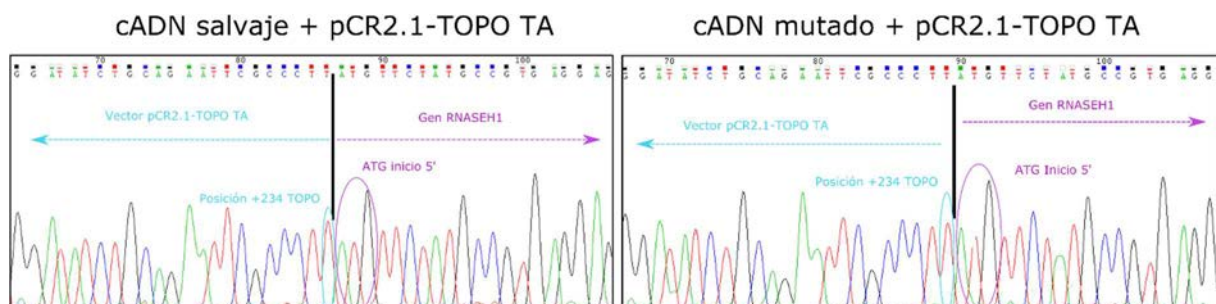


Figura 33 - cADN mutado y salvaje del gen RNASEH1 humano

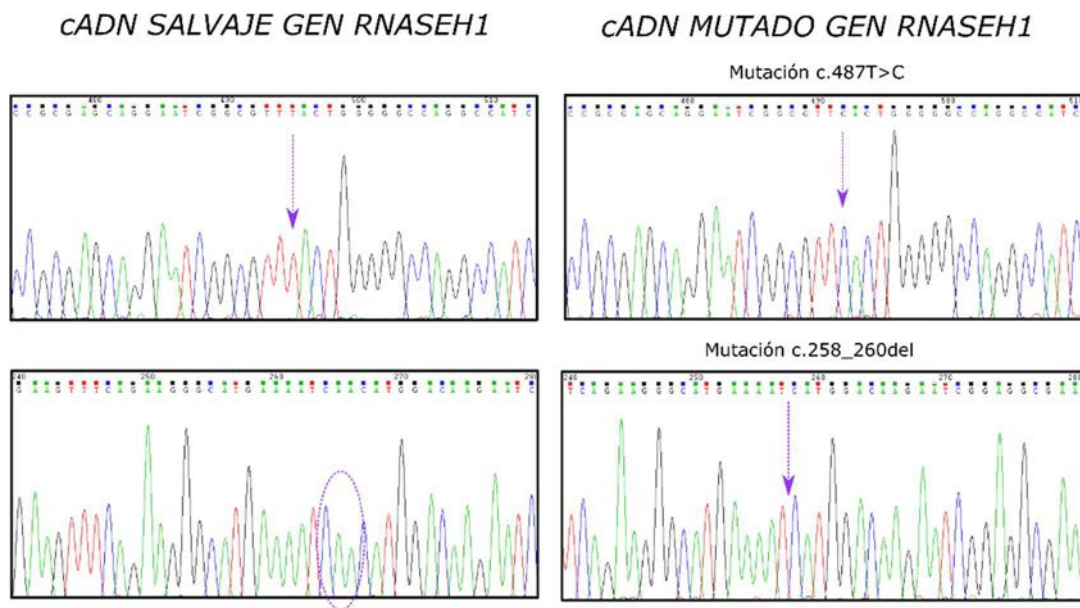
El producto de PCR obtenido en la amplificación del ADNc salvaje y mutado, se clonó en el vector pCR2.1-TOPO TA, con lo que se obtuvieron dos constructos, uno mutado y otro salvaje. Se seleccionaron aquellos constructos en los que el ADNc se clonó en la dirección requerida (Figura 34), ya que se necesita que el inicio del gen RNASEH1 se ligue con en el extremo +234 de vector, así la secuencia de restricción de la enzima BamHI queda al final del gen (en el extremo 3' del gen).

Figura 34 - Electroferograma de la clonación ADNc mutado y salvaje en pCR2.1 TOPO TA



A partir del constructo, vector pCR2.1-TOPO TA + ADNc salvaje, se generaron dos constructos más, uno solo con la variante c.487T>C (p.(Tyr163His)) y otro solo con la c.258\_260del (p.(Gln86del)) mediante mutagénesis dirigida (Figura 35).

Figura 35 - Mutagénesis dirigida de las variantes c.487T>C y c.258\_260del



Una vez obtenidos los 4 constructos diferentes, se introdujo la secuencia diana de la enzima de restricción NdeI en el extremo 5' del ADNc, justo antes de la primera secuencia ATG que da lugar al codón de inicio metionina (Figura 36).

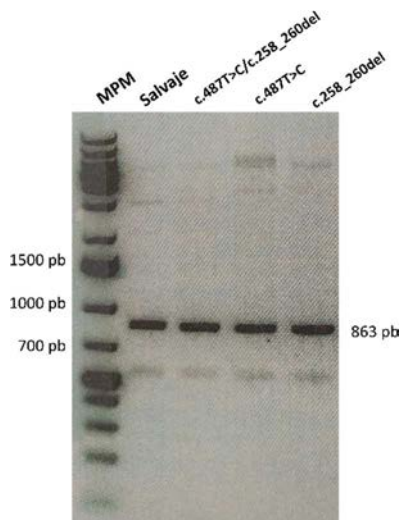
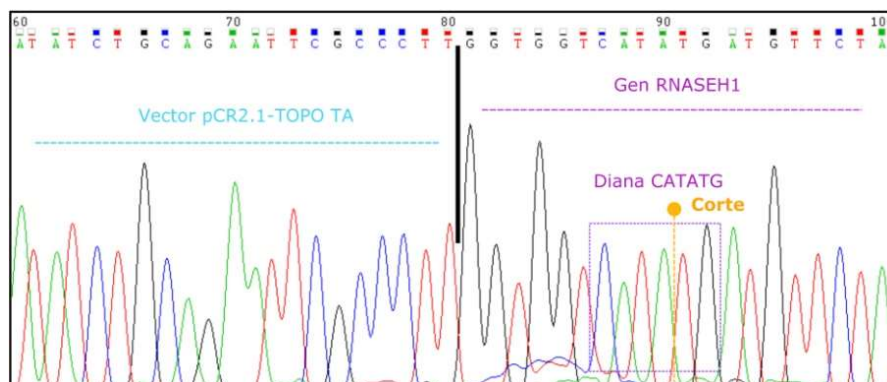


Figura 36 - Adición de la diana de restricción de NdeI

Se confirmó que los 4 constructos incorporaron la diana de la enzima NdeI (Figura 37).

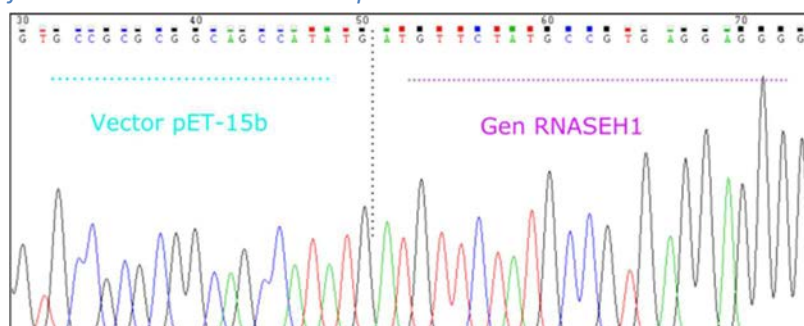
Figura 37 - Electroferograma tipo de los constructos con la incorporación de la diana de la enzima NdeI





Una vez obtenidos todos los constructos con la diana incorporada, se digirieron junto el vector de expresión VE pET-15b con las dos las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Después, se clonó el producto que corresponde al ADNc del gen *RNASEH1*, en el vector de expresión mediante ligación de los dos fragmentos previamente aislados de gel (Figura 38). Se realizó este clonaje para poder inducir la producción de la proteína en las bacterias *Escherichia Coli* que posteriormente se transformaron.

Figura 38 - Clonaje de los constructos en el VE pET-15b

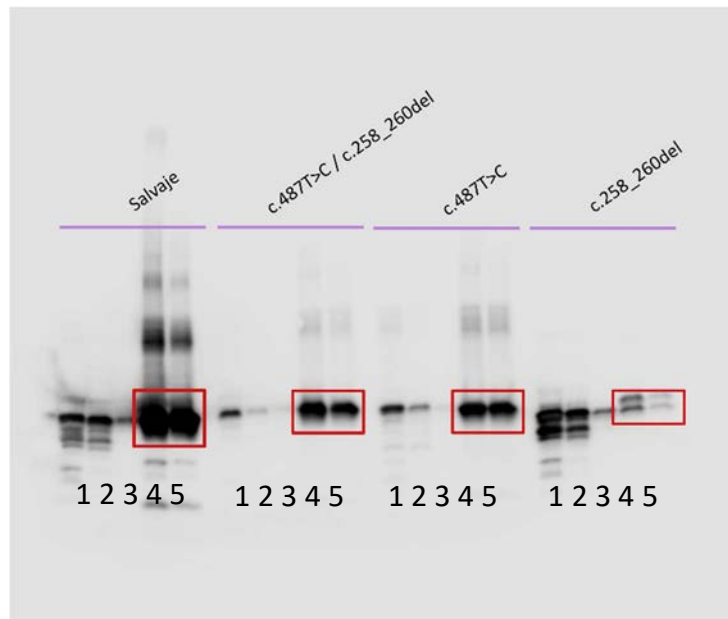


Una vez clonados los ADNc en el vector de expresión, se transformaron las bacterias *Escherichia Coli* de la cepa de BL21(DE3)pLysS con los diferentes constructos, y se indujo en ellas la expresión de las proteínas.

Las proteínas se purificaron a partir de los lisados de los cultivos de bacterias. En el proceso de purificación, se recogieron diferentes alícuotas (lisado inicial, lavado 1 y 2, elución 1 y 2) para comprobar la existencia de la proteína. Para visualizar la proteína se cargaron las diferentes alícuotas recogidas en la purificación en un gel de poliácridamida, que posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF para realizar una inmunodetección con el anticuerpo anti RNASEH1 humano (Figura 39). Se observó presencia de la proteína tanto en el lisado inicial (Figura 39, carriles 1) como en las dos eluciones (Figura 39, carriles 4 y 5), además se observó algo de pérdida cuando se realizaron los dos lavados (Figura 39 carriles 2 y 3), sobretodo en la proteína con la variante c.258\_260del (Figura 39).

Mediante la purificación de las proteínas con las columnas de afinidad a colas de histidina, se consiguió obtener entre 100 y 300 mg totales de las 4 proteínas.

Figura 39 - Validación de la purificación de las proteínas RNASEH1

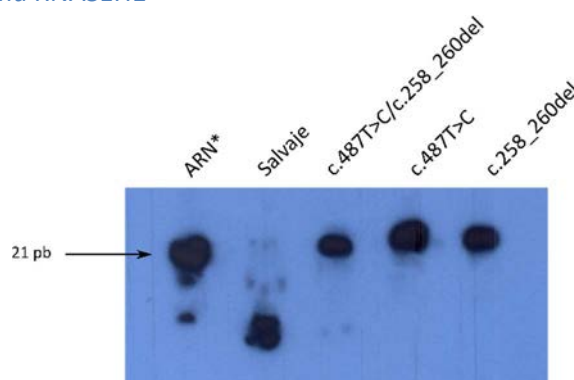


\* 1: lisado inicial; 2: lavado 1; 3: lavado 2; 4: elución 1; 5: elución 2

#### 6.4.4.1.2 Ensayo enzimático de la proteína RNASEH1

Como se puede apreciar (Figura 40), de las cuatro proteínas generadas, solo es capaz de cortar el sustrato la proteína salvaje, ya que la señal obtenida pertenece a un oligonucleótido de ARN más pequeño que el que forma el sustrato; en cambio el resto de proteínas no son capaces de cortar la cadena de ARN, ya que las señales que se obtienen tienen el mismo tamaño (21 pb) que la cadena de ARN utilizada como sustrato.

Figura 40 - Actividad enzima RNASEH1

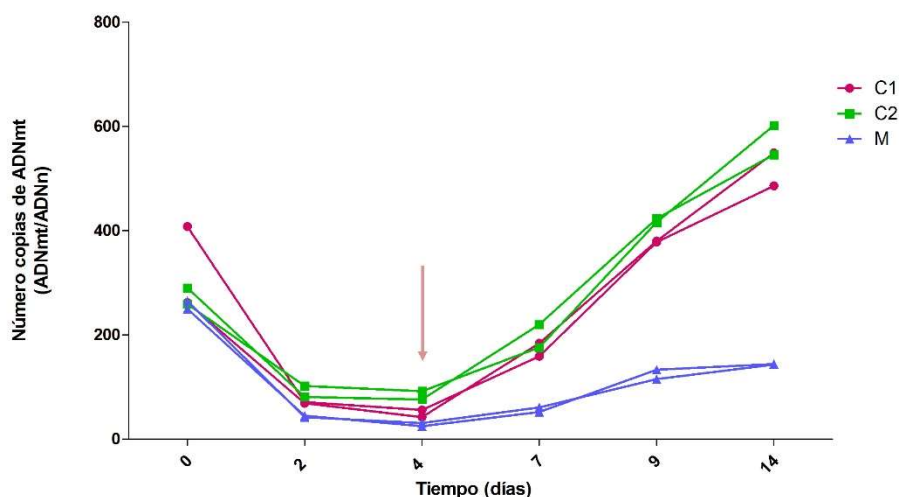


\* ARN\*: oligonucleótido de ARN de cadena simple marcado con fósforo radioactivo.

#### 6.4.4.2 Inducción de la depleción y recuperación del ADNmt en fibroblastos

En los fibroblastos controles se observó una recuperación del ADNmt cuando se retiró del medio con el bromuro de etidio, sin embargo en los fibroblastos del paciente no recuperaron los niveles de ADNmt a los diez días de la recuperación, solo llegaron a recuperar la mitad de los que presentaban en un inicio (Figura 41).

*Figura 41 - Recuperación del ADNmt en fibroblastos tratados con BrEt*

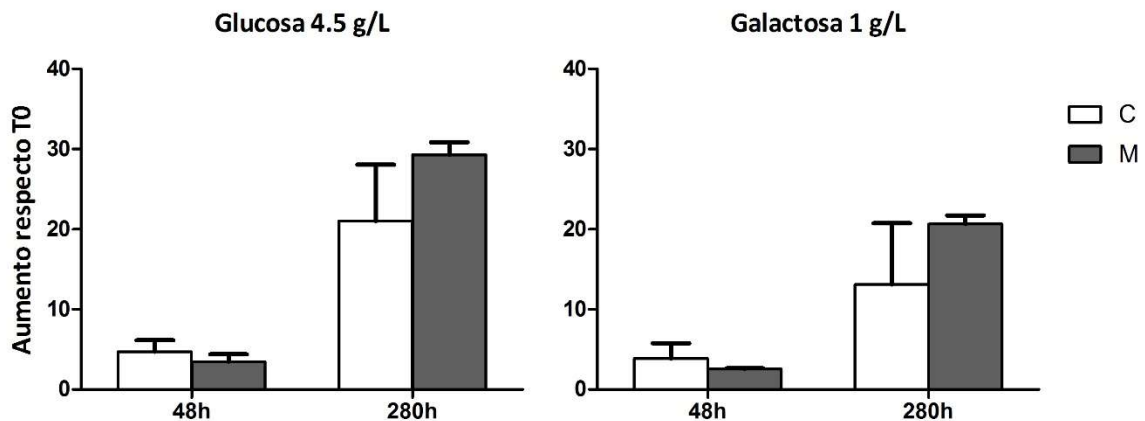


\* C: fibroblastos controles; M: fibroblastos con las variantes en RNASEH1. La flecha marca el final del tratamiento con el bromuro de etidio.

#### 6.4.4.3 Proliferación celular

Se registró el crecimiento de los fibroblastos de paciente, en medio glucosa (4.5 g/L) y galactosa (1 g/L). No se observaron diferencias significativas en cuanto la proliferación celular de los fibroblastos del paciente respecto a los fibroblastos controles, ni en medio glucolítico (4.5 g/L), ni medio oxidativo (galactosa 1 g/L) (Figura 42).

*Figura 42 – Crecimiento de fibroblastos en medio glucosa y galactosa*



\* Crecimiento en medio con glucosa o galactosa después de 48 y 280 horas de cultivo. Los resultados se expresan como el incremento de células respecto al total de células contadas a tiempo 0. Se ha realizado el análisis a partir de la línea de fibroblastos mutada (M) y 2 líneas de fibroblastos controles (C).

## 6.5 Caracterización de variantes modificadoras del fenotipo en pacientes con la variante m.1555A>G en gen *MTRNR1*

En la caracterización de variantes modificadoras del fenotipo de pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica y portadores de la variante m.1555A>G en el gen *MTRNR1*, se ha estudiado la secuencia del ADNmt completo y la variante c.28G>T en el gen *TRMU*. En total se han estudiado 23 pacientes.

### 6.5.1 Secuenciación del ADNmt de pacientes con la variante m.1555A>G

En los 23 pacientes, se han detectado un total de 639 variantes, de las cuales 32 eran heteroplásmicas. De las 38 variantes heteroplásmicas, 25 eran polimorfismos descritos y 13 no descritos; además, todos los polimorfismos no descritos se encontraron en los miembros de la familia 2, todos presentaban las variantes m.5237delG, m.5239T>C, además en el sujeto I.1 se encontró la variante m.2647G>A.

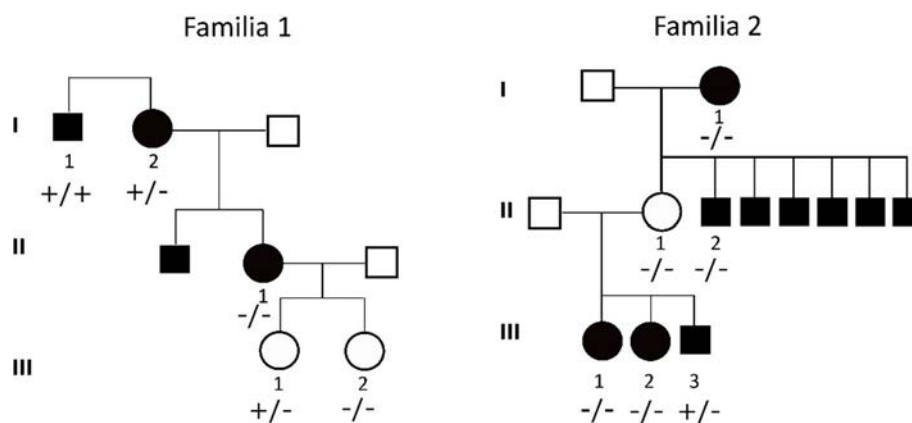
Se ha definido el haplogrupo mitocondrial a través del análisis de las variantes homoplásmicas. La familia 1 pertenecen al haplogrupo H, la familia 2 al L, la familia 3 al H3, y entre los pacientes no relacionados hay 4 con haplogrupo H3 y los demás pertenecen a los haplogrupos H, H1, J1c y L2.

### 6.5.2 Estudio de la variante c.28G>T en el gen *TRMU*

Se estudió la variante c.28G>T (p.(Ala10Ser)), situada en el exón 1 del gen *TRMU*; esta variante no está descrita como patogénica, pero varios autores la clasifican como posible modificador del fenotipo causado por la mutación m.1555A>G.

De los 23 sujetos estudiados, únicamente se ha encontrado la variante en 4 de ellos. Tres pertenecen a la familia 1 y uno a la familia 2. Los sujetos portadores del cambio en la familia 1 son el I.1, I.2 y III.1, el primero en homocigosis, y los dos restantes en heterocigosis. El sujeto portador de la variante en la familia 2, es el III.3 y se ha detectado en heterocigosis (Figura 43).

Figura 43 - Estudio de la variante c.28G>T



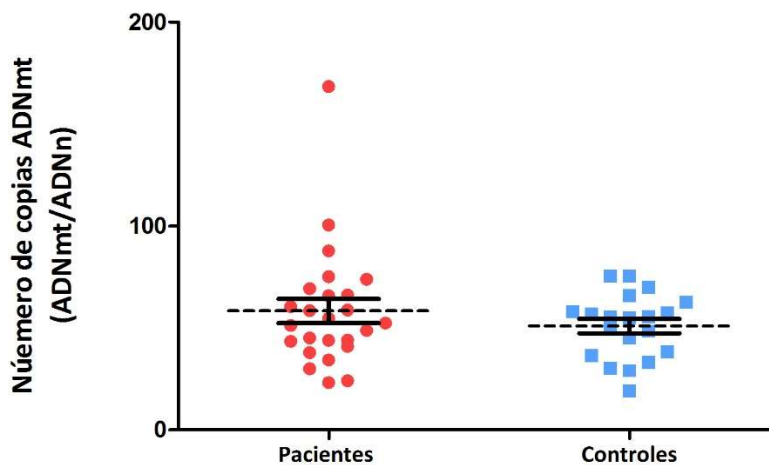
\* +/+ : paciente portador de la variante en homocigosis, +/- : paciente portador de la variante en heterocigosis; -/- : paciente no portador de la variante.

En la familia 1 no se aprecia la asociación entre la presentación de las variantes y el grado de severidad del fenotipo, porque tanto miembros con sordera como sin la presentan; en cambio en la familia 2, el único miembro que es portador de la variante coincide con el que padece el fenotipo más grave.

### 6.5.3 Estudio del número de copias de ADNmt

Se estudió el número de copias del ADNmt en ADN procedente de sangre de los pacientes con la mutación m.1555A>G.

Figura 44 - Número de copias de ADNmt en pacientes con la variante m.1555A>G



Los pacientes con la variante m.1555A>G presentan un promedio de 58 copias de ADNmt ( $58 \pm 58$ ) y en el grupo de sujetos controles no portadores de la mutación fue de 51 copias ( $51 \pm 12$ ). No existen diferencias significativas entre el número de copias de pacientes y controles (Figura 44).

## **7 DISCUSIÓN**



Las enfermedades mitocondriales primarias son uno grupo de trastornos hereditarios del metabolismo caracterizados por la alteración de la función mitocondrial, que en la mayoría de los casos deriva en una disfunción en el sistema OXHOS.

La gran heterogeneidad fenotípica de este grupo de enfermedades, que muchas veces se solapa con el de otras enfermedades (neuromusculares o metabólicas), y su origen genético dual, hacen que su diagnóstico genético sea complicado (165). Esto, se debe en parte a que en la gran mayoría de los pacientes no se pueden relacionar sus defectos clínicos o bioquímicos al origen genético (201) y, además, al gran número de genes que pueden estar relacionados con estos defectos.

Es crucial llegar a establecer un diagnóstico genético, ya que, aunque estas enfermedades aun no tienen curación, en algunas de ellas se puede frenar su progresión o tratar algunos de los síntomas; además, dado que muchos de los síndromes son de aparición pediátrica, con manifestación desde el nacimiento o los primeros meses o años de vida, y suelen ser letales, es importante encontrar su causa genética para dar un buen asesoramiento genético.

La incorporación de las técnicas de secuenciación masiva en el diagnóstico de las EM, ha mejorado diagnóstico de los pacientes, ya que permiten estudiar una gran cantidad de genes a la vez, en un tiempo relativamente corto. Además, están permitiendo tanto el descubrimiento de nuevas variantes patogénicas en genes conocidos que causan EM, como asociar nuevos fenotipos a genes ya relacionados previamente a síndromes mitocondriales o nuevos genes causantes de este grupo de enfermedades (202).

Durante el desarrollo de este trabajo, se ha integrado la secuenciación masiva en el diagnóstico de pacientes con fenotipo clínico de EM. Se ha puesto a punto la secuenciación del ADNmt completo, así como se ha diseñado y validado un panel de genes a la carta para su posterior aplicación diagnóstica, además, se ha aplicado el exoma clínico y el exoma completo a este diagnóstico. Finalmente, se han caracterizado variantes no descritas anteriormente, y se han estudiado posibles variables modificadoras del fenotipo en pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica portadores de la variante homoplasmica m.1555A>G en el ADNmt.

Una de las aproximaciones utilizadas en el diagnóstico de las EM, es el estudio de la secuencia completa del ADNmt en busca de variantes patogénicas. Hasta la aparición de la secuenciación masiva, las técnicas utilizadas para estudiar el ADNmt completo, eran la secuenciación Sanger y la resecuenciación con los microarrays de Affimetrix MitoChip v2.0 (203); las dos técnicas permiten detectar las variantes en la secuencia del ADNmt, pero no determinan su porcentaje de heteroplasmia. El límite de detección de la heteroplasmia es relativamente alto, sobretodo en la secuenciación Sanger, ya que no permite detectar variantes que están presentes en porcentajes inferiores al 20% - 30% (202, 204), en cambio, el Mitochip V2.0 se ha descrito que es capaz de detectar variantes de hasta el 2% de heteroplasmia(205).

Actualmente, es mucho más eficiente aplicar las técnicas de secuenciación masiva para estudiar el ADNmt, ya que además de detectar las variantes respecto a la secuencia de referencia determinan su porcentaje de heteroplasmia.



Para comprobar la sensibilidad de la plataforma de secuenciación masiva MiSeq en la detección de variantes y su grado de heteroplasmia, se han comparado las variantes detectadas con esta plataforma, con aquellas detectadas con técnicas tradicionales (Sanger o Mitochip), así como con otra plataforma de secuenciación masiva (PGM), en 24 pacientes con fenotipo clínico de EM. De los 24 pacientes, 16 eran portadores de variantes patogénicas.

Se han detectado las mismas variantes patogénicas con las diferentes tecnologías utilizadas, así que en este grupo de pacientes cualquiera de las aproximaciones utilizadas permite realizar el diagnóstico genético. Además, no se han encontrado variantes patogénicas en bajos porcentajes de heteroplasmia en los 8 pacientes que no se habían encontrado anteriormente.

En cuanto al porcentaje de heteroplasmia, se ha determinado aproximadamente el mismo porcentaje en todas las variantes, a excepción de la muestra 990, ya que su porcentaje de heteroplasmia fue del 7% con la técnica PCR-RFLP, en cambio la plataforma MiSeq fue del 16%. En la técnica de RFLP, la detección del porcentaje de heteroplasmia de las variantes, puede resultar imprecisa debido a la digestión incompleta de la muestra (202); en estos casos se puede comprobar el porcentaje real de la variante en la muestra, realizando una RFLP en que la diana de la digestión sea la variante salvaje.

Respecto a la detección del número de variantes totales, las plataformas de secuenciación masiva detectan un número más elevado que las aproximaciones convencionales. Se han detectado 12 variantes más entre las dos plataformas de secuenciación masiva en porcentajes superiores al 50% de heteroplasmia; 7 de las variantes se han encontrado con las dos plataformas, sugiriendo que el problema no está en la detección de estas plataformas, sino en la sensibilidad de detección de las técnicas de referencia. Los cambios que se han encontrado pertenecían a 5 muestras, 4 de ellas diagnosticadas con MitoChip y 1 con secuenciación Sanger; además, todas las variantes extras que se han encontrado con las plataformas de secuenciación masiva, se han situado en la región control a excepción de m.8271delACCCCCTCTC y m.10400C>T. El Mitochip es una técnica que captura a partir de cientos de sondas el ADNmt; cuando hay una variante en el ADNmt, situada en el región de unión con la sonda, la captura de la zona no se realiza adecuadamente; además no detecta con precisión las deleciones e inserciones, sobre todo aquellas que implican más de una base y el reconocimiento de segundas variantes en una misma región no se realiza adecuadamente (206); esto podría explicar que la mayoría de las variantes estén en la zona no codificante, que a su vez es la zona hipervariable.

La plataforma MiSeq es adecuada para realizar el diagnóstico de pacientes con EM, ya que tanto la sensibilidad como la especificidad en la detección de variantes en la región codificante es prácticamente del 100%. La región codificante es la zona donde se localizan los genes mitocondriales, además es la zona más conservada del genoma mitocondrial, en cambio la región no codificante o región control, es la región hipervariable, en la que se concentran la mayor parte de las variantes o polimorfismos sin tener efecto apreciable en el fenotipo de los pacientes.

La cobertura obtenida utilizando el kit Nextera XT para preparar las librerías de ADNmt no era homogénea, pero el cambio de estrategia de fragmentación del ADNmt con la enzima dsDNA fragmentasa, ha mejorado la homogeneidad de la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt, aunque siguen habiendo zonas donde la cobertura es más baja. Normalmente no hay una presentación homogénea de los cuatro nucleótidos en los genomas, hay regiones ricas en GC, que son difíciles de

amplificar (207), en estas zonas las ADN polimerasas son propensas a producir artefactos, que producirán lecturas de baja calidad en las plataformas de la secuenciación masiva que se basan en la secuenciación por síntesis, como es el caso de las plataformas de Illumina o Ion Torrent, esto se manifestará en una disminución de la cobertura en estas regiones, que es lo que observamos a la hora de secuenciar el ADNmt. Otro aspecto que puede influir en la cobertura de las regiones, es la fragmentación del ADN; uno de los métodos utilizados es la fragmentación enzimática; este tipo de fragmentación es más rápida que la realizada con los métodos físicos (nebulización o sonicación), pero se ha visto que no producen una fragmentación tan aleatoria y esto también influye en la uniformidad de la cobertura (208, 209).

La secuenciación masiva también es útil en el estudio de las deleciones simples del ADNmt, ya que permite su localización. Las zonas del ADNmt delecionadas sufren una disminución drástica de la cobertura, evidenciándose en los programas de visualización de secuencias como IGV. Si bien es muy adecuado para la delimitación de la zona de la deleción, no es útil para su cuantificación, ya que la utilización de la LPCR previa a la preparación de las librerías de ADN, amplifica preferentemente las moléculas menores, magnificando la proporción de moléculas delecionadas. Para cuantificar las deleciones simples, se puede realizar una RT-PCR (210, 211).

La utilización de un panel de genes diseñado a la carta, ha permitido estudiar molecularmente genes implicados en el mantenimiento del ADNmt, cuyas alteraciones causan defectos secundarios en el ADNmt (depleción o deleciones múltiples). El número de genes asociados a estos defectos, ha ido creciendo en los últimos años, siendo *POLG* el gen más estudiado asociado a deleciones múltiples del ADNmt (138).

El diseño del panel a la carta, se realizó con una estrategia de amplicones como método de enriquecimiento de las zonas de interés. En el primer panel, se incluyeron 13 genes (*DGUOK*, *MFN2*, *MPV17*, *OPA1*, *POLG*, *POLG2*, *RRM2B*, *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TK2*, *TWINK*, *TYMP*), cubiertos por 600 amplicones de un tamaño de entre 100 y 150 pb. La cobertura real observada en los 13 genes, era inferior a la esperada, ya que quedaban 25 zonas sin cobertura o con cobertura insuficiente para realizar el correcto llamamiento de bases. Estas 25 zonas sin cobertura, se debían estudiar mediante secuenciación Sanger. Aunque la cobertura del panel fue inferior a la esperada, se detectaron todas las variantes de las muestras utilizadas en la fase de validación, a excepción de los que estaban en el gen *TYMP*; este gen no quedaba bien cubierto por el panel, seguramente por su alto contenido en zonas GC.

Debido al elevado número de secuencias Sanger adicionales que se debían realizar complementarias a la secuenciación con el panel, se decidió volver a diseñarlo, aprovechando el cambio del software de diseño (QIAseq Targeted DNA Custom Panel Builder). En la versión 2 del panel se incluyeron 17 genes (*DGUOK*, *MFN2*, *MPV17*, *OPA1*, *POLG*, *POLG2*, *RRM2B*, *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *TK2*, *TWINKLE*, *DNA2*, *SPG7*, *MGME1*, *RNASEH1*, *FBXL4*) y se excluyó el gen *TYMP*, ya que no se optimizó la cobertura de este gen con el nuevo programa de diseño.

El gen *TYMP* causa un fenotipo muy concreto de EM, la enfermedad de MNGIE; el diagnóstico de estos pacientes se realiza bioquímicamente estudiando la acumulación de los sustratos de la enzima timidina fosforilasa en sangre (timidina y desoxiuridina) y su actividad enzimática. El diagnóstico genético se lleva a cabo cuando el resultado bioquímico es positivo, mediante secuenciación Sanger de los 10 exones del gen (212).

La versión V2 del panel utiliza la amplificación de 400 amplicones para estudiar los 17 genes. Durante la fase de validación se utilizaron 12 muestras previamente secuenciadas con el panel V1, y se confirmaron todas las variantes encontradas en los genes comunes. Además, se encontró una variante adicional en el paciente 55 (c.1342A>G), en el gen *TWNK*; este gen se cubría perfectamente en la versión V1 del panel, pero concretamente en esta muestra no se obtuvo la suficiente cobertura en la región, por lo cual no se detectó.

Las aproximaciones basadas en el enriquecimiento de las regiones de interés mediante amplicones, como es el caso de los paneles de genes diseñados a la carta, en ocasiones comportan problemas en la amplificación de ciertas regiones, porque la amplificación con alguno de los pares de cebadores puede no ser óptima. Además, cuando se generan paneles a la carta, se realiza un diseño optimizado *in silico*, pero no se valida experimentalmente. Esto no sucede con los paneles de genes diseñados y validados por las casas comerciales, en los que si se ha validado su uso en el diagnóstico y todas las regiones de interés están cubiertas, enriqueciendo determinadas zonas en caso de que sea necesario.

Una vez puesto a punto la secuenciación del ADNmt y la validación del panel de genes para la plataforma de secuenciación MiSeq, se aplicaron estas dos técnicas, junto a la del exoma clínico y exoma completo en el diagnóstico de pacientes con fenotipo clínico de EM.

Se estudiaron 32 pacientes con sospecha diagnóstica de EM de origen en el ADNmt. De este grupo de pacientes, 18 presentaban un fenotipo de síndrome mitocondrial clásico (9 de MELAS, 2 de LHON y 7 de síndrome de Leigh) y 14 presentaban síntomas de EM no específicos de un síndrome mitocondrial concreto (miopatía, encefalopatía, acidosis láctica, hipotonía, debilidad).

En 6 de los 9 pacientes con fenotipo clínico de síndrome de MELAS, se han encontrado variantes patogénicas; de estos 6 pacientes, 4 presentaban la variante m.3243A>G en el gen *MTTL1*, 1 la variante m.3260A>G en el gen *MTTL1* y 1 la m.8356T>C en el gen *MTTK*. Las 6 variantes se han encontrado en heteroplasmia, 2 de ellas en un porcentaje muy bajo en sangre (9 y 10%). Estas muestras con bajos porcentaje de heteroplasmia en ADN de sangre, se estudiaron inicialmente por secuenciación Sanger las mutaciones más comunes asociadas a su fenotipo, pero no se pudieron llegar a diagnosticar debido a que las variantes estaban en un porcentaje por debajo del límite de detección de la secuenciación Sanger. El síndrome de MELAS, es una de las EM de origen materno más frecuentes, en el que se observan unas manifestaciones clínicas asociadas muy variadas (accidente cerebrovascular de tipo isquémico, demencia, epilepsia, acidosis láctica, miopatía, migrañas, sordera y diabetes) y en el 80% de los casos están causados por la mutación m.3243A>G (177); debido a que la variante es la más frecuente causante de este síndrome es la mayoritaria encontrada en este grupo de pacientes. Por

otro lado, se han descrito otras variantes causantes de este síndrome en el mismo gen, como la encontrada en uno de los pacientes (213), o en otros genes del ADNmt, aunque son mucho menos frecuentes (214). Por último, en uno de los pacientes clasificado inicialmente con un fenotipo clínico de síndrome de MELAS, se ha encontrado la variante patogénica m.8356T>C, esta variante está asociada como causa del síndrome de MERRF, pero se ha encontrado en pacientes con fenotipo solapante de síndrome de MERRF y MELAS (183). La secuenciación completa del ADNmt fue muy útil en este paciente, ya que inicialmente se secuenciaron por Sanger las variantes más frecuentes causantes de MELAS; si no se hubiera realizado la secuenciación completa del ADNmt no hubiera sido posible diagnosticarlo genéticamente ya que no se sospechaba de síndrome de MERRF.

De los 14 pacientes estudiados con EM no asociada a un síndrome mitocondrial específico, se han encontrado variantes patogénicas en 4. Estos pacientes presentaban miopatía, mialgia y debilidad de cinturas. En 3 pacientes se encontró la variante m.3243A>G en el gen *MTTL1*, con una heteroplasmia del 53-71% en ADN de músculo en los pacientes 31 y 25, y del 20% en ADN de sangre en el paciente 21. Aunque esta variante es la causa más frecuente del síndrome de MELAS, se ha asociado a múltiples fenotipos, entre ellos la miopatía aislada (177); en uno de los pacientes que presentaba debilidad de cinturas, se encontró la variante m.8344A>G en el gen *MTTK* (178); esta variante se ha asociado al síndrome de MERRF. Aunque las dos variantes encontradas, están asociadas a síndromes mitocondriales específicos, también se han asociado a pacientes con miopatía mitocondrial (178). La miopatía mitocondrial agrupa un conjunto de enfermedades con afectación aislada o predominante del músculo esquelético caracterizadas por la debilidad muscular de los pacientes, que en algunos casos se puede diagnosticar como distrofia muscular de cinturas o debilidad de cinturas, debido a la similitud de los síntomas entre dos afectaciones.

En 4 de los 7 pacientes con síndrome de Leigh se han encontrado variantes patogénicas. De estos 4 pacientes, 3 presentaban la variante m.10197G>A en el gen *MTND3* y 1 la variante m.12706T>C en el gen *MTND5*. Las 4 variantes se han encontrado en altos porcentajes de heteroplasmia en sangre o músculo (76-100%). El paciente con la variante m.12706T>C, presentó un fenotipo clásico de síndrome de Leigh (lesiones cerebrales, acidosis láctica e hipotonía), esta variante es una de las más frecuentes asociadas a este síndrome (180). Los 3 pacientes con la variante m.10197G>A, eran miembros de una misma familia, madre (paciente 13) e hijos (pacientes 12 y 10); la madre presentó un porcentaje de heteroplasmia más bajo de la variante. La variante m.10197G>A está asociada a este síndrome de Leigh y a distonía (179); además, se ha descrito en familias en que miembros adultos portadores en homoplasmia presentaban fenotipos de síndrome de LHON únicamente con afectación visual (215). Los 3 pacientes restantes con síndrome de Leigh en los que no se encontró variantes patogénicas en el ADNmt (14, 17, 18), se estudiaron mediante el exoma clínico, ya que este fenotipo también está asociado a variantes patogénicas en genes nucleares.

El síndrome de LHON es una neuropatía óptica caracterizada por una pérdida de visión bilateral en pacientes adultos, siendo más común en hombres que en mujeres. La mayoría de los pacientes presentan una de las tres mutaciones en homoplasmia más comunes, m.3460G>A (*MTND1*), m.11778G>A (*MTND4*) y m.14484T>C (*MTND6*). Se ha encontrado una variante patogénica en 1 de los 2 pacientes con este fenotipo clínico. El paciente presentaba la variante m.13513G>A en el gen

*MTND5*. La variante se ha encontrado en un bajo porcentaje de heteroplasmia en sangre (29%). El paciente sufrió una pérdida visual repentina y posteriormente se observó una atrofia del nervio óptico. La variante encontrada, se describió por primera vez en pacientes con síndrome de MELAS (216), pero se ha asociado posteriormente a síndrome de Leigh (217) y más recientemente se ha encontrado en pacientes con fenotipo solapante de Leigh/MELAS/LHON (181); el paciente 1755 solo tiene afectación de LHON, por lo que estaríamos ante el primer caso de síndrome de LHON aislado provocado por esta variante.

Utilizando la secuenciación completa del ADNmt, se han diagnosticado el 47% de los pacientes con sospecha diagnóstica de EM de origen en el ADNmt. Concretamente, se han diagnosticado el 61% de los pacientes con sospecha diagnóstica de síndrome mitocondrial clásico y el 28% de los pacientes con EM no asociada a un síndrome mitocondrial específico. En el diagnóstico de las EM es fundamental una caracterización clínica exhaustiva de los pacientes utilizando diferentes técnicas diagnósticas, ya que de eso dependerá el éxito del diagnóstico genético (165). Los pacientes en los que no se han encontrado variantes patogénicas, es necesario su reevaluación clínica, para poder dirigir su diagnóstico.

También se han estudiado los pacientes con sospecha diagnóstica de EM de origen nuclear, utilizando el panel de genes a la carta, el exoma clínico y el exoma completo.

Se estudiaron 54 pacientes aplicando el panel de genes a la carta, 30 con deleciones múltiples, 6 con depleción, 3 con deleciones simples y 15 pacientes con fenotipo mitocondrial sin alteración secundaria del ADNmt. Se encontraron variantes potencialmente patogénicas en 13 pacientes con deleciones múltiples y en 1 con atrofia óptica.

Los 13 pacientes con deleciones múltiples del ADNmt en que se han encontrado variantes potencialmente patogénicas, eran pacientes adultos y la mayoría presentaba un fenotipo clínico de PEO, como la mayoría de los pacientes adultos descritos con deleciones múltiples y con defectos en algún gen involucrado en el mantenimiento del ADNmt.

El gen *POLG* codifica la enzima polimerasa y clave para la replicación del ADNmt; se han descrito más de un centenar de variantes patogénicas, siendo las más comunes p.(Ala467Thr), p.(Gly848Ser), p.(Trp748Ser) y la doble variante en conformación en cis p.(Thr251Ile) + p.(Pro587Leu). En 4 pacientes se encontraron variantes en este gen. El paciente 74 presentaba PEO, se encontró la variante p.(Tyr955Cys) en heterocigosis, descrita previamente en pacientes con PEO dominante con deleciones múltiples (218). En el paciente 61 con ptosis, hipoacusia, migrañas, fatiga muscular, se encontraron 3 variantes (p.(Gly848Ser), p.(Thr251Ile) y p.(Pro587Leu)), descritas como patogénicas en pacientes con ptosis, PEO, miopatía y neuropatía con deleciones múltiples; dos de las variantes de este último paciente (p.(Thr251Ile) y p.(Pro587Leu)), se han encontrado aisladas en el paciente 66 con PEO; las variantes p.(Pro587Leu) y p.(Thr251Ile), se han visto que normalmente se heredan juntas en el mismo alelo y tienen un efecto deletéreo cuando se heredan junto con otra variante patogénica en el otro alelo, aunque las dos variantes por separado afectan negativamente a la actividad de la enzima, no se

han encontrado con anterioridad de manera aislada como causantes del fenotipo clínico en pacientes (186, 219-221), por eso es necesario estudiar a los familiares del paciente para comprobar si están en cis o en trans, ya que solo si se hubieran heredado en los dos alelos de manera aislada serían la causa del fenotipo clínico de la paciente o estaríamos ante el primer caso en que se hubieran asociado a fenotipo clínico. Por último, en el paciente 71 con PEO se han encontrado dos variantes (p.(Tyr282Asp) y p.(Thr935Ser)), la primera está descrita como patogénica y se ha asociado a pacientes pediátricos con depleción (192) y la segunda no está descrita pero los predictores de patogenicidad la catalogaron como patogénica; las dos variantes podrían ser la causa del fenotipo del paciente, ya que variantes en este gen se han asociado a pacientes con PEO dominante o recesiva con deleciones múltiples (139).

El gen *TK2* codifica la enzima timidina quinasa, involucrada en la ruta de salvamento de los deoxiribonucleótidos necesarios para la replicación del ADNmt; se han descrito unas 40 variantes patogénicas en este gen. Se encontraron variantes patogénicas en este gen en dos pacientes. El paciente 65 que presentaba un fenotipo de miopatía mitocondrial con manifestación en edad adulta, se encontraron dos variantes en heterocigosis en el gen *TK2* (p.(Arg130Trp) y p.(Ala139Thr)); las variantes se han descrito independientemente en heterocigosis como patogénicas en pacientes pediátricos con miopatía y depleción del ADN mitocondrial (187-190). El paciente 1666 con ptosis y debilidad de cinturas, presentó la variante p.(Lys202del) en homocigosis; esta variante está descrita como patogénica en pacientes con depleción del ADNmt y miopatía (196). Las variantes patogénicas en este gen se asociaban comúnmente a niños con síndrome de depleción mitocondrial, hasta que se empezaron a utilizar las técnicas de secuenciación masiva en el diagnóstico en pacientes adultos con fenotipos miopáticos más leves y deleciones múltiples, y se pudieron asociar variantes patogénicas en este gen a estos grupos de pacientes (222, 223).

El gen *TWINK* codifica la proteína TWINKLE, que permite la relajación de la doble cadena de ADNmt durante su replicación. Se han descrito unas setenta variantes patogénicas en el gen. Se han encontrado variantes patogénicas en dos pacientes. El paciente 56 con ptosis, oftalmoplejía y disartia, presentó la variante en heterocigosis p.(Arg334Pro), asociada a pacientes con PEO dominante y deleciones múltiples (191). Además, se encontró en el paciente 55 con ptosis bilateral y oftalmoplejía, la variante p.(Asn448Asp) en heterocigosis en el gen. La variante está descrita como patogénica en pacientes adultos con PEO y deleciones múltiples (197).

El gen *SPG7* codifica la proteína paraplegina que forma parte de un complejo proteolítico ATP dependiente integrado en la membrana mitocondrial interna, este participa en la degradación de proteínas mal plegadas y regula el ensamblaje del ribosoma. Se han descrito unas 90 mutaciones patogénicas en este gen. En el paciente 58 con ptosis bilateral, ataxia, disfagia y diplopía, se encontraron dos variantes (p.(Ala510Val) y p.(His752Glnfs\*82)) en el gen *SPG7*. La primera variante está descrita como patogénica en pacientes con trastornos de la neurona motora (224), la segunda no está descrita pero los predictores de patogenicidad la han catalogado como patogénica, ya que el cambio produce una alteración en la pauta de lectura, que predice una proteína más larga, de 832 aa, que la salvaje, de 795 aa; aunque la mayoría de variantes patogénicas en este gen se han asociado a paraplejía espástica o ataxia cerebelar (225), recientemente se han descrito mutaciones recesivas en

8 pacientes con PEO y deleciones múltiples en el ADNmt (226), hecho que sugiere que probablemente estas dos variantes sean la causa genética del fenotipo del paciente.

El gen *MFN2* codifica una proteína de membrana que participa en la fusión de mitocondrias y contribuye en el mantenimiento de la red mitocondrial. Se han descrito casi 200 mutaciones patogénicas en el gen. En dos pacientes se han detectado variantes potencialmente patogénicas en heterocigosis en este gen. El paciente 72 con PEO y miopatía es portador de la variante p.(Arg510Trp); la variante tiene una frecuencia poblacional muy baja (0.005%), pero no se ha relacionado a un fenotipo clínico; por otro lado, el paciente 59 con ptosis bilateral y dislipemia presenta la variante p.(Ser2Phe); esta variante se encontró en las bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0.0008%, pero no tiene una significación clínica asociada; variantes patogénicas dominantes en este gen, se han asociado clásicamente a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A y otros síntomas como atrofia óptica, sordera neurosensorial o paraparesia espástica (227, 228), recientemente se han descrito mutaciones en el gen en pacientes con atrofia óptica asociada a neuropatía axonal y miopatía mitocondrial con deleciones múltiples, fenotipo conocido como atrofia óptica “plus” (229). Los dos pacientes en los que hemos encontrado las variantes, tienen signos de miopatía mitocondrial con deleciones múltiples del ADNmt, pero sin que se haya asociado atrofia óptica, por eso es necesario realizar una reevaluación clínica para conocer la implicación de las variantes encontradas con el fenotipo que presentan estos pacientes.

El gen *RRM2B* codifica una proteína involucrada en la ruta de síntesis *de novo* de los deoxiribonucleótidos difosfato. Se han asociado unas 40 mutaciones patogénicas a este gen. En el paciente 69 con fenotipo PEO, se encontró la variante p.(Ala244Thr) en heterocigosis en el gen *RRM2B*, aunque la variante no ha sido descrita, se podría asociar al fenotipo clínico del paciente, ya que otras variantes patogénicas en este gen, se han asociado a pacientes con PEO dominante y deleciones múltiples (230).

El gen *RNASEH1* codifica una proteína involucrada en la eliminación del cebador de inicio de replicación del ADNmt. En este gen solo se han descrito 4 variantes patogénicas (231, 232). En el paciente 54 con PEO, debilidad y deleciones múltiples en el ADNmt, se encontraron dos variantes p.(Tyr163His) y p.(Gln86del) en homocigosis en el gen *RNASEH1*. La variante p.(Gln86del) se encontró en las bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0.01% y los predictores de patogenicidad la clasifican como polimorfismo; en cambio, la variante p.(Tyr163His) no está descrita en las bases de datos, pero los predictores la han clasificado como patogénica. Se planteó la caracterización de la patogenicidad “in vitro” de estas variantes.

El gen *OPA1* codifica una proteína de tipo GTPasa localizada en la membrana mitocondrial interna, involucrada en la fusión mitocondrial, la organización de las crestas mitocondriales y el control de la apoptosis. El paciente 36 con atrofia óptica, era portador de la variante no descrita p.(Trp89Cys) en el gen *OPA1*; los predictores de patogenicidad catalogaron la variante como patogénica. Mutaciones en este gen han sido asociadas a fenotipos de atrofia óptica dominante (233).

Aunque todas las variantes encontradas en los pacientes son potencialmente patogénicas y probablemente sean la causa de sus fenotipos clínicos, es conveniente estudiar su cosegregación en la familia y realizar estudios de patogenicidad de aquellas que no han sido descritas.

En el resto de pacientes estudiados, no se han encontrado variantes potencialmente patogénicas, por lo que se debe considerar como afrontar el diagnóstico de los pacientes, ya que en el panel a la carta no están incluidos todos los posibles genes implicados en estas alteraciones. Se aplicó el panel a pacientes que presentaban deleciones únicas del ADNmt, por si estas deleciones únicas eran causadas por variantes patogénicas de genes clásicamente asociados a deleciones múltiples del ADNmt. Las deleciones únicas del ADNmt, clásicamente se consideran que son esporádicas y que no se deben a variantes patogénicas en el genoma nuclear. Además, en un estudio previo se analizó el exoma de estos pacientes y tampoco se obtuvieron resultados. Los resultados obtenidos no apoyan la hipótesis que las deleciones únicas del ADNmt sean debidos a defectos en genes nucleares. El estudio de los pacientes con fenotipo similar a MNGIE tampoco ha dado resultados positivos ya que en estos pacientes tampoco se han encontrado variantes en los genes *RRM2B* (234) y *POLG* (235), que son los que se han asociado al fenotipo.

Utilizando el panel de genes a la carta, se han encontrado variantes potencialmente patogénicas en 14 pacientes (27%), de los cuales 13 pacientes presentaban deleciones múltiples en el ADNmt, lo que representa un 43% de estos pacientes.

La principal aplicación de este panel es en el diagnóstico de los pacientes con deleciones múltiples y depleción del ADNmt, pero recientemente se han descrito nuevos genes implicados en estos defectos que no están incluidos en el panel; por esta razón sería conveniente estudiarlos utilizando el exoma completo para poder analizar el resto de genes implicados o incluso nuevos genes que no se han asociado a las EM pero que están involucrados en la replicación y el mantenimiento del ADNmt.

Se han estudiado 8 pacientes con el exoma clínico, 6 con fenotipo de síndrome de Leigh y 2 con fenotipo clínico de EM con alteración en la actividad del sistema OXPHOS. Se aplicó esta técnica en estos pacientes, debido a que estos fenotipos se asocian a un gran número de genes, se han descrito variantes patogénicas en más de 60 genes nucleares en pacientes con síndrome de Leigh (236) y en más de 200 en pacientes con déficits en algún complejo OXPHOS (130). El exoma clínico, contiene aproximadamente 4.800 genes asociados a fenotipos clínicos, aunque no todos los genes asociados a fenotipos mitocondriales están incluidos.

En todos los pacientes con síndrome de Leigh se descartó previamente la presencia de variantes patogénicas en el ADNmt.

De los 8 pacientes estudiados con el exoma clínico, se encontraron en 2 de los 6 pacientes con fenotipo clínico de síndrome variantes potencialmente patogénicas.

El paciente 18 manifestaba un fenotipo de síndrome de Leigh desde su nacimiento con una marcada acidosis láctica intratable y afectación hepática que resultó fatal a los pocos meses de vida. Se encontraron dos variantes en heterocigosis en el gen *TRMU*, p.(Cys54\*) y p.(Arg227Thr); ninguna de las cuales está descrita en las bases de datos poblacionales, ni en las bases de datos asociadas a patogenicidad. Los predictores de patogenicidad las califican como patogénicas, ya que la variante



p.(Cys54\*) produce un codón de terminación prematuro que predice una proteína de 54 aminoácidos, a diferencia de los 421 aminoácidos de la proteína salvaje; variantes patogénicas en este gen, se han asociado a pacientes con hepatopatía infantil y Síndrome de Leigh (236, 237). Aunque las variantes encontradas podrían ser la causa de su fenotipo clínico, se deben realizar estudios de cosegregación familiar y de patogenicidad de las variantes para poder confirmarlo.

El paciente 80 presentaba fenotipo de síndrome de Leigh de aparición a los 7 meses de edad con un déficit de la actividad del CI. En este paciente se ha encontrado una variante patogénica en homocigosis en el gen *NDUFV1* (p.(Arg386His)); esta variante ha sido descrita previamente como patogénica asociada a niños con el mismo fenotipo que el paciente (198).

No se han encontrado variantes potencialmente patogénicas en el resto de pacientes; desde el diseño inicial del exoma clínico, un gran número de genes se han asociado a fenotipos clínicos de EM, por lo que muchos de los genes implicados en fenotipos mitocondriales no se estudian con esta aproximación. En el exoma clínico, tampoco se incluyen las regiones intrónicas de estos genes, por tanto, estos 6 pacientes serían candidatos para hacer un estudio de exoma o genoma completo, aunque sería conveniente revisar su fenotipo clínico, ya que cuanto mejor sea su caracterización clínica, más éxito hay en su diagnóstico genético (238).

Posteriormente, en otro laboratorio se realizó el análisis del exoma completo del paciente 1681, que reveló la presencia de la variante c.476A>G p.(Gln159Arg) en homocigosis en el gen *ECHS1*; esta variante y otras en el mismo gen, se han encontrado en pacientes con un fenotipo similar al del Síndrome de Leigh o encefalopatía (239). Este hecho, refuerza la indicación del estudio del exoma completo en este grupo de pacientes.

Para realizar el diagnóstico genético de pacientes previamente estudiados, sin resultados utilizando las técnicas arriba mencionadas, se aplicó la secuenciación del exoma completo con objeto de analizar el mayor número de posible de genes implicados en funciones mitocondriales. Se estudió el exoma completo de 9 pacientes, de los cuales 8 tenían alteraciones en el ADNmt (deleciones múltiples o depleción) y 1 paciente con fenotipo clínico de EM con déficit multienzimático de la CTE. De los 9 pacientes estudiados, se encontraron variantes potencialmente patogénicas en 2 pacientes. Todas las variantes se catalogaron como posiblemente patogénicas por los predictores de patogenicidad utilizados.

En el paciente 49 con anemia, miopatía, hepatopatía, deleciones múltiples y déficit de varios complejos de la CTE, se detectaron dos variantes (p.(Gly105Alafs\*4) y p.(Ile464Thr)) potencialmente patogénicas en heterocigosis en el gen *YARS2*; solo la primera variante se ha encontrado en la bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0.0008% (gnomAD), pero no en las bases de datos de patología (OMIM y HGMD). El aminoácido 105 de la proteína *YARS2* está completamente conservado desde mamíferos hasta insectos, la deleción del nucleótido guanina en posición 314 del gen, provoca una alteración de la pauta de lectura, que predice la generación de un codón de parada prematuro, con lo que la proteína generada es más corta, ya que estará formado por 107 aminoácidos en lugar de por 477 aminoácidos. La segunda variante no está descrita en las bases de datos, el aminoácido 464 de la proteína solo está conservado en mamíferos y aves. El gen *YARS2* codifica una enzima encargada de unir el aminoácido tirosina a su correspondiente ARNt mitocondrial. Otras variantes patogénicas

descritas en este gen, se han asociado a pacientes con el síndrome de MLASA (240), además también provocan déficits multienzimáticos de la CTE (130).

En el paciente 43 con epilepsia, fatiga, debilidad y déficit multienzimático OXPHOS, se encontró una variante en homocigosis en el gen *COQ10A*; la variante se ha descrito en las bases de datos poblacionales con una frecuencia del 0.002% (gnomAD), pero no en las bases de datos asociadas a patología (OMIM y HGMD). El aminoácido 187 de la proteína *COQ10A*, está completamente conservado desde mamíferos hasta insectos. Hasta la fecha, no se han publicado variantes patogénicas asociadas a fenotipos clínicos en este gen. La proteína *COQ10A* está implicada en la movilización de la  $\text{CoQ}_{10}$  hacia la membrana mitocondrial interna durante su síntesis (143), la  $\text{CoQ}_{10}$  transfiere los electrones de los CI y CII hasta el CIII; el paciente presenta un déficit multienzimático de los CI, CII, CI+III, CII+CIII y CIV, hecho en el que podría estar implicada la disfunción de la  $\text{CoQ}_{10}$ , ya que se han descrito defectos en la actividad de múltiples complejos provocados por alteraciones en otras subunidades de la  $\text{CoQ}_{10}$  (130).

Probablemente, se puede asociar el fenotipo de estos 2 pacientes a las variantes encontradas, pero es conveniente realizar estudios en familiares para ver su cosegregación y realizar estudios funcionales para determinar su patogenicidad.

En el análisis del exoma del resto de pacientes no se han encontrado variantes patogénicas; en su análisis, se han priorizado aquellas variantes presentes en los genes implicados en la mitocondria y su función así como un patrón de herencia recesivo, excluyendo del análisis aquellas variantes presentes con una frecuencia poblacional superior al 1% y las que producen un cambio sinónimo en la proteína. La inclusión de familiares en el estudio (tríos), podría mejorar el análisis permitiendo realizar un filtrado de variantes según el patrón de herencia dominante o recesiva; otra posible aproximación sería el estudio del genoma completo, ya que en el estudio del exoma, solo están cubiertos los exones y su zona intrónica flanqueante.

En un paciente con fenotipo clínico característico del síndrome de LHON (pérdida de visión lateral subaguda), se encontró una variante potencialmente patogénica en el gen *MTND1* (m.3634A>G; p.(Ser110Gly)) en homoplasmia, La variante afecta al aminoácido 110 de la proteína *ND1*, prediciendo un cambio del aminoácido serina (aminoácido polar e hidrofílico) altamente conservado, por una glicina (no polar). Esta variante no se ha encontrado en las 37.545 secuencias de ADNmt humano que se han publicado en las bases de datos (241, 242); además el cambio afecta a un aminoácido altamente conservado en la proteína *ND1* (desde mamíferos, anfibios, aves, peces e invertebrados), lo que sugiere que el cambio puede comprometer la función de la proteína; los estudios *in silico*, clasifican la variante como probablemente patogénica; y por último, se ha descrito otra variante (m.3635G>A) en el mismo codón como patogénica en pacientes con síndrome de LHON (243, 244).

Los estudios en cíbridos portadores de la variante m.3634A>G, han mostrado que no son capaces de crecer en medio con galactosa como fuente de energía, en cambio crecen como los cíbridos controles en medio con glucosa, esto indica un efecto deletéreo de la mutación en la viabilidad celular cuando las células son forzadas a obtener ATP a partir del sistema OXPHOS. Además, se ha observado una

disminución de la actividad del complejo I y I+III (~60%); esto concuerda con el hecho de que la variante afecte a una subunidad de complejo I, y con los resultados de otros autores en variantes que afectan al mismo aminoácido; se ha descrito en un paciente con síndrome de LHON la variante patogénica m.3635A>G (p.(Ser110Asp) (245); esta variante afecta al aminoácido 110 de la proteína ND1, pero en este caso el cambio de aminoácido es de serina (polar e hidrofílica) por asparagina (polar y neutral)(245), además esta variante también provoca una disminución de la actividad del CI (~ 27%). El aminoácido 110 está en una región muy conservada de la proteína ND1, concretamente en el tercer dominio transmembrana del polipéptido, pudiendo afectar a su estructura terciaria comprometiendo su función (246). La proteína ND1 es una de las 44 subunidades que forman el CI, por tanto, variantes patogénicas que afecten a estas subunidades pueden afectar a la transferencia de electrones a través de los complejos y al gradiente electroquímico mitocondrial; esto se ha observado en los cíbridos con la variante m.3634A>G, que presentan una reducción del 70% del potencial de membrana. Por último, los cíbridos mutados, presentaron un incremento en el número de copias de ADNmt. Este hecho sugiere que las células intentan compensar el defecto en el sistema OXPHOS, produciendo más moléculas de ADNmt como mecanismo de respuesta a la variante; esta compensación ya se ha descrito anteriormente en pacientes con LHON portadores de la variante patogénica m.11778G>A, en que existe un incremento del número de copias de ADNmt en sangre periférica (247). Los resultados obtenidos aportan evidencias de la patogenicidad de la variante y su relación con el fenotipo del paciente con síndrome de LHON.

En un paciente adulto con mialgia, debilidad muscular distal, características de miopatía mitocondrial en la biopsia muscular con numerosas FRR y COX-, y disminución de la actividad de los CI, CIII y CIV de la CTE, se ha encontrado la variante potencialmente patogénica m.4440G>A en heteroplasmia en el gen *MTTM*. La variante m.4440G>A en el gen *MTTM*, no ha sido previamente descrita en las bases de datos de enfermedades mitocondriales (Mitomap); sin embargo, otras variantes en el mismo gen, como m.4409T>C (248) o m.4450G>A (249, 250), se han descrito en pacientes adultos con debilidad muscular, intolerancia al ejercicio, acidosis láctica y signos de miopáticos en la biopsia muscular (FRR y COX-). Se han descrito variantes patogénicas en los ARNt mitocondriales, como causantes de alteraciones en el sistema OXPHOS (130), que sobretodo se manifiestan en tejidos altamente dependientes de la energía producida vía fosforilación oxidativa, como es el caso del músculo esquelético, dando lugar a manifestaciones clínicas entre las cuales está la miopatía. La presentación aislada de miopatía es inusual, aunque se han descrito pacientes adultos con debilidad muscular en las extremidades, ptosis y PEO, con variantes patogénicas en genes que codifican subunidades del citocromo b (251) o algunos ARNt (252). Utilizando el sistema de evaluación de patogenicidad de las mutaciones en los ARNt, inicialmente propuesto por DiMauro (161), y reevaluado posteriormente por Yarham (253), varias observaciones respaldan la implicación de la variante m.4440G>A en el fenotipo puramente miopático del paciente, ya que el análisis histoquímico de la biopsia muscular manifiesta una disfunción mitocondrial, con la presencia de FRR y fibras COX-; la variante está en un alto porcentaje en músculo (78%) pero no en orina ni en sangre, y además, se correlaciona el porcentaje de heteroplasmia de la variante con la deficiencia en la enzima citocromo c oxidasa (COX) en las fibras musculares, 59% en fibras COX+ y 71% en COX-; hay un defecto en la actividad de los complejos I, III y IV de la CTE; el cambio no se ha observado entre las 37.545 secuencias de ADNmt humano que se han

publicado en las bases de datos (241, 242); y por último, el cambio afecta a un nucleótido en el ARNt metionina conservado en mamíferos, aves y peces, pero no en anfibios ni insectos. Los resultados obtenidos refuerzan la patogenicidad de la variante causante de miopatía mitocondrial.

En un paciente con ptosis, PEO, disfagia, debilidad muscular distal y deleciones múltiples del ADNmt, se encontraron dos variantes potencialmente patogénicas (c.487T>C y c.258\_260del) en el gen *RNASEH1*. Hasta el momento, solo se han descrito 6 pacientes con variantes patogénicas en este gen (231, 232), con fenotipos relativamente homogéneos sobretodo de aparición adulta, caracterizados por PEO, ataxia cerebelar y debilidad muscular proximal con alteraciones secundarias del ADNmt (231). El gen *RNASEH1* está implicado en la eliminación del cebador de ARN, utilizado para iniciar la replicación del ADNmt; se han descrito variantes patogénicas en otros genes implicados en la misma función, *DNA2* (254) o *MGME1* (255), que dan lugar a fenotipos clínicos similares a los descritos en los pacientes con variantes en *RNASEH1*.

La variante (c.487T>C, p.(Tyr163His)), predice un cambio de la tirosina (polar y neutro) 163 por una histidina (polar y básico) en la enzima *RNASEH1*; este aminoácido esta conservado en mamíferos, aves, peces y anfibios; además la variante no está descrita en las bases de datos poblacionales (gnomAD/1000g), ni en las bases de datos de variantes asociadas a enfermedades (OMIM/HGMD), los programas de patogenicidad *in silico* la clasifican como patogénica. La variante (c.258\_260del (p.Gln86del)), predice la deleción del aminoácido 86; este aminoácido solo esta conservado en mamíferos y aves; además, la variante esta descrita en las bases de datos poblacionales (gnomAD/1000g) con una frecuencia poblacional de 0.01%, pero no en las bases de datos asociadas a enfermedades, y los predictores *in silico* de patogenicidad la catalogan como polimorfismo.

Debido a la similitud del fenotipo clínico entre el paciente y los pacientes descritos con variantes patogénicas en el mismo gen, y la potencial patogenicidad de la variante c.487T>C, p.(Tyr163His), se realizó un ensayo de la actividad enzimática de la proteína *in vitro*. Para ello, se sintetizaron diferentes proteínas *RNASEH1* recombinantes en *E.Coli*, una salvaje derivada de fibroblastos control, una con las dos variantes derivadas de fibroblastos del paciente, una solo con la variante c.487T>C y otra solo con la variante c.258\_260del.

Al realizar el ensayo de actividad, se comprobó que las tres proteínas recombinantes alteradas, no eran capaces de degradar la cadena de ARN del híbrido ARN:ADN que la enzima utiliza como sustrato, indicando que la proteína no es funcional *in vitro*. Este resultado es similar al obtenido por otros autores que han comprobado la patogenicidad de otras variantes en el gen *RNASEH1* (231). La falta de actividad de enzima *in vitro*, afecta al proceso de replicación del ADNmt (18). Esto se observó en los fibroblastos del paciente cuando se deplecionó el ADNmt, ya que no fueron capaces de recuperar el número de moléculas de ADNmt inicial, que si recuperaron los fibroblastos controles. Los defectos en la replicación de ADNmt, afectan a la funcionalidad del sistema OXPHOS y normalmente producen alteraciones secundarias en el ADNmt, como las deleciones múltiples que se han observado en músculo del paciente. Se estudió el crecimiento de los fibloblastos en un medio de cultivo oxidativo, que refleja la capacidad de las células para obtener energía mediante la fosforilación oxidativa, pero no se observó ningún defecto, ya que crecieron en este medio a la misma velocidad que los fibroblastos controles. En los fibroblastos del paciente, no se observaron deleciones múltiples en el ADNmt, este

hecho ya se ha descrito en fibroblastos de pacientes con defectos secundarios en el ADNmt (256), esto se debe a que los fibroblastos no son el tejido diana. Los resultados obtenidos de estos estudios aportan evidencias sobre la patogenicidad de las variantes encontradas en el gen *RNASEH1*.

En pacientes con sordera materna neurosensorial no sindrómica (MNSSN), se ha descrito que la presencia de la variante m.1555A>G en homoplasmia, en gen *MTRNR1* que codifica la subunidad 12S del ARNr mitocondrial, no es suficiente para producir el fenotipo, ya que hay sujetos portadores de la variante en homoplasmia en los que no se llega a desarrollar MNSSN. Se han descrito diferentes factores que desencadenan la aparición de la sordera y modulan su severidad, como la administración de antibióticos aminoglicósidos (257), variantes en el genoma mitocondrial, el haplogrupo mitocondrial (123, 258) y variantes en genes nucleares como *MTO1* (259), *GTPBP3* (260) o *TRMU* (261, 262).

En este trabajo, se han realizaron diferentes estudios en 23 pacientes portadores de la variante m.1555A>G en homoplasmia, para encontrar variables modificadoras del fenotipo de sordera.

Primero, se estudió en genoma mitocondrial en busca de otras variantes potencialmente patogénicas que pudieran explicar la variabilidad fenotípica y para establecer el haplogrupo mitocondrial. Solo se encontraron variantes descritas como polimorfismos a excepción dos variantes no descritas en bajo porcentaje de heteroplasmia en todos los miembros de la familia 2, sin que se observan diferencias en el fenotipo en comparación con los demás sujetos estudiados. La distribución de los haplogrupos de los pacientes, sigue la distribución establecida en la población europea H (40%), J (9%) y L (1%), sugiriendo que en este grupo de pacientes el haplogrupo no juega un papel modificador del fenotipo; en cambio hay trabajos en los que se ha visto una sobrerrepresentación del haplogrupo D en familias españolas portadoras de la mutación m.1555A>G en homoplasmia y MNSSN (263).

Además, se estudió la variante c.28G>T (p.Ala10Ser) en el gen *TRMU* en los pacientes portadores de la mutación m.1555A>G, ya que se ha descrito como modificadora del fenotipo en familias con MNSSN. En nuestro grupo de sujetos portadores de la mutación m.1555A>G en homoplasmia, solo se han encontrado sujetos portadores de la variante c.28G>T en la familia 1 y 2. En la familia 1 se ha encontrado la variante en 3 miembros, dos de ellos presentaban la misma severidad de MNSSN y uno era portador de la variante en homocigosis y otro en heterocigosis, además el tercer miembro en el que se encontró la variante en heterocigosis no presentaba fenotipo de MNSSN. Por otro lado, el miembro de la familia 2 con el fenotipo más severo de MNSSN (pérdida de audición de más del 90%), era portador en heterocigosis de la variante y fue el único miembro de esta familia en el que se encontró la variante. Los resultados obtenidos solo aportan relación entre la presencia del polimorfismo y la severidad fenotípica de MNSSN en la familia 2. Sin embargo, ha sido descrita la relación de la presencia de la variante con la pérdida profunda de audición en miembros de familias con la mutación m.1555A>G y MNSSN (262).

Por último, se ha estudiado el papel del número de copias de ADNmt en la modulación de la severidad de MNSSN y no se han encontrado diferencias significativas respecto al grupo control.

Por tanto, en nuestro grupo de pacientes no se han encontrado evidencias de que las variantes descritas como modificadoras del fenotipo, modulen la severidad de la MNSSN. Sería conveniente estudiar otras variantes descritas en los genes *MTO1* (259), *GTPBP3* (260), así como ampliar los

estudios en familias con más variabilidad fenotípica para encontrar otros factores que pudieran interferir en la modulación fenotípica en los pacientes portadores de la variante m.1555A>G.

La aparición de las técnicas de secuenciación masiva ha cambiado el abordaje del diagnóstico genético en los pacientes con sospecha de EM. Estas técnicas se están integrando en diagnóstico genético llegando a reemplazar en determinados casos a las técnicas tradicionales.

La técnica tradicional por excelencia utilizada en el diagnóstico genético de la EM, es la secuenciación Sanger; esta aproximación sigue siendo muy útil y se utiliza en el diagnóstico de pacientes con fenotipos clínicos de síndrome de LHON o MNSSN ya que las mutaciones causantes se encuentran en homoplasma, o en pacientes con sospecha diagnóstica de otros síndromes mitocondriales como MELAS, MERRF o Leigh/NARP, ya que la gran mayoría de los casos están causados por las mutaciones descritas más comunes en porcentajes de heteroplasma altos en el tejido diana. Sin embargo, cuando las variantes patogénicas descritas asociadas a la patología concreta no son la causa de fenotipo de los pacientes, es conveniente aplicar la secuenciación masiva para ampliar la búsqueda a todo el genoma mitocondrial y realizar un diagnóstico rápido de estos pacientes, como se ha podido comprobar en el diagnóstico de los pacientes 8 y 16. Debido a la limitación que tiene la secuenciación Sanger en la detección de variantes en bajos niveles de heteroplasma, es aconsejable la utilización de la secuenciación masiva en el diagnóstico de aquellos pacientes con fenotipos claramente mitocondriales en los que no se han encontrado mutaciones patogénicas por Sanger y de los que no se dispone del tejido diana. Estas técnicas presentan la ventaja que son capaces de detectar bajos porcentajes de heteroplasma, permitiendo que el diagnóstico de estos pacientes sea menos invasivo. Los pacientes 6 y 9 no habrían sido diagnosticados si no se hubiera estudiado el ADNmt por secuenciación masiva. Además, estas técnicas permiten agilizar el diagnóstico en pacientes con un fenotipo mitocondrial que no encaja en ninguno de los síndromes clásicos, en comparación a la secuenciación Sanger utilizando decenas de secuencias.

Sin duda, la aplicación de la secuenciación masiva es clave en el diagnóstico de pacientes con sospecha EM de origen en genes nucleares porque, aunque se aplique la secuenciación Sanger en aquellos pacientes con síndromes mitocondriales clásicos, en los que la causa genética de la enfermedad se reduce a mutaciones en un gen, como el síndrome de MNGIE con un fenotipo muy característico y asociado solo a mutaciones en el gen *TYMP*, la mayoría de fenotipos clínicos se han asociado a mutaciones en un número elevado de genes. Una de las aplicaciones de la secuenciación masiva en el diagnóstico de estos pacientes, es la secuenciación utilizando paneles de genes a la carta, útiles para el diagnóstico de pacientes con fenotipos clínicos concretos a los que se han asociado un número relativamente pequeño de genes. Este es el caso del panel diseñado, en el que se incluyen genes implicados en el mantenimiento del ADNmt asociados previamente a fenotipos clínicos. Los paneles de genes permiten estudiar varios genes a la vez reduciendo el tiempo de análisis. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas hace que se vayan describiendo nuevos genes asociados a esos fenotipos clínicos que no están incluidos en el diseño inicial del panel, aunque en la mayoría de los paneles a la carta se pueden añadir nuevos genes.

Muchas veces el fenotipo del paciente es inespecífico, y centrar la búsqueda del origen de la enfermedad a un grupo reducido de genes, es prácticamente imposible. Un posible abordaje es el estudio del exoma clínico. Este panel de genes es útil en aquellos pacientes con fenotipos clínicos en los que se han asociado un número elevado de genes, como los pacientes con sospecha clínica de síndrome de Leigh 18 o 80. Sin embargo, el panel utilizado para el estudio del exoma clínico no incluye todos los genes descritos en la actualidad asociados a fenotipos clínicos mitocondriales.

Recientemente se está extendiendo la utilización del exoma completo en el diagnóstico de pacientes con EM; la aplicación del exoma es útil en pacientes en los que se pueden asociar una gran cantidad de genes al fenotipo clínico o en aquellos en los que el fenotipo es inespecífico. Presenta la ventaja adicional que se pueden reanalizar los datos del exoma en un paciente en que inicialmente no se encontró la causa genética, incorporando en el análisis los genes que se han descrito con posterioridad a su análisis inicial. En el análisis del exoma aplicado al diagnóstico, se suelen crear paneles de genes candidatos virtuales. El análisis inicial de las variantes se centra en esos genes y el panel se puede ir ampliando a un panel mayor con genes relacionados. Uno de los principales inconvenientes del estudio de paneles de muchos genes (de centenas de genes) o del exoma, es la interpretación del gran número de variantes de significado incierto que se obtienen, haciendo que el análisis de cosegregación en familiares sea prácticamente indispensable para poder llegar a obtener resultados. Su aplicación ha permitido asociar nuevos genes a fenotipos mitocondriales, por eso se está extendiendo su uso en el diagnóstico (201, 264). Se ha de tener presente que no se secuencian zonas intrónicas, ni zonas reguladoras y que hay regiones que no se pueden secuenciar porque son de difícil captura, estos inconvenientes se solventan cuando se realiza la secuenciación del genoma completo. Además, siempre se ha de tener presente que para obtener éxito en el diagnóstico de estas enfermedades es fundamental una buena caracterización clínica de los pacientes (238, 265).

## **8 CONCLUSIONES**





1- Se ha validado la secuenciación completa del ADNmt por NGS. La utilización de la enzima ADN dsfragmentasa ha conseguido mejorar de la homogeneidad de la cobertura a lo largo de la secuencia del ADNmt.

2- La secuenciación completa del ADNmt por NGS ha detectado variantes patogénicas en bajos porcentajes de heteroplasmia, no detectadas previamente por secuenciación Sanger, en ADN procedente de sangre periférica, diagnosticándose pacientes sin necesidad de realizar biopsia muscular. La aplicación de esta metodología ha permitido diagnosticar pacientes con variantes patogénicas en el ADNmt que no estaban previamente descritas asociadas a ese fenotipo.

3- La secuenciación completa del ADNmt por NGS en muestras con deleciones únicas en el ADNmt, consigue la detección de la zona de la deleción, aunque no permite su cuantificación.

4- Se ha diseñado y validado un panel de genes a la carta en el que se incluyen genes involucrados en el mantenimiento del ADNmt. La aplicación de este panel ha tenido un buen rendimiento sobre todo en los pacientes que presentan deleciones múltiples del ADN mitocondrial, siendo el gen POLG el gen que se han encontrado en mayor proporción en estos pacientes.

5- No se han encontrado variantes patogénicas en los genes relacionados con el mantenimiento del ADNmt en las muestras que presentaban deleciones únicas del ADNmt.

6- El estudio del exoma clínico es útil para diagnosticar pacientes con síndromes mitocondriales definidos, ha permitido diagnosticar 2 de los 6 pacientes diagnosticados de síndrome de Leigh.

7- El estudio del exoma completo en pacientes con enfermedad mitocondrial ha detectado un posible nuevo gen candidato causante de enfermedad mitocondrial, aunque son necesarios posteriores estudios para determinar la implicación de este gen.

8- En un modelo celular de híbridos transmitocondriales se ha confirmado la patogenicidad de la variante m.3634A>G en el gen MTND1 encontrada en un paciente con neuropatía óptica de Leber.

9- Se ha estudiado la implicación de la variante m.4440G>A en el gen MTTM presente en un paciente con fenotipo puramente miopático. Los estudios realizados han permitido clasificarla como patogénica según el sistema de evaluación de patogenicidad de las mutaciones en los ARNt, inicialmente propuesto por DiMauro y revisado por Yarham.

10- En un paciente con PEO y debilidad muscular distal se han detectado las variantes c.487T>C i c.258\_260del en homocigosis en el gen RNASEH1. Estudios funcionales in vitro han confirmado la patogenicidad de estas dos variantes

11- En las variantes encontradas no descritas previamente sería conveniente hacer estudios de cosegregación y en el caso que sea posible, estudios funcionales para estudiar la patogenicidad de estas variantes.

12- Se han estudiado posibles factores modificadores del fenotipo en pacientes con sordera neurosensorial no sindrómica mitocondrial, portadores de la variante m.1555A>G en MTRNR1 en homoplasmia. No se ha encontrado ninguna diferencia significativa en el haplogrupo mitocondrial ni en el número de copias del ADNmt respecto a los controles. En nuestra serie tampoco parece que el polimorfismo en el gen TRMU juegue un papel relevante en la presentación fenotípica.

## **9 BIBLIOGRAFIA**



1. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010; 11: 655-667.
2. Rhee HW, Zou P, Udeshi ND et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 2013; 339: 1328-1331.
3. Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D et al. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular signalling* 2011; 23: 1534-1545.
4. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* 1967; 14: 255-274.
5. Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 1998; 396: 133-140.
6. Kurland CG, Andersson SG. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 2000; 64: 786-820.
7. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* 2000; 25: 319-324.
8. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* 1981; 91: 227s-255s.
9. Jafri MS, Kumar R. Modeling mitochondrial function and its role in disease. *Progress in molecular biology and translational science* 2014; 123: 103-125.
10. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
11. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 2174-2176.
12. Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental gerontology* 2014; 56: 175-181.
13. Uhler JP, Falkenberg M. Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. *DNA Repair (Amst)* 2015; 34: 28-38.
14. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1188-1199.
15. Holt IJ, He J, Mao CC et al. Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 2007; 7: 311-321.
16. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature reviews Genetics* 2005; 6: 815-825.
17. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Molecular biology of the cell* 2007; 18: 3225-3236.
18. El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1863: 1539-1555.
19. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in neurobiology* 2011; 94: 166-200.
20. Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012; 13: 659-671.
21. Boesch P, Weber-Lotfi F, Ibrahim N et al. DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1813: 186-200.

22. Giles RE, Blanc H, Cann HM et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980; 77: 6715-6719.
23. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999; 402: 371-372.
24. Vu TH, Hirano M, DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Neurologic clinics* 2002; 20: 809-839, vii-viii.
25. Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature genetics* 2008; 40: 249-254.
26. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature genetics* 2008; 40: 1484-1488.
27. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* 2007; 76: 679-699.
28. Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA et al. The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 38555-38562.
29. Kaguni LS. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual review of biochemistry* 2004; 73: 293-320.
30. Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical reviews* 2006; 106: 383-405.
31. Young MJ, Longley MJ, Li FY et al. Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Human molecular genetics* 2011; 20: 3052-3066.
32. Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M et al. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal* 2004; 23: 2423-2429.
33. Zhang H, Pommier Y. Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop region of mitochondrial DNA. *Biochemistry* 2008; 47: 11196-11203.
34. Fuste JM, Wanrooij S, Jemt E et al. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell* 2010; 37: 67-78.
35. Miralles Fuste J, Shi Y, Wanrooij S et al. In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication. *PLoS genetics* 2014; 10: e1004832.
36. Macao B, Uhler JP, Siibak T et al. The exonuclease activity of DNA polymerase gamma is required for ligation during mitochondrial DNA replication. *Nature communications* 2015; 6: 7303.
37. Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 2000; 100: 515-524.
38. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscular disorders : NMD* 2010; 20: 429-437.
39. Johansson M, Brismar S, Karlsson A. Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 11941-11945.
40. 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* 1996; 93: 7258-7262.
41. Besse A, Wu P, Bruni F et al. The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell metabolism* 2015; 21: 417-427.

42. Kowluru A, Tannous M, Chen HQ. Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic beta cell: evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. *Archives of biochemistry and biophysics* 2002; 398: 160-169.
43. Lopez LC, Akman HO, Garcia-Cazorla A et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Human molecular genetics* 2009; 18: 714-722.
44. Hakansson P, Hofer A, Thelander L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 7834-7841.
45. Pontarin G, Fijolek A, Pizzo P et al. Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 17801-17806.
46. Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V et al. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000; 289: 782-785.
47. Epand RM, Epand RF, Berno B et al. Association of phosphatidic acid with the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochemistry* 2009; 48: 12358-12364.
48. Dalla Rosa I, Camara Y, Durigon R et al. MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA Replication in Mitochondria. *PLoS genetics* 2016; 12: e1005779.
49. Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual review of biochemistry* 2016; 85: 133-160.
50. Terzioglu M, Ruzzenente B, Harmel J et al. MTERF1 binds mtDNA to prevent transcriptional interference at the light-strand promoter but is dispensable for rRNA gene transcription regulation. *Cell metabolism* 2013; 17: 618-626.
51. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A et al. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature genetics* 2002; 31: 289-294.
52. Yakubovskaya E, Guja KE, Eng ET et al. Organization of the human mitochondrial transcription initiation complex. *Nucleic acids research* 2014; 42: 4100-4112.
53. Minczuk M HJ, Duch AM, Ettema TJ, Chlebowski A, Dzionek K, Nijtmans LG, Huynen MA, Holt IJ. TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic acids research* 2011.
54. Agaronyan K, Morozov YI, Anikin M et al. Mitochondrial biology. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science* 2015; 347: 548-551.
55. Ojala D, Crews S, Montoya J et al. A small polyadenylated RNA (7 S RNA), containing a putative ribosome attachment site, maps near the origin of human mitochondrial DNA replication. *Journal of molecular biology* 1981; 150: 303-314.
56. Nagaike T, Suzuki T, Katoh T et al. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280: 19721-19727.
57. Hallberg BM, Larsson NG. Making proteins in the powerhouse. *Cell metabolism* 2014; 20: 226-240.
58. Lightowlers RN, Rozanska A, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Mitochondrial protein synthesis: figuring the fundamentals, complexities and complications, of mammalian mitochondrial translation. *FEBS letters* 2014; 588: 2496-2503.



59. Akabane S, Ueda T, Nierhaus KH et al. Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria. *PLoS genetics* 2014; 10: e1004616.
60. Temperley RJ, Wydro M, Lightowers RN et al. Human mitochondrial mRNAs--like members of all families, similar but different. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1797: 1081-1085.
61. Christian BE, Spremulli LL. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 2012; 1819: 1035-1054.
62. Tucker EJ, Hershman SG, Kohrer C et al. Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell metabolism* 2011; 14: 428-434.
63. Greber BJ, Ban N. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual review of biochemistry* 2016; 85: 103-132.
64. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C et al. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome research* 2011; 21: 12-20.
65. Bonnen PE, Yarham JW, Besse A et al. Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. *American journal of human genetics* 2013; 93: 471-481.
66. Papa S, Martino PL, Capitanio G et al. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology* 2012; 942: 3-37.
67. Kroger A, Klingenberg M. The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *European journal of biochemistry* 1973; 34: 358-368.
68. Margoliash E, Ferguson-Miller S, Tulloss J et al. Separate intramolecular pathways for reduction and oxidation of cytochrome c in electron transport chain reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973; 70: 3245-3249.
69. Guenebaut V, Schlitt A, Weiss H et al. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of molecular biology* 1998; 276: 105-112.
70. Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 2014; 515: 80-84.
71. Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry* 2013; 82: 551-575.
72. Friedrich MG, Giebeta F, Naumann R et al. Active site structure and redox processes of cytochrome c oxidase immobilised in a novel biomimetic lipid membrane on an electrode. *Chemical communications* 2004: 2376-2377.
73. Yagi T, Matsuno-Yagi A. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* 2003; 42: 2266-2274.
74. Murphy AN, Allison WS. Mitochondrial function, part B: mitochondrial protein kinases, protein phosphatases and mitochondrial diseases. Preface. *Methods in enzymology* 2009; 457: xxv-xxvi.
75. Schagger H, Brandt U, Gencic S et al. Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods in enzymology* 1995; 260: 82-96.
76. Yu CA, Xia D, Kim H et al. Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Biochimica et biophysica acta* 1998; 1365: 151-158.
77. Lobo-Jarne T, Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 2017.

78. Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal* 2000; 19: 1777-1783.
79. Lenaz G, Genova ML. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *American journal of physiology Cell physiology* 2007; 292: C1221-1239.
80. Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 2001; 30: 23-65.
81. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2004; 447: 689-709.
82. Parikh S, Goldstein A, Karaa A et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2017.
83. Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA), 1993.
84. Farrar GJ, Chadderton N, Kenna PF et al. Mitochondrial disorders: aetiologies, models systems, and candidate therapies. *Trends Genet* 2013; 29: 488-497.
85. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology* 2015; 77: 753-759.
86. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of pathology* 2017; 241: 236-250.
87. Bianco B, Montagna E. The advances and new technologies for the study of mitochondrial diseases. *Einstein (Sao Paulo)* 2016; 14: 291-293.
88. Milone M, Brunetti-Pierri N, Tang LY et al. Sensory ataxic neuropathy with ophthalmoparesis caused by POLG mutations. *Neuromuscular disorders : NMD* 2008; 18: 626-632.
89. Van Hove JL, Cunningham V, Rice C et al. Finding twinkle in the eyes of a 71-year-old lady: a case report and review of the genotypic and phenotypic spectrum of TWINKLE-related dominant disease. *American journal of medical genetics Part A* 2009; 149A: 861-867.
90. Chinnery PF. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO molecular medicine* 2015; 7: 1503-1512.
91. Dimmock DP, Lawlor MW. Presentation and Diagnostic Evaluation of Mitochondrial Disease. *Pediatr Clin North Am* 2017; 64: 161-171.
92. Vafai SB, Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 2012; 491: 374-383.
93. Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: shifts in the diagnostic paradigm. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1840: 1360-1367.
94. Rahman S, Clarke CF, Hirano M. 176th ENMC International Workshop: diagnosis and treatment of coenzyme Q(1)(0) deficiency. *Neuromuscular disorders : NMD* 2012; 22: 76-86.
95. Camara Y, Gonzalez-Vioque E, Scarpelli M et al. Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug Discov Today* 2013; 18: 950-957.
96. Hirano M, Marti R, Casali C et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006; 67: 1458-1460.
97. Rahman S. Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders. *Journal of inherited metabolic disease* 2015; 38: 641-653.

98. Amato P, Tachibana M, Sparman M et al. Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases. *Fertility and sterility* 2014; 101: 31-35.
99. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-1488.
100. Smeets HJ, Sallevelt SC, Dreesen JC et al. Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders using prenatal or preimplantation genetic diagnosis. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1350: 29-36.
101. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM et al. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in genetics : TIG* 1997; 13: 450-455.
102. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Molecular syndromology* 2016; 7: 122-137.
103. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA et al. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *American journal of human genetics* 2008; 83: 254-260.
104. Poulton J, Chiaratti MR, Meirelles FV et al. Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them. *PLoS genetics* 2010; 6.
105. Greaves LC, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations and ageing. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1790: 1015-1020.
106. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1797: 113-128.
107. Yu-Wai-Man P, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *Journal of medical genetics* 2002; 39: 162-169.
108. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *Journal of medical genetics* 1995; 32: 81-87.
109. Rahman S, Blok RB, Dahl HH et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of neurology* 1996; 39: 343-351.
110. Santorelli FM, Shanske S, Macaya A et al. The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Annals of neurology* 1993; 34: 827-834.
111. Rojo A, Campos Y, Sanchez JM et al. NARP-MILS syndrome caused by 8993 T>G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study. *Acta neuropathologica* 2006; 111: 610-616.
112. Holt IJ, Harding AE, Petty RK et al. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American journal of human genetics* 1990; 46: 428-433.
113. DiMauro S, Tanji K. Mitochondrial disorders. *The Japanese journal of human genetics* 1997; 42: 473-487.
114. Schon EA, Santra S, Pallotti F et al. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Seminars in cell & developmental biology* 2001; 12: 441-448.
115. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348: 651-653.
116. Arai M, Ohshima S. Maternally inherited diabetes and deafness with cerebellar ataxia: a new clinical phenotype associated with the mitochondrial DNA 3243 mutation. *Journal of neurology* 1997; 244: 468-469.
117. Shoffner JMt, Wallace DC. Oxidative phosphorylation diseases. Disorders of two genomes. *Advances in human genetics* 1990; 19: 267-330.

118. Spagnolo M, Tomelleri G, Vattei G et al. A new mutation in the mitochondrial tRNA(Ala) gene in a patient with ophthalmoplegia and dysphagia. *Neuromuscular disorders* : NMD 2001; 11: 481-484.
119. Yelverton JC, Arnos K, Xia XJ et al. The clinical and audiologic features of hearing loss due to mitochondrial mutations. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2013; 148: 1017-1022.
120. Usami S, Abe S, Kasai M et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *The Laryngoscope* 1997; 107: 483-490.
121. Bates DE. Aminoglycoside ototoxicity. *Drugs of today* 2003; 39: 277-285.
122. Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M et al. Deafness due to A1555G mitochondrial mutation without use of aminoglycoside. *The Laryngoscope* 2004; 114: 1085-1091.
123. Lu J, Qian Y, Li Z et al. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion* 2010; 10: 69-81.
124. Bykhovskaya Y, Yang H, Taylor K et al. Modifier locus for mitochondrial DNA disease: linkage and linkage disequilibrium mapping of a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2001; 3: 177-180.
125. Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT et al. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 1989; 244: 346-349.
126. Chen X, Prosser R, Simonetti S et al. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *American journal of human genetics* 1995; 57: 239-247.
127. Mancuso M, Filosto M, Choub A et al. Mitochondrial DNA-related disorders. *Bioscience reports* 2007; 27: 31-37.
128. Maceluch JA, Niedziela M. The clinical diagnosis and molecular genetics of kearns-sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 2006; 4: 117-137.
129. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic acids research* 2016; 44: D1251-1257.
130. Mayr JA, Haack TB, Freisinger P et al. Spectrum of combined respiratory chain defects. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 629-640.
131. DiMauro S, Schon EA, Carelli V et al. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 429-444.
132. Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* 2015; 349: 1494-1499.
133. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S et al. Mitochondrial diseases. *Nature reviews Disease primers* 2016; 2: 16080.
134. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951; 14: 216-221.
135. Zhu X, Peng X, Guan MX et al. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2009; 41: 179-187.
136. Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 2005; 354: 162-168.
137. Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 2012; 44: 41-59.
138. Viscomi C, Zeviani M. MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J Inherit Metab Dis* 2017; 40: 587-599.

139. Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A et al. Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Annals of neurology* 2002; 52: 211-219.
140. Hirano M, Silvestri G, Blake DM et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994; 44: 721-727.
141. Davidzon G, Mancuso M, Ferraris S et al. POLG mutations and Alpers syndrome. *Annals of neurology* 2005; 57: 921-923.
142. Oskoui M, Davidzon G, Pascual J et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Archives of neurology* 2006; 63: 1122-1126.
143. Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 2016; 1857: 1079-1085.
144. Montero R, Pineda M, Aracil A et al. Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q10 deficiency. *Cerebellum* 2007; 6: 118-122.
145. Stehling O, Wilbrecht C, Lill R. Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 2014; 100: 61-77.
146. Davison JE, Rahman S. Recognition, investigation and management of mitochondrial disease. *Arch Dis Child* 2017.
147. Parikh S, Goldstein A, Koenig MK et al. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015; 17: 689-701.
148. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999; 283: 689-692.
149. Finsterer J. Mitochondrial ataxias. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 2009; 36: 543-553.
150. Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM et al. Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods in cell biology* 2007; 80: 93-119.
151. Moraes CT, Sciacco M, Ricci E et al. Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Muscle & nerve Supplement* 1995; 3: S150-153.
152. Rotig A, Poulton J. Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1792: 1103-1108.
153. McFarland R, Turnbull DM. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *Journal of internal medicine* 2009; 265: 210-228.
154. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135-1145.
155. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; 475: 348-352.
156. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 434-439.
157. Kulski JK. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In: INTECH, ed. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, 2015.
158. Keogh MJ, Chinnery PF. Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* 2015; 1847: 1401-1411.

159. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 8739-8746.
160. Brown GK. Bottlenecks and beyond: mitochondrial DNA segregation in health and disease. *Journal of inherited metabolic disease* 1997; 20: 2-8.
161. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001; 106: 18-26.
162. Wang J, Schmitt ES, Landsverk ML et al. An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2012; 14: 620-626.
163. Khan NA, Govindaraj P, Meena AK et al. Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *Indian J Med Res* 2015; 141: 13-26.
164. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2015; 17: 405-424.
165. Carroll CJ, Brilhante V, Suomalainen A. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *British journal of pharmacology* 2014; 171: 1837-1853.
166. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; 246: 500-503.
167. Seibler P, Graziotto J, Jeong H et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011; 31: 5970-5976.
168. Meunier B, Fisher N, Ransac S et al. Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1827: 1346-1361.
169. Montanari A, Besagni C, De Luca C et al. Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects. *Rna* 2008; 14: 275-283.
170. Lasserre JP, Dautant A, Aiyar RS et al. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Disease models & mechanisms* 2015; 8: 509-526.
171. Elo JM, Yadavalli SS, Euro L et al. Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy. *Human molecular genetics* 2012; 21: 4521-4529.
172. Andreu AL, Martinez R, Marti R et al. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors. *Mitochondrion* 2009; 9: 242-246.
173. Medja F, Allouche S, Frachon P et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 2009; 9: 331-339.
174. Dubowitz V. *Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert Consult; Online and Print.* 2013.
175. Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C et al. Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscular disorders : NMD* 2007; 17: 707-718.
176. Alla NR, Nicholson AW. Evidence for a dual functional role of a conserved histidine in RNA-DNA heteroduplex cleavage by human RNase H1. *The FEBS journal* 2012; 279: 4492-4500.
177. Goto Y, Sugita H. [Mitochondrial abnormalities and diseases]. *Nihon Naika Gakkai zasshi The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine* 1991; 80: 775-780.

178. Lu Y, Zhao D, Yao S et al. Mitochondrial tRNA genes are hotspots for mutations in a cohort of patients with exercise intolerance and mitochondrial myopathy. *Journal of the neurological sciences* 2017; 379: 137-143.
179. Sarzi E, Brown MD, Lebon S 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* 2007; 143A: 33-41.
180. Taylor RW, Morris AA, Hutchinson M et al. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *European journal of human genetics : EJHG* 2002; 10: 141-144.
181. Hsieh YT, Yang MT, Peng YJ et al. Central retinal vein occlusion as the initial manifestation of LHON / MELAS overlap syndrome with mitochondrial DNA G13513A mutation--case report and literature review. *Ophthalmic genetics* 2011; 32: 31-38.
182. Sweeney MG, Brockington M, Weston MJ et al. Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu(UUR)A-->G 3260: a second family with myopathy and cardiomyopathy. *The Quarterly journal of medicine* 1993; 86: 435-438.
183. Zeviani M, Muntoni F, Savarese N et al. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *European journal of human genetics : EJHG* 1993; 1: 80-87.
184. Van Goethem G1 DB, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics* 2001.
185. Ponamarev MV, Longley MJ, Nguyen D et al. Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 15225-15228.
186. DeBalsi KL, Longley MJ, Hoff KE et al. Synergistic Effects of the in cis T251I and P587L Mitochondrial DNA Polymerase gamma Disease Mutations. *The Journal of biological chemistry* 2017; 292: 4198-4209.
187. Lesko N, Naess K, Wibom R et al. Two novel mutations in thymidine kinase-2 cause early onset fatal encephalomyopathy and severe mtDNA depletion. *Neuromuscular disorders : NMD* 2010; 20: 198-203.
188. Gotz A, Isohanni P, Pihko H et al. Thymidine kinase 2 defects can cause multi-tissue mtDNA depletion syndrome. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131: 2841-2850.
189. Galbiati S, Bordononi A, Papadimitriou D et al. New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatric neurology* 2006; 34: 177-185.
190. Knierim E, Seelow D, Gill E et al. Clinical application of whole exome sequencing reveals a novel compound heterozygous TK2-mutation in two brothers with rapidly progressive combined muscle-brain atrophy, axonal neuropathy, and status epilepticus. *Mitochondrion* 2015; 20: 1-6.
191. Virgilio R, Ronchi D, Hadjigeorgiou GM et al. Novel Twinkle (PEO1) gene mutations in mendelian progressive external ophthalmoplegia. *Journal of neurology* 2008; 255: 1384-1391.
192. Navarro-Sastre A, Tort F, Garcia-Villoria J et al. Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients. *Molecular genetics and metabolism* 2012; 107: 409-415.
193. Baruffini E, Ferrero I, Foury F. Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochimica et biophysica acta* 2007; 1772: 1225-1235.

194. Roxburgh RH, Marquis-Nicholson R, Ashton F et al. The p.Ala510Val mutation in the SPG7 (paraplegin) gene is the most common mutation causing adult onset neurogenetic disease in patients of British ancestry. *Journal of neurology* 2013; 260: 1286-1294.
195. Bonn F, Pantakani K, Shoukier M et al. Functional evaluation of paraplegin mutations by a yeast complementation assay. *Hum Mutat* 2010; 31: 617-621.
196. Chanprasert S, Wong LJC, Wang J et al. TK2-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Myopathic Form. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA), 1993.
197. Hong D, Bi H, Yao S et al. Clinical phenotype of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia in a family with a novel mutation in the C10orf2 gene. *Muscle & nerve* 2010; 41: 92-99.
198. Vilain C, Rens C, Aeby A et al. A novel NDUFV1 gene mutation in complex I deficiency in consanguineous siblings with brainstem lesions and Leigh syndrome. *Clinical genetics* 2012; 82: 264-270.
199. Varghese F, Atcheson E, Bridges HR et al. Characterization of clinically identified mutations in NDUFV1, the flavin-binding subunit of respiratory complex I, using a yeast model system. *Human molecular genetics* 2015; 24: 6350-6360.
200. Sasarman F, Antonicka H, Horvath R et al. The 2-thiouridylase function of the human MTU1 (TRMU) enzyme is dispensable for mitochondrial translation. *Human molecular genetics* 2011; 20: 4634-4643.
201. McCormick E, Place E, Falk MJ. Molecular genetic testing for mitochondrial disease: from one generation to the next. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2013; 10: 251-261.
202. Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2013; 13: 379-387.
203. Ye F, Samuels DC, Clark T et al. High-throughput sequencing in mitochondrial DNA research. *Mitochondrion* 2014; 17: 157-163.
204. Hancock DK, Tully LA, Levin BC. A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics* 2005; 86: 446-461.
205. Maitra A, Cohen Y, Gillespie SE et al. The Human MitoChip: a high-throughput sequencing microarray for mitochondrial mutation detection. *Genome research* 2004; 14: 812-819.
206. Hartmann A. Tissue microarray studies in bladder cancer. *Scandinavian journal of urology and nephrology Supplementum* 2008: 141-146.
207. Ekblom R, Wolf JB. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary applications* 2014; 7: 1026-1042.
208. van Heesch S, Mokry M, Boskova V et al. Systematic biases in DNA copy number originate from isolation procedures. *Genome biology* 2013; 14: R33.
209. Head SR, Komori HK, LaMere SA et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 2014; 56: 61-64, 66, 68, passim.
210. Bai RK, Wong LJ. Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2005; 7: 613-622.



- 
211. Phillips NR, Sprouse ML, Roby RK. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: a multiplex real-time PCR assay. *Scientific reports* 2014; 4: 3887.
212. Valentino ML, Marti R, Tadesse S et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS letters* 2007; 581: 3410-3414.
213. Sweeney MG, Bunday S, Brockington M et al. Mitochondrial myopathy associated with sudden death in young adults and a novel mutation in the mitochondrial DNA leucine transfer RNA(UUR) gene. *The Quarterly journal of medicine* 1993; 86: 709-713.
214. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J et al. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Molecular genetics and metabolism* 2015; 116: 4-12.
215. Wang K, Takahashi Y, Gao ZL et al. Mitochondrial ND3 as the novel causative gene for Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Neurogenetics* 2009; 10: 337-345.
216. Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R et al. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochemical and biophysical research communications* 1997; 238: 326-328.
217. Shanske S, Coku J, Lu J et al. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. *Archives of neurology* 2008; 65: 368-372.
218. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A et al. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics* 2001; 28: 211-212.
219. Baruffini E, Lodi T, Dallabona C et al. A single nucleotide polymorphism in the DNA polymerase gamma gene of *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains is responsible for increased mitochondrial DNA mutability. *Genetics* 2007; 177: 1227-1231.
220. Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E et al. The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *Journal of medical genetics* 2009; 46: 776-785.
221. Tang S, Wang J, Lee NC et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *Journal of medical genetics* 2011; 48: 669-681.
222. Camara Y, Carreno-Gago L, Martin MA et al. Severe TK2 enzyme activity deficiency in patients with mild forms of myopathy. *Neurology* 2015; 84: 2286-2288.
223. Tyynismaa H, Sun R, Ahola-Erkkila S et al. Thymidine kinase 2 mutations in autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Human molecular genetics* 2012; 21: 66-75.
224. Brugman F, Scheffer H, Wokke JH et al. Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology* 2008; 71: 1500-1505.
225. Sanchez-Ferrero E, Coto E, Beetz C et al. SPG7 mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V. *Clinical genetics* 2013; 83: 257-262.
226. Pfeffer G, Gorman GS, Griffin H et al. Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain : a journal of neurology* 2014; 137: 1323-1336.
227. Chung KW, Kim SB, Park KD et al. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain : a journal of neurology* 2006; 129: 2103-2118.

228. Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S et al. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain : a journal of neurology* 2006; 129: 2093-2102.
229. Rouzier C, Bannwarth S, Chausseot A et al. The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain : a journal of neurology* 2012; 135: 23-34.
230. Tynismaa H, Ylikallio E, Patel M et al. A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *American journal of human genetics* 2009; 85: 290-295.
231. Reyes A, Melchionda L, Nasca A et al. RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *American journal of human genetics* 2015; 97: 186-193.
232. Bugiardini E, Poole OV, Manole A et al. Clinicopathologic and molecular spectrum of RNASEH1-related mitochondrial disease. *Neurol Genet* 2017; 3: e149.
233. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P et al. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain : a journal of neurology* 2008; 131: 338-351.
234. Shaibani A, Shchelochkov OA, Zhang S et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Archives of neurology* 2009; 66: 1028-1032.
235. Van Goethem G, Schwartz M, Lofgren A et al. Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *European journal of human genetics : EJHG* 2003; 11: 547-549.
236. Lake NJ, Compton AG, Rahman S et al. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology* 2016; 79: 190-203.
237. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2014; 48: 77-84.
238. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science translational medicine* 2012; 4: 118ra110.
239. Ferdinandusse S, Friederich MW, Burlina A et al. Clinical and biochemical characterization of four patients with mutations in ECHS1. *Orphanet journal of rare diseases* 2015; 10: 79.
240. Riley LG, Menezes MJ, Rudinger-Thirion J et al. Phenotypic variability and identification of novel YARS2 mutations in YARS2 mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia. *Orphanet journal of rare diseases* 2013; 8: 193.
241. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic acids research* 2007; 35: D823-828.
242. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O et al. mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Current protocols in bioinformatics* 2013; 44: 1 23 21-26.
243. Yang J, Zhu Y, Tong Y et al. Confirmation of the mitochondrial ND1 gene mutation G3635A as a primary LHON mutation. *Biochemical and biophysical research communications* 2009; 386: 50-54.
244. Brown MD, Zhadanov S, Allen JC et al. Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families. *Human genetics* 2001; 109: 33-39.
245. Zhang J, Jiang P, Jin X et al. Leber's hereditary optic neuropathy caused by the homoplasmic ND1 m.3635G>A mutation in nine Han Chinese families. *Mitochondrion* 2014; 18: 18-26.
246. Zhou X, Qian Y, Zhang J et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the T3866C mutation in mitochondrial ND1 gene in three Han Chinese Families. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012; 53: 4586-4594.

- 
247. Yen MY, Chen CS, Wang AG et al. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. *The British journal of ophthalmology* 2002; 86: 1027-1030.
248. Vissing J, Salamon MB, Arlien-Soborg P et al. A new mitochondrial tRNA(Met) gene mutation in a patient with dystrophic muscle and exercise intolerance. *Neurology* 1998; 50: 1875-1878.
249. Sternberg D, Chatzoglou E, Laforet P et al. Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain : a journal of neurology* 2001; 124: 984-994.
250. Olsen DB, Langkilde AR, Orngreen MC et al. Muscle structural changes in mitochondrial myopathy relate to genotype. *Journal of neurology* 2003; 250: 1328-1334.
251. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999; 341: 1037-1044.
252. Swalwell H, Deschauer M, Hartl H et al. Pure myopathy associated with a novel mitochondrial tRNA gene mutation. *Neurology* 2006; 66: 447-449.
253. Yarham JW, Al-Dosary M, Blakely EL et al. A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations. *Hum Mutat* 2011; 32: 1319-1325.
254. Ronchi D, Di Fonzo A, Lin W et al. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *American journal of human genetics* 2013; 92: 293-300.
255. Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB et al. Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature genetics* 2013; 45: 214-219.
256. Ashley N, O'Rourke A, Smith C et al. Depletion of mitochondrial DNA in fibroblast cultures from patients with POLG1 mutations is a consequence of catalytic mutations. *Human molecular genetics* 2008; 17: 2496-2506.
257. Guan MX. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 259-271.
258. Young WY, Zhao L, Qian Y et al. Variants in mitochondrial tRNAGlu, tRNAArg, and tRNAThr may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese families with hearing loss. *American journal of medical genetics Part A* 2006; 140: 2188-2197.
259. Li X, Li R, Lin X et al. Isolation and characterization of the putative nuclear modifier gene MTO1 involved in the pathogenesis of deafness-associated mitochondrial 12 S rRNA A1555G mutation. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 27256-27264.
260. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D et al. Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes MTO1 and GTPBP3. *Molecular genetics and metabolism* 2004; 83: 199-206.
261. Yan Q, Bykhovskaya Y, Li R et al. Human TRMU encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness-associated 12S rRNA mutations. *Biochemical and biophysical research communications* 2006; 342: 1130-1136.
262. Guan MX, Yan Q, Li X et al. Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *American journal of human genetics* 2006; 79: 291-302.
-

263. Torroni A, Cruciani F, Rengo C et al. The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *American journal of human genetics* 1999; 65: 1349-1358.
264. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA et al. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal of inherited metabolic disease* 2015; 38: 437-443.
265. Lieber DS, Calvo SE, Shanahan K et al. Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology* 2013; 80: 1762-1770.



**10 ANEXO**



## Identification and characterization of the novel point mutation m.3634A>G in the mitochondrial *MT-ND1* gene associated with LHON syndrome



Lidia Carreño-Gago<sup>a,b</sup>, Josep Gamez<sup>d</sup>, Yolanda Cámara<sup>a,b</sup>, Elena Alvarez de la Campa<sup>c</sup>, Juan Sebastian Aller-Alvarez<sup>d</sup>, Dulce Moncho<sup>e</sup>, Maria Salvado<sup>d</sup>, Alicia Galan<sup>f</sup>, Xavier de la Cruz<sup>c,g</sup>, Tomàs Pinós<sup>a,b,1</sup>, Elena García-Arumí<sup>a,b,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Translational Bioinformatics, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Departament de neurologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Departament de neurofisiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Departament d'oftalmologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Spain

<sup>h</sup> Àrea de Genètica Clínica i Molecular, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 April 2016

Received in revised form 1 September 2016

Accepted 5 September 2016

Available online 07 September 2016

#### Keywords:

Novel mutation

mtDNA

*MT-ND1*

LHON syndrome

Cybrids

### ABSTRACT

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a mitochondrial genetic disease characterized by bilateral acute or subacute progressive central visual loss. Most cases of LHON syndrome are caused by point mutations in the *MT-ND1*, *MT-ND4*, and *MT-ND6* genes.

Here, we report a novel homoplasmic mutation in the *MT-ND1* gene (m.3634A>G, p.Ser110Gly) in a patient with the classical clinical features of LHON syndrome.

Several observations support the idea that the mutation is pathogenic and involved in the clinical phenotype of the patient: 1) The mutation affected a highly conserved amino acid, 2) A pathogenic mutation in the same amino acid (m.3635G>A, p.Ser110Asn) was previously reported in a patient with LHON syndrome, 3) The mutation is not recorded in the Mitomap or Human Mitochondrial Genome Database, 4) In silico predictors classified the mutation as "probably damaging", and 5) Cybrids carrying the mutation showed decreased Complex I enzyme activity, lower cell proliferation, and decreased mitochondrial membrane potential relative to control cybrids.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mitochondria are organelles that play a critical role in the generation of metabolic energy in eukaryotic cells. Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of disorders caused by mutations in the nuclear and mitochondrial genomes, which lead to mitochondrial dysfunction [1,2]. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) account for approximately 15% of mitochondrial diseases. Currently, more than 150 different mtDNA point mutations and innumerable large-scale rearrangements have been described and linked to a wide variety of conditions [3].

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a mitochondrial genetic disease that predominantly affects young men and is

transmitted by maternal inheritance. It is characterized by rapid unilateral or bilateral vision loss mainly affecting the central vision, attributed to degeneration of the retinal ganglion cell layer and optic nerve. LHON leads to permanent vision loss in most cases [4,5]. The clinical phenotype was initially described in 1871 by Theodor Leber, but the first report associating the disease with mtDNA point mutations was published in 1988 [6].

The three most common LHON-associated mtDNA point mutations result in changes in Complex I subunit genes. These include m.3460G>A (p.A52T) in the *MT-ND1* gene [7,8], m.11778G>A (p.R340H) in the *MT-ND4* gene [6], and m.14484T>C (p.M64V) in the *MT-ND6* gene [9,10]. These mutations account for approximately 90% of LHON pedigrees in some countries [11–13]. In total, 20 primary mutations in these three genes have been described as a cause of LHON, and 20 additional mutations occurring in *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND5*, *MT-ND6*, *MT-ATP6*, *MT-CO3* and *MT-CYB* have also been described as pathogenic in this disease (<http://www.>

\* Corresponding author at: Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Hospital Universitari Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain.

E-mail address: [elena.garcia@vhir.org](mailto:elena.garcia@vhir.org) (E. García-Arumí).

<sup>1</sup> These authors share senior authorship.

mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsLHON). In fact, *MT-ND6* and *MT-ND1* (including m.3866T>C, m.3635G>A and m.3733G>A mutations) are reported to be mutational hot spots for the disease [14–18]. LHON-associated point mutations are usually inherited in homoplasmy, although cases in heteroplasmy have also been reported [19]. The degree of penetrance varies, and not all individuals with these mutations ultimately develop the disease, suggesting that other factors, such as the mitochondrial haplotype, the influence of certain nuclear genes, epigenetic changes, and environmental factors may contribute to the degree of penetrance and the onset of the disease.

In this study, we report the case of a patient with the typical clinical features of LHON syndrome, who was found to have an unreported mutation in the *MT-ND1* gene: m.3634A>G (p.Ser110Gly). We present data supporting the pathogenicity of this new mutation.

## 2. Material and methods

### 2.1. Case report

A 25-year-old Romanian man, smoker of 20 cigarettes per day, was referred to our Emergency Department for subacute bilateral vision loss, preceded by dizziness on the previous day. He had no accompanying headache or fever. Neurological examination on admission revealed a severe loss of visual acuity in both eyes. In the distance vision test, visual acuity was 20/800 in the left eye and 20/2000 in the right eye. The pupillary light reflex was decreased. Fundoscopy showed pale optic disks, and normal macular/retinal areas in both eyes. The remainder of the physical-neurological examination was normal.

The pattern visual evoked potential (PVEP) evaluation showed an absence of response in both eyes. Pattern electroretinography (PERG) showed a bilateral N95 amplitude reduction with normal P50 amplitude. Full-field ERG was normal in both eyes. Taken together, these findings were consistent with severe bilateral dysfunction of the retinal ganglion cells and optic nerve. EMG/ENG studies were normal. On cranial magnetic resonance imaging (MRI), there were no optic nerve or white matter abnormalities in either cerebral hemisphere. Optical coherence tomography showed thinning of the retinal nerve fiber layer in both eyes, which was more pronounced in the left eye. Laboratory findings included an elevated blood lactate concentration (independently measured twice, with values of 3.3 and 3.0 mmol/L; normal range, 0.63–2.45), and negative testing for *anti-aquaporin-4* antibodies.

Two years previously, the patient had been treated by the emergency room ophthalmologist to extract a foreign body from his left eye, and no optic nerve anomalies were detected at that time. The patient's family history revealed that his 57-year-old mother, who lives in Romania, has reduced visual acuity. The patient is the older of two siblings, and his younger brother has no eyesight problems. The family pedigree is depicted in Fig. 1. We have no further ophthalmological information about these or any other relatives.

Neurological and ophthalmological follow-up 6 months later showed no changes in visual acuity.

### 2.2. mtDNA analysis

Total DNA was extracted from whole blood using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). To investigate the three most common point mutations associated with LHON syndrome (genetically representing 95% of cases), the *MT-ND1*, *MT-ND4* and *MT-ND6* genes were PCR-amplified using the following primers: 5'TACTTCACAAAGCCCTTCC3'/5'ATGAAGAATAGGGCGAAGGG3' (*MT-ND1*), 5'TCACTCTCAC TGCCCAAGAA3'/5'GGAGAATGGGGATAGGTGT3' (*MT-ND4*) and 5'GCATAATAAAGTTACTTC3'/5'AGAATATTGAGCGCCATTG3' (*MT-ND6*). PCR was performed at 94 °C for 5 min, 30 cycles were then carried out (94 °C 30 s/61 °C 45 s/72 °C 1 min), and a final extension step was performed at 72 °C for 7 min. PCR products were purified with ExoSAP-IT

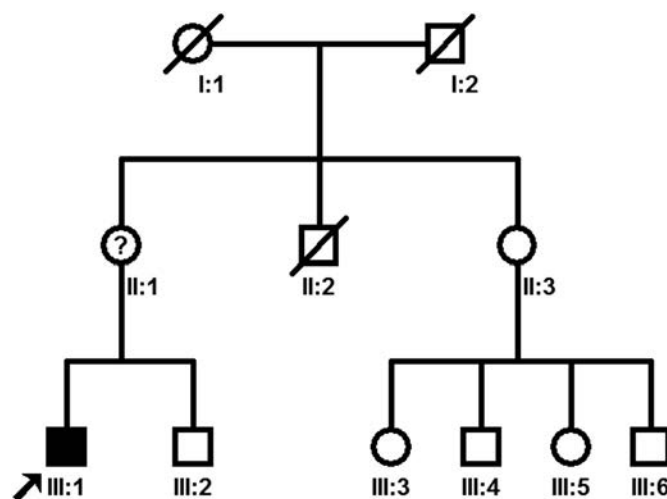


Fig. 1. LHON case family pedigree (arrow shows the proband).

(Affymetrix, CA) and underwent cycle sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Kit (Life Technologies, CA). Excess dye terminators were removed using BigDye XTerminator (Life Technologies, CA). Samples underwent capillary electrophoresis on an AB3130xl genetic analyzer (Life Technologies, CA).

The entire mtDNA sequence was analyzed using Mitochip, version 2.0 (Affymetrix Inc.), as described elsewhere [20], and the GeneChip sequence analysis software (GSEQ v4.1, Affymetrix Inc).

### 2.3. Phylogenetic conservation

Phylogenetic conservation of the *MT-ND1* protein sequence was analyzed in nine species—human (*Homo sapiens*, NCBI reference sequence YP\_003024026.1), gorilla (*Gorilla gorilla*, NCBI reference sequence YP\_002120659.1), cow (*Bos taurus*, NCBI reference sequence YP\_209205.1), mouse (*Mus musculus*, NCBI reference sequence NP\_904328.1), red jungle fowl (*Gallus gallus*, NCBI reference sequence NP\_006915.1), freshwater crocodile (*Crocodylus johnsoni*, NCBI reference sequence YP\_004300394.1), western clawed frog (*Xenopus tropicalis*, NCBI reference sequence YP\_203370.1), zebrafish (*Danio rerio*, NCBI reference sequence NP\_059331.1), and fruit fly (*Drosophila melanogaster*, NCBI reference sequence NP\_008289.1)—using ClustalW2 software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### 2.4. In silico analysis

The functional impact of the mutation on the ND1 protein sequence was estimated by characterizing the evolutionary [21] (entropy and position-specific scoring matrix [PSSM] values obtained from the multiple sequence alignment), physicochemical (protein volume change and BLOSUM62 mutation matrix element), and structural properties (accessibility and free energy change upon mutation, obtained with FoldX [22]). In addition, the PolyPhen (Polymorphism Phenotyping v2) program (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) was used to predict whether the mutation had a pathological or neutral effect on the protein [23].

### 2.5. Generation of transmitochondrial cybrids

To investigate the pathogenicity of the mutation, transmitochondrial cybrids carrying m.3634A>G (haplogroup HV4b) were generated. Platelet cells from the proband were isolated from a blood sample and fused to an excess of mtDNA-less human osteosarcoma 143B (TK-) cells, as described previously [24]. Different cybrid clones were obtained by



culturing the fusion mixture in selective Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biowest, France) containing glucose (4.5 g/L) supplemented with pyruvate (0.11 g/L), glutamine (2 mM), and 10% dialyzed fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Life technologies, CA). Twenty-five different clones were selected and analyzed by Sanger sequencing, and three independent mutated clones were finally selected to perform all the studies. As the mutation was present in homoplasmy, it was not possible to obtain an isogenic control. Hence, three non-isogenic wild-type cell lines (H1 and H2 haplogroups) were used as controls: 1) a wild-type cybrid (haplogroup H1) from a 57-year-old white woman with NARP syndrome who had the m.8839G>C mutation in heteroplasmy, 2) a wild-type cybrid (haplogroup H2) from a 15-year-old white adolescent boy with mental retardation and general dystonia who had the m.14487T>C mutation in heteroplasmy; and 3) a wild-type cybrid derived from a patient with the m.8993T>G mutation (haplogroup H1) in heteroplasmy, kindly provided by Dr. Julio Montoya. The complete mtDNA of these three wild-type clones was sequenced and no pathogenic mutations were found. All clones were grown in DMEM containing glucose (4.5 g/L), pyruvate (100 mM), glutamine (200 mM), and 5% FBS (without uridine). To perform these experiments, the present project received the approval of the Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron (PR(AG)157|2015).

## 2.6. Cell proliferation

Cell proliferation studies were performed in either glucose or galactose medium. Cybrids were seeded in glucose-rich medium (4.5 g/L), and 24 h later (Time 0) the medium was replaced with either glucose (4.5 g/L) or galactose (1 g/L). Culture media were changed daily. Cell number was counted at Time 0, and at 72 and 168 h, using the Countess automated cell counter (Life technologies, CA).

## 2.7. mtDNA copy number

mtDNA copy number was determined by real-time PCR, as described previously [25], and expressed as the ratio between mitochondrial *MT-RNR1* gene copy number and nuclear *RNaseP* gene copy number. *RNaseP* is a nuclear single-copy gene. Results are expressed as the mtDNA/nDNA (*MT-RNR1/RNaseP*) copy number ratio.

## 2.8. Oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity

Pellets from  $5 \times 10^6$  cybrid cells were resuspended in 200  $\mu$ L mannitol buffer, pH 7.2 (mannitol 225 mM, sucrose 75 mM, Tris-HCl 10 mM, and EDTA 0.1 mM), and sonicated during 5 s at moderate intensity to obtain a homogenous solution. Protein content was determined using the Coomassie Plus protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA), adjusting the solution with mannitol buffer to obtain a final protein concentration of 2 mg/mL. Complex I, Complex I + III, Complex II, Complex II + III, Complex IV and citrate synthase activities were determined as previously described [26]. Enzyme activities are expressed as nmol/min · mg protein.

## 2.9. OXPHOS protein content

Western blot analysis was performed with protein from mitochondria-enriched fractions, obtained as follows: Cybrid cells were trypsinized, washed with PBS, resuspended in 5 mL homogenization buffer (sucrose 250 mM, HEPES 10 mM pH 7.4, EGTA 1 mM) and a tablet of protease inhibitors [Roche Complete-Mini Protease], mechanically homogenized by performing 10 strokes with a glass homogenizer, and centrifuged for 10 min at 1500  $\times$ g at 4 °C. The supernatant was reserved, the pellet was resuspended again in 5 mL homogenization buffer, 20 additional strokes were performed, and centrifugation was carried out for 10 min at 1500  $\times$ g at 4 °C. The first and second

supernatants were pooled and centrifuged for 10 min at 10,000  $\times$ g at 4 °C to obtain a mitochondria fraction-enriched pellet that was resuspended in homogenization buffer. Samples were heat-denatured in loading buffer (Laemmli buffer and DTT) and subjected to discontinuous SDS-PAGE with 4% and 12% polyacrylamide in the stacking and resolving gels, respectively. Proteins were transferred to Immun-Blot PVDF membranes (Biorad, Hercules, CA). Membranes were first blocked for 1 h in TBS containing 0.01% Tween 20 (Sigma) and 5% skim milk, and then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against human OXPHOS proteins (MitoProfile total OXPHOS human antibody cocktail, Mitosciences, Eugene, Oregon, USA) and VDAC (Mitosciences) in the same buffer. After incubation, membranes were washed three times in TBS containing 0.01% Tween 20 for 15 min to remove excess antibody, specific antibody-antigen complexes were identified using horseradish peroxidase-labeled rabbit *anti*-mouse and goat *anti*-rabbit IgG secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark), and incubation was carried out with the chemiluminescent substrate West Dura reagent (Pierce, Etten-Leur, Netherlands). The different protein bands were quantified by densitometry using ImageJ 1.42q software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Relative quantification (relative protein levels) was obtained as the ratio between the densitometry values of the different OXPHOS proteins and the densitometry values of the VDAC protein. Results are expressed as a percentage of the mean NDUF8 protein density value obtained with the control cybrids.

## 2.10. Analysis of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was determined by flow cytometric analysis using the MitoPT TMRE Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies, LLC, MN). Cybrid cells were trypsinized and adjusted to  $5 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  cells/mL; 980  $\mu$ L of the cell solution was transferred to fresh tubes with 20  $\mu$ L of MitoP working solution and incubated for 20 min at 37 °C. Cybrid cells that were not TMRE-stained, and TMRE-stained cells treated with 1  $\mu$ L of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) 50 mM to induce quick mitochondrial membrane depolarization, were used as controls. All samples were centrifuged, resuspended with 1 mL assay buffer 1 $\times$ , and analyzed using a FACS Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Results are expressed as a percentage of the mean value obtained with the control cybrids.

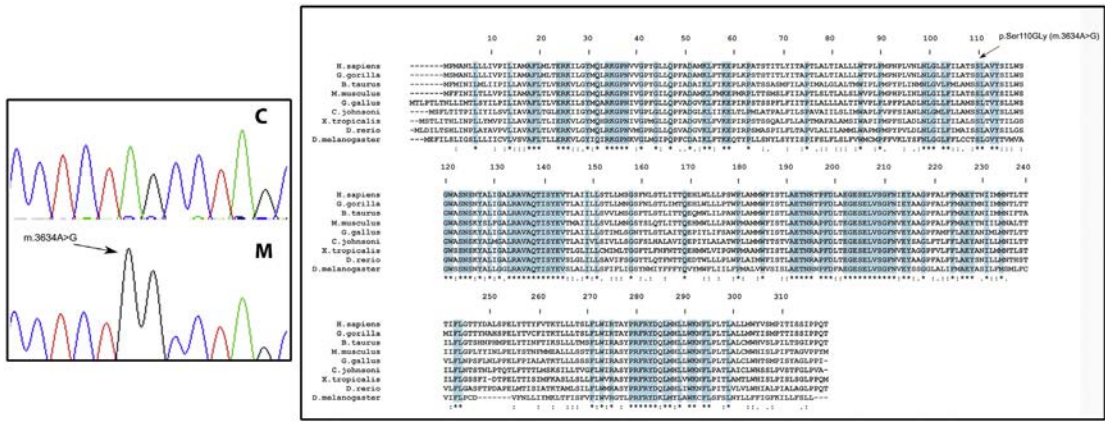
## 2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test (SPSS 15.0).

## 3. Results

### 3.1. Molecular analysis of LHON mutations

The three most common point mutations causing LHON syndrome (m.3460G>A in *MT-ND1*, m.11778G>A in *MT-ND4*, and m.14484T>C in *MT-ND6*) were studied by Sanger sequencing of DNA from the patient's blood. None of these mutations were found, but we identified an unreported mutation, m.3634A>G (p.Ser110Gly), in the *MT-ND1* gene (Fig. 2). The MitoChip assay was carried out to analyze the complete mtDNA sequence and exclude additional point mutations. The list of variants found is shown in Table 1. According to the Mitomap database, all variants were considered polymorphisms, with the exception of m.3634A>G. The presence of the m.1715C>T, m.2706A>G, m.7028C>T, m.7094T>C, and m.16069C>T polymorphisms indicates that the patient belonged to the HV4b haplogroup.



**Fig. 2.** Representative electropherogram corresponding to analysis of the *MT-ND1* sequence in the patient's blood sample (homoplasmic m.3634A>G mutation, arrow) and phylogenetic conservation of the human ND1 protein sequence. p.Ser110Gly (m.3634A>G) is indicated by arrows. Conserved nucleotides in all the sequences analyzed are marked in blue.

3.2. Phylogenetic conservation

Phylogenetic conservation analyses of the ND1 protein sequence and the m.3634 nucleotide position from nine species, including mammals (*Homo sapiens*, *Gorilla gorilla*, *Bos taurus* and *Mus musculus*), reptiles (*Crocodylus johnsoni*), amphibians (*Xenopus tropicalis*), birds (*Gallus gallus*), fish (*Danio rerio*), and insects (*Drosophila melanogaster*), showed that serine 110 (m.3634A) is one of the 109 (out of 318; ~34%) completely conserved amino acids in the human protein sequence (Fig. 2), and that adenine 471 (m.3634A) in *MT-ND1* is conserved in the species analyzed.

3.3. In silico analysis

The change in physicochemical properties was consistent with a potentially damaging amino acid replacement. Replacement of S by G is associated with a 25 Å<sup>3</sup> drop in the Van der Waals volume and results in a dramatic change in the main-chain conformational properties: S populates a more restricted region of the Ramachandran plot than G [27]. The BLOSUM62 score value (0.00) suggested a moderate impact. The evolutionary properties indicated that p.Ser110Gly is likely a damaging replacement. It occurred at a location in the multiple sequence alignment where a low entropy value (0.27) is characteristic of positions with small sequence variability. This is coherent with the PSSM score (3.91), which denotes high conservation of the wild-type amino acid. That is, the S to G replacement takes place at a location where little

interspecies variability is observed, suggesting that this location is under large functional/structural constraints. This notion was further supported by the structural analyses. The free energy computation yielded a positive value (FoldX: 0.70), which is the label of unstable mutations. This is consistent with the low accessibility predicted for the wild-type location, 0.318, since normally (half-) buried locations are less tolerant to sequence changes than accessible locations. Finally, both versions of the Polyphen-2 predictor (HumDiv and HumVar) classified the p.Ser110Gly substitution in the human mitochondrial ND1 protein sequence as “probably damaging” (scores of 0.999 and 0.997, respectively).

3.4. Cell proliferation

The three control cybrids (two haplogroup H1 and one haplogroup H2) and the mutated clones (m.3634A>G) were cultured in glucose (4.5 g/L) and galactose (1 g/L) media for 168 h. In glucose media, there were no significant differences in proliferation between control and mutated cybrids. However, after 168 h of growth in galactose, significant differences in proliferation were found (P = 0.05): an 8.5-fold increase in the total number of cells was observed in control cybrids and a 12% decrease was found in mutated cybrids (Fig. 3).

3.5. mtDNA copy number

The mtDNA copy number, expressed as the mtDNA/nDNA copy number ratio, was higher in mutated cybrids (389 ± 27) than in control cybrids (234 ± 62) (P < 0.05).

3.6. OXPHOS protein content

Western blot analysis of OXPHOS proteins showed no statistically significant differences in proteins encoded by nuclear DNA genes (NDUF8; subunit of Complex I, core 2 of Complex III) and proteins encoded by mtDNA (COX II; cytochrome c oxidase subunit II) (Fig. 4).

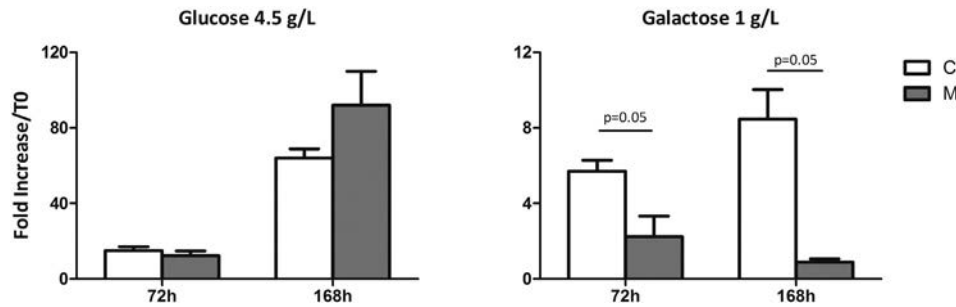
3.7. OXPHOS enzyme activities

We observed a statistically significant decrease in Complex I and I + III activity in mutated clones compared to control cybrids (P < 0.05). However, no statistically significant differences were seen in Complex II, II + III, and IV activities, expressed by citrate synthase (Table 2).

**Table 1**  
mtDNA variants found in patient respect to Revised Cambridge Reference Sequence (rRCS; NC\_012920).

Nucleotide position	Locus	Nucleotide reference	Nucleotide change	Amino acid change
263	<i>MT-DLOOP</i>	A	G	Non coding
750	<i>MT-RNR1</i>	A	G	Non coding
1438	<i>MT-RNR1</i>	A	G	Non coding
1715 <sup>a</sup>	<i>MT-RNR2</i>	C	T	Non coding
2706 <sup>a</sup>	<i>MT-RNR2</i>	A	G	Non coding
3634	<b><i>MT-ND1</i></b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>S-G</b>
4769	<i>MT-ND2</i>	A	G	Synonymous
5301	<i>MT-ND2</i>	A	G	I-V
7028 <sup>a</sup>	<i>MT-COI</i>	C	T	Synonymous
7094 <sup>a</sup>	<i>MT-COI</i>	T	C	Synonymous
8860	<i>MT-ATP6</i>	A	G	T-A
10,680	<i>MT-ND4L</i>	G	A	A-T
13,735	<i>MT-ND5</i>	C	A	L-I
15,326	<i>MT-CYB</i>	A	G	T-A
15,943	<i>MT-MTT</i>	T	C	Non coding
16,069 <sup>a</sup>	<i>MT-DLOOP</i>	C	T	Non coding

<sup>a</sup> Hv4b haplogroup variants; the m.3634A>G has showed in bold.



**Fig. 3.** Cell growth on glucose and galactose media after 72 and 168 h of culture. Results are expressed as the fold increase with respect to the total cell count at Time 0. Three mutated clones (M) and three control cybrid cell lines (C) were analyzed.

### 3.8. Mitochondrial membrane potential

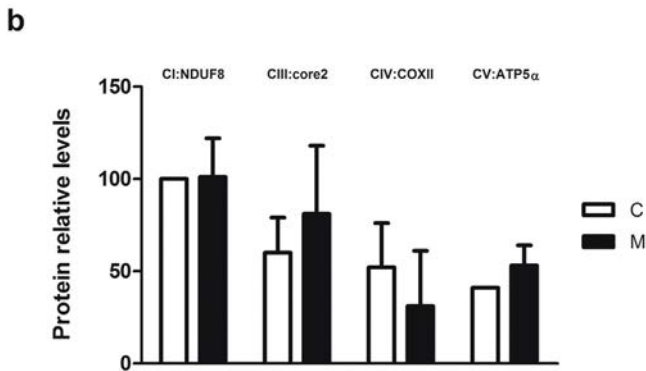
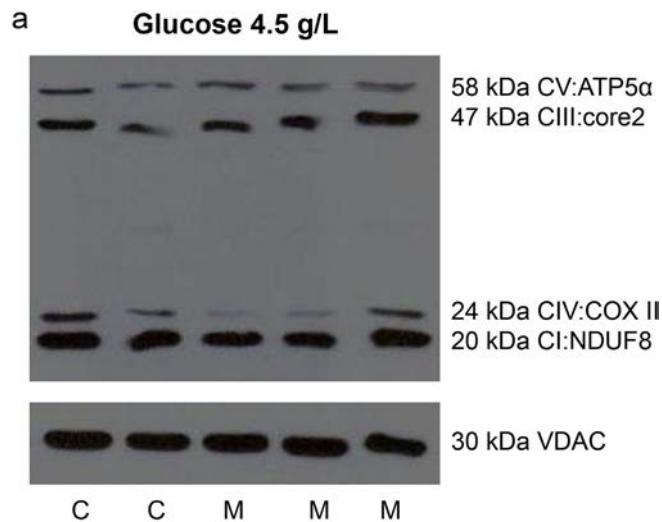
Mitochondrial membrane potential was significantly lower in mutated clones (Fig. 5).

## 4. Discussion

This study reports a novel mtDNA mutation in the *MT-ND1* gene (m.3634A>G; p.Ser110Gly) found in a patient with subacute bilateral vision loss referred to our Emergency Department. The m.3634A>G

mutation affected amino acid 110 of the ND1 protein, causing a change from a highly conserved serine (polar/hydrophilic) to glycine (non-polar). Several observations support the notion that m.3634A>G is pathogenically involved in the patient's clinical phenotype: 1) An in silico search in 30,589 human mtDNA sequences from different mitochondrial haplogroups did not find the mutation; [28,29]; 2) The affected amino acid was highly conserved in all the mitochondrial ND1 sequences analyzed (from mammals, amphibians, birds, fish, and invertebrates), suggesting that its substitution could compromise protein function; 3) In silico analysis using different approaches classified the mutation as “probably damaging”; 4) An mtDNA mutation, (m.3635G>A), reported as pathogenic in patients with LHON syndrome has already been described in the same codon; [30–32] and finally, 5) Cybrids carrying the mutation showed a decrease in Complex I enzyme activity, lower cell proliferation, and decreased mitochondrial membrane potential relative to control cybrids.

Indeed, cybrids with the m.3634A>G mutation were unable to proliferate on galactose culture medium, whereas they grew normally on glucose medium, indicating a deleterious effect of the mutation on cell viability when cells were forced to obtain ATP from the OXPHOS system. A statistically significant decrease ( $\approx 60\%$ ) in Complex I and Complex I + III activity was seen in mutated cybrids relative to their wild-type controls. These results are consistent with those obtained in cybrids carrying the m.3635G>A mutation, which have shown a significant reduction in Complex I activity ( $\approx 27\%$  decrease) [16]. m.3635G>A is a mis-sense mutation that also affects amino acid 110 of the ND1 human protein and causes a serine (polar/hydrophilic) to asparagine (polar/neutral) amino acid transition [16]. Serine at position 110 in ND1 is localized at a highly conserved residue on the third trans-membrane domain of this polypeptide; thus, the m.3634A>G and m.3635G>A mutations may both alter the tertiary structure of this polypeptide, thereby affecting its function [17].



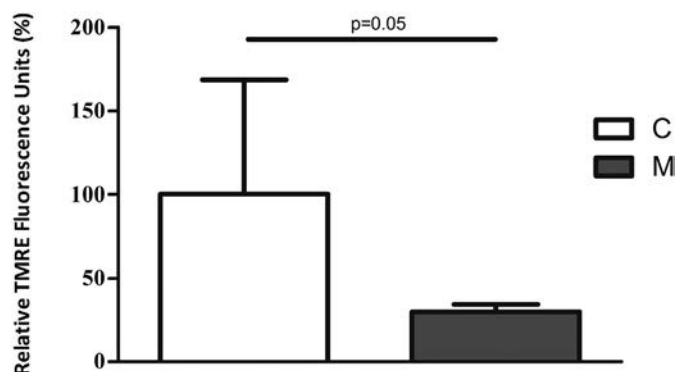
**Fig. 4.** OXPHOS protein levels. a) Western blot analyses of OXPHOS protein levels (NDUF8, COX II, core 2 and ATP5 $\alpha$ ). Only COX II is encoded by mtDNA. The VDAC (voltage-dependent anion channel) protein is a porin ion channel located on the mitochondrial outer membrane, used as the loading control. b) Relative quantification of OXPHOS protein levels in three mutated clones (M) and two control cybrid cell lines (C). Results are expressed as a percentage of the mean NDUF8 protein density value obtained with the control cybrids.

**Table 2**

OxPhos enzyme activities are expressed in nmol/min·mg and as a ratio between OxPhos complex activities/citrate synthase activity. Three mutated clones (M) and three control cybrid cell lines (C) were measured. The table showed the mean and the standard deviation.

Complex activity (nmol/min·mg)	M	C
CI	5.0 $\pm$ 0.3*	12.3 $\pm$ 0.8
CII	10.9 $\pm$ 2.6	11.9 $\pm$ 4.5
CIV	52.1 $\pm$ 12.2*	76.3 $\pm$ 17.4
CI + III	5.4 $\pm$ 1.4*	13.7 $\pm$ 2.9
CII + III	13.9 $\pm$ 4.8	20.7 $\pm$ 9.2
CS	121.3 $\pm$ 8.6	126.6 $\pm$ 44.4
Complex/CS ratio	M	C
CI/CS	0.04 $\pm$ 0.01*	0.11 $\pm$ 0.04
CII/CS	0.09 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.05
CIV/CS	0.42 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.24
CI + III/CS	0.05 $\pm$ 0.01*	0.12 $\pm$ 0.05
CII + III/CS	0.12 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.08

\* P value  $\leq$  0.05.



**Fig. 5.** Mitochondrial membrane potential measurement using TRME dye. Results are expressed as the mean relative TRME fluorescence units (% of mean control value) in three mutated clones (M) and three control cybrid cell lines (C).

ND1 is one of the 44 protein subunits that constitute Complex I. Mutations (in mtDNA or nDNA) affecting this complex may affect electron transfer through the complexes and the mitochondrial electrochemical gradient. In this regard, we observed a reduction in mitochondrial membrane potential in cybrids carrying the m.3634A>G mutation, although we cannot completely exclude the possibility that part of this reduction may be caused by apoptotic processes or cell necrosis.

These results cannot be attributed to the decrease in mtDNA copy number in mutated cybrids compared to controls, as a significant increase was even observed in mutated cybrids. Compensatory mechanisms producing an increase in mtDNA copy number in response to mtDNA mutations have been described in blood cells of patients with LHON syndrome caused by the m.11778G>A mutation [33].

Western blot analysis did not show a significant effect of mutated ND1 on the content of the proteins studied, either the NDUFB8 protein, an accessory subunit of Complex I encoded by the nuclear genome, or COX II, a subunit of Complex IV encoded by mtDNA. Additionally, preliminary results obtained with Blue native PAGE experiments indicate that Complex I amounts are not affected by the m.3634A>G mutation (data not shown).

Although further experiments are needed to fully characterize the molecular and structural consequences of the m.3634A>G mutation, the results presented here clearly support a pathogenic involvement of this mutation in the patient's LHON clinical phenotype.

#### Conflict of interest

None of the authors have any conflicts of interest to declare.

#### Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

#### Acknowledgements

This study was supported by Spanish Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS); JG is the recipient of a grant from the FIS PI13-01272-FEDER, and EGA from the FIS PI12-02149-FEDER and FISPI15/01428-FEDER. XC from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad BIO2012-40133. We would like to thank Dr. Julio Montoya for kindly providing the wild-type cybrids.

#### References

- [1] GM. C, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed., 2000.
- [2] P.F. Chinnery, *Mitochondrial Disorders Overview*, 1993.
- [3] S. Dimauro, G. Davidzon, *Mitochondrial DNA and disease*, *Ann. Med.* 37 (3) (2005) 222–232.
- [4] A.E. Harding, M.G. Sweeney, G.G. Govan, P. Riordan-Eva, Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation, *Am. J. Hum. Genet.* 57 (1) (1995) 77–86.
- [5] N.J. Newman, Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve, *Am J. Ophthalmol.* 140 (3) (2005) 517–523.
- [6] D.C. Wallace, G. Singh, M.T. Lott, J.A. Hodge, T.G. Schurr, A.M. Lezza, L.J. Elsas 2nd, E.K. Nikoskelainen, Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy, *Science* 242 (4884) (1988) 1427–1430.
- [7] K. Huoponen, J. Vilkkki, P. Aula, E.K. Nikoskelainen, M.L. Savontaus, A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy, *Am. J. Hum. Genet.* 48 (6) (1991) 1147–1153.
- [8] N. Howell, Leber hereditary optic neuropathy: mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve, *Vis. Res.* 37 (24) (1997) 3495–3507.
- [9] D.R. Johns, M.J. Neufeld, R.D. Park, An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 (3) (1992) 1551–1557.
- [10] D. Mackey, N. Howell, A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (6) (1992) 1218–1228.
- [11] M.D. Brown, A. Torroni, C.L. Reckord, D.C. Wallace, Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations, *Hum. Mutat.* 6 (4) (1995) 311–325.
- [12] D.A. Mackey, R.J. Oostra, T. Rosenberg, E. Nikoskelainen, J. Bronte-Stewart, J. Poulton, A.E. Harding, G. Govan, P.A. Bolhuis, S. Norby, Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (2) (1996) 481–485.
- [13] Y. Mashima, K. Yamada, M. Wakakura, K. Kigasawa, J. Kudoh, N. Shimizu, Y. Oguchi, Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy, *Curr. Eye Res.* 17 (4) (1998) 403–408.
- [14] I. Martínez-Romero, M.D. Herrero-Martin, L. Llobet, S. Emperador, A. Martín-Navarro, B. Narberhaus, F.J. Ascaso, E. Lopez-Gallardo, J. Montoya, E. Ruiz-Pesini, New MT-ND1 pathogenic mutation for Leber hereditary optic neuropathy, *Clin. Exp. Ophthalmol.* 42 (9) (2014) 856–864.
- [15] I.E. Scheffler, Mitochondrial disease associated with complex I (NADH-CoQ oxidoreductase) deficiency, *J. Inher. Metab. Dis.* 38 (3) (2015) 405–415.
- [16] J. Zhang, P. Jiang, X. Jin, X. Liu, M. Zhang, S. Xie, M. Gao, S. Zhang, Y.H. Sun, J. Zhu, et al., Leber's hereditary optic neuropathy caused by the homoplasmic ND1 m.3635G>A mutation in nine Han Chinese families, *Mitochondrion* 18 (2014) 18–26.
- [17] X. Zhou, Y. Qian, J. Zhang, Y. Tong, P. Jiang, M. Liang, X. Dai, H. Zhou, F. Zhao, Y. Ji, et al., Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the T3866C mutation in mitochondrial ND1 gene in three Han Chinese families, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (8) (2012) 4586–4594.
- [18] Y. Ji, M. Liang, J. Zhang, L. Zhu, Z. Zhang, R. Fu, X. Liu, M. Zhang, Q. Fu, F. Zhao, et al., Mitochondrial ND1 variants in 1281 Chinese subjects with Leber's hereditary optic neuropathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (6) (2016) 2377–2389.
- [19] K. Huoponen, Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings, *Neurogenetics* 3 (3) (2001) 119–125.
- [20] S. Zhou, K. Kassaei, D.J. Cutler, G.C. Kennedy, D. Sidransky, A. Maitra, J. Califano, An oligonucleotide microarray for high-throughput sequencing of the mitochondrial genome, *J. Mol. Diagn.* 8 (4) (2006) 476–482.
- [21] C. Riera, S. Lois, X. Cruz, Prediction of pathological mutations in proteins: the challenge of integrating sequence conservation and structure stability principles, *WIREs Comput. Mol. Sci.* 4 (2014) 249–268.
- [22] J. Schymkowitz, J. Borg, F. Stricher, R. Nys, F. Rousseau, L. Serrano, The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue) (2005) W382–W388.
- [23] I. Adzhubei, D.M. Jordan, S.R. Sunyaev, Predicting functional effect of human missense mutations using polyphen-2, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* (vol. Chapter 7, 2013/01/15 edn: Unit7 20).
- [24] A. Chomyn, Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells, *Methods Enzymol.* 264 (1996) 334–339.
- [25] A.L. Andreu, R. Martínez, R. Martí, E. Garcia-Arumi, Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors, *Mitochondrion* 9 (4) (2009) 242–246.
- [26] F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, A. Lombs, Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis, *Mitochondrion* 9 (5) (2009) 331–339.
- [27] S.A. Hollingsworth, P.A. Karplus, A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins, *Biomol. Concepts* 1 (3–4) 271–283.
- [28] E. Ruiz-Pesini, M.T. Lott, V. Procaccio, J.C. Poole, M.C. Brandon, D. Mishmar, C. Yi, J. Kreuziger, P. Baldi, D.C. Wallace, An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny, *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue) (2007) D823–D828.
- [29] M.T. Lott, J.N. Leipzig, O. Derbeneva, H.M. Xie, D. Chalkia, M. Sarmady, V. Procaccio, D.C. Wallace, mtDNA variation and analysis using mitomap and mitomaster, in: A.D. Baxevasis, et al., (Eds.), *Current Protocols in Bioinformatics/Editorial Board* 2013, pp. 21–26 44:1 23.
- [30] J. Yang, Y. Zhu, Y. Tong, L. Chen, L. Liu, Z. Zhang, X. Wang, D. Huang, W. Qiu, S. Zhuang, et al., Confirmation of the mitochondrial ND1 gene mutation G3635A as a primary LHON mutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386 (1) (2009) 50–54.
- [31] X. Jia, S. Li, P. Wang, X. Guo, Q. Zhang, mtDNA m.3635G>A may be classified as a common primary mutation for Leber hereditary optic neuropathy in the Chinese population, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403 (2) 237–241.
- [32] M.D. Brown, S. Zhadanov, J.C. Allen, S. Hosseini, N.J. Newman, V.V. Atamonov, I.E. Mikhailovskaya, R.L. Sukernik, D.C. Wallace, Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families, *Hum. Genet.* 109 (1) (2001) 33–39.
- [33] M.Y. Yen, C.S. Chen, A.G. Wang, Y.H. Wei, Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation, *Br. J. Ophthalmol.* 86 (9) (2002) 1027–1030.