

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Tesi doctoral

Eficàcia i seguretat gènica dels desoxiribonucleòsids com a tractament dels trastorns del manteniment de l'ADN mitocondrial

Javier Francisco Ramón Pasías

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Treball realitzat al laboratori de patologia neuromuscular i mitocondrial de
l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

Directors

Dr. Ramon Martí Seves

Dra. Yolanda Cámara Navarro

Tutor

Dr. Miquel Vila Bover

Universitat Autònoma de Barcelona

2024

AGRAÏMENTS

Ja quasi fa 6 anys que vaig començar al laboratori de patologia neuromuscular i mitocondrial i 4 anys que em vaig matricular en el programa de doctorat. Que ràpid passa el temps!!! I si un es troba a gust, encara més. Durant aquests anys he compartit moments amb moltes persones, tant a dins com a fora del laboratori i ara, us vull donar les gràcies a tots.

En primer lloc, voldria agrair als meus dos directors de tesi Ramon i Yolanda. Res de tot això hauria estat possible sense vosaltres. Moltes gràcies Ramon per no queixar-te quan et vaig fer caminar 46.000 passos per Nova York, però sobretot, per tot el coneixement que m'has transmès, per la confiança dipositada en mi, per tenir-me en compte sempre que sortien nous projectes, per valorar la meva feina i per estar sempre disponible. Moltes gràcies Yolanda per tot el que he après de tu, per les hores a la càmera freda, per les llargues estones a l'estabulari, per valorar la meva feina i per trobar el costat positiu a cada resultat, per molt negatiu que fos. També voldria mencionar a tots els companys del laboratori de patologia neuromuscular i mitocondrial, perquè tots, d'alguna manera han aportat alguna cosa en aquesta tesi: Elena, Tomàs, Javi, Maria Jesús, Lúdia, Guillem, Cora, Ferran, David, Alberto, Antoni, Miguel, Mónica, Andrea, Pau, Bernat, Izaskun i Juan.

Voldria agrair també l'ajuda rebuda per part del mòdul de genètica, que han contribuït en gran part en aquesta tesi. Moltes gràcies Jordi i Elena pel suport en les anàlisis dels resultats i també a la Maria, Cris, Desi i David per la part tècnica. També volia agrair el suport que he rebut des de l'estabulari per part de la Cris, Eva i Raquel.

Moltes gràcies, també, a la gent de fora del laboratori, que sé que sempre hi són allà. En primer lloc a la meva família: els meus pares, Javier i Gloria, el meu tato Marcos i la meva cunyada, Alba. Gracias por apoyarme y por haber creído siempre en mí. Gracias tía Pilar y Paquita por acogerme cuando llegué a Barcelona. Moltes gràcies també a la família que un escull: els amics. Moltes gràcies Putis (Xu, Oriol, Jenny, Ale, Anna, Arantxa, Rodri, Andrea, Sergi, Dídac, Morell) i allegados (Sandra, Miquel, Adri, Pol, María, Marc) pels grans moments viscuts i pels que ens queden. Muchas gracias Alison y Lucas por las comidas hasta las 10 de la noche y muchas gracias al sevillano más viajero, Pablo.

MOLTES GRÀCIES A TOTS

RESUM

Les síndromes de depleció i deleccions múltiples de l'ADN mitocondrial (ADNmt) (MDDS) són malalties caracteritzades pel manteniment incorrecte de l'ADNmt que resulta en alteracions quantitatives (depleció) i/o qualitatives (deleccions múltiples i mutacions puntuals) de l'ADNmt. Aquestes síndromes són malalties minoritàries amb presentació clínica heterogènia, que inclou quadres moderats en pacients adults o presentacions molt greus en edats pediàtriques.

Les MDDS estan causades per mutacions en gens nuclears que codifiquen proteïnes que participen en el manteniment de l'ADNmt a través de diferents mecanismes: (I) a través de la maquinària de replicació de l'ADNmt, (II) a través del metabolisme dels desoxiribonucleòsids trifosfat (dNTPs), (III) a través de la regulació de la dinàmica mitocondrial o (IV) a través d'un mecanisme desconegut.

Els desoxiribonucleòsids (dNs) van ser proposats com a tractament per una de les formes de MDDS, la miopatia per dèficit de TK2 (enzim que participa en l'anabolisme dels dNTPs). Aquesta aproximació va mostrar eficàcia en models murins de la malaltia, en una cohort de pacients i, actualment, es troba en fase d'assaig clínic. Posteriorment, estudis *in vitro* han mostrat que els dNs també estimulen la replicació de l'ADNmt en cèl·lules amb mutacions en *POLG* (ADN polimerasa mitocondrial) i en *MPV17* (que participa en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut). Aquests resultats semblen indicar que el mecanisme terapèutic dels dNs implica un increment en les quantitats de dNTPs que estimula la replicació de l'ADNmt. Per aquest motiu, els dNs es podrien estendre a MDDS no causades per alteracions en el metabolisme de dNTPs.

Aquesta tesi consta de 3 blocs diferenciats. En el primer bloc s'ha avaluat l'eficàcia dels dNs per a algunes formes de MDDS *in vitro* i *in vivo*. Els estudis *in vitro* s'han fet administrant dNs a fibroblasts en cultiu de pacients amb mutacions en 10 gens associats a MDDS, la majoria d'ells no relacionats amb el metabolisme de dNTPs. Els resultats han revelat que els dNs estimulen la replicació de l'ADNmt en gairebé tots els casos on hi ha depleció de l'ADNmt *in vitro*. Per tant, el seu ús es podria estendre a MDDS no relacionades amb el metabolisme de dNTPs. Els estudis *in vivo* s'han fet administrant dNs a ratolins *Dguok*^{-/-}, un altre gen associat

a MDDS que participa en el metabolisme de dNTPs. Aquests estudis han mostrat absència d'efecte terapèutic, potser degut a la baixa biodisponibilitat dels dNs purínics i/o manca de la seva fosforilació.

Donat que les alteracions en les concentracions de dNTPs causades pels dNs són potencialment genotòxiques, en el segon bloc de la tesi s'ha estudiat la seguretat gènica del tractament analitzant la integritat i fidelitat de còpia de l'ADNmt (presència de delecions i mutacions puntuals) mitjançant PCR llarga i seqüenciació massiva. S'han analitzat mostres d'ADN obtingudes en els experiments d'eficàcia *in vitro*, teixits de ratolins *Dguok*^{-/-} i *Tk2*^{-/-} on s'havia testat l'eficàcia *in vivo* i sang de pacients amb dèficit de TK2 sotmesos al tractament amb dNs durant mesos o anys. En aquest darrer cas, també s'ha analitzat la mutagènesi utilitzant un panell de gens nuclears. Tots aquests estudis han mostrat absència de genotoxicitat del tractament.

Finalment, en el tercer bloc de la tesi, s'ha estudiat el rol del transportador equilibratiu de nucleòsids ENT1 sobre l'efecte terapèutic dels dNs en el context del dèficit de TK2. Aquests estudis, realitzats en ratolins *Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}, han revelat que ENT1 és un mediador necessari per l'efecte terapèutic dels dNs en aquesta malaltia associat a l'entrada de dNs en el cervell dels ratolins. Aquests resultats obren la porta a modular l'activitat del transportador per millorar l'eficàcia dels dNs.

RESUMEN

Los síndromes de depleción y deleciones múltiples del ADN mitocondrial (ADNmt) (MDDS) son enfermedades caracterizadas por el mantenimiento incorrecto del ADNmt que resulta en alteraciones cuantitativas (depleción) y/o cualitativas (deleciones múltiples y mutaciones puntuales) del ADNmt. Estos síndromes son enfermedades minoritarias con presentación clínica heterogénea, con cuadros moderados en pacientes adultos o presentaciones graves en niños.

Los MDDS están causados por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas que participan en el mantenimiento del ADNmt por diferentes mecanismos: (I) a través de la maquinaria de replicación del ADNmt, (II) a través del metabolismo de los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), (III) a través de la regulación de la dinámica mitocondrial o (IV) a través de un mecanismo desconocido.

Los desoxirribonucleósidos (dNs) se propusieron como tratamiento para un tipo de MDDS, el déficit de TK2 (enzima que participa en el anabolismo de los dNTPs). Esta aproximación mostró eficacia en modelos murinos de la enfermedad, en una cohorte de pacientes y actualmente se encuentra en fase de ensayo clínico. Posteriormente, estudios *in vitro* han mostrado que los dNs también estimulan la replicación del ADNmt en células con mutaciones en *POLG* (ADN polimerasa mitocondrial) y en *MPV17* (que participa en el mantenimiento del ADNmt a través de un mecanismo desconocido). Estos resultados parecen indicar que el mecanismo terapéutico de los dNs implica un incremento en las cantidades de dNTPs que estimula la replicación del ADNmt. Por este motivo, los dNs podrían extenderse a otros MDDS no causados por alteraciones en el metabolismo de dNTPs.

Esta tesis consta de 3 bloques. En el primer bloque se ha evaluado la eficacia de los dNs para algunos MDDS *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* se han realizado administrando dNs a fibroblastos en cultivo de pacientes con mutaciones en 10 genes asociados a MDDS, la mayoría de ellos, no relacionados con el metabolismo de dNTPs. Los resultados han revelado que los dNs estimulan la replicación del ADNmt en casi todos los casos donde existe depleción *in vitro*. Por tanto, su uso podría extenderse a MDDS no relacionados con el metabolismo de dNTPs. Los estudios *in vivo* se han realizado administrando dNs en ratones

Dguok^{-/-}, otro gen asociado a MDDS que participa en el metabolismo de dNTPs. Estos estudios han mostrado ausencia de efecto terapéutico, quizás debido a la baja biodisponibilidad de los dNs purínicos y/o falta de su fosforilación.

Dado que las alteraciones en las concentraciones de dNTPs causadas por los dNs son potencialmente genotóxicas, en el segundo bloque de la tesis se ha estudiado la seguridad génica del tratamiento analizando la integridad y fidelidad de copia del ADNmt (presencia de deleciones y mutaciones puntuales) mediante PCR larga y secuenciación masiva. Se han analizado muestras de ADN obtenidas en los experimentos de eficacia *in vitro*, tejidos de ratones *Dguok*^{-/-} y *Tk2*^{-/-} donde se había testado la eficacia *in vivo* y sangre de pacientes con déficit de TK2 tratados con dNs durante meses o años. En este último caso, también se ha analizado la mutagénesis utilizando un panel de genes nucleares. Todos estos estudios han mostrado ausencia de genotoxicidad del tratamiento.

En el tercer bloque de la tesis, se ha estudiado el rol del transportador equilibrativo de nucleósidos ENT1 sobre el efecto terapéutico de los dNs en el contexto del déficit de TK2. Estos estudios, realizados en ratones *Tk2*^{-/-} y *Ent1*^{-/-}, han revelado que ENT1 es necesario para el efecto terapéutico de los dNs en esta enfermedad y que participa en la entrada de dNs en el cerebro de los ratones. Estos resultados abren la puerta a modular su actividad para mejorar la eficacia de los dNs.

ABSTRACT

Mitochondrial DNA (mtDNA) depletion and multiple deletions syndromes (MDDS) are diseases characterized by incorrect maintenance of mtDNA resulting in quantitative (depletion) and/or qualitative (multiple deletions and point mutations) alterations of mtDNA. These syndromes are rare diseases with heterogeneous clinical presentations, ranging from moderate symptoms in adult patients to severe manifestations in children.

MDDS are caused by mutations in nuclear genes that encode proteins that participate in the maintenance of mtDNA through different mechanisms: (I) through the mtDNA replication machinery, (II) through deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) metabolism, (III) through regulation of mitochondrial dynamics or (IV) through an unknown mechanism.

Deoxyribonucleoside (dN) supplementation was proposed as a treatment for a type of MDDS, the myopathy due to TK2 deficiency (an enzyme that participates in dNTP anabolism). This approach showed efficacy in murine models of the disease, in a cohort of patients, and is currently under clinical trial. Subsequently, *in vitro* studies have shown that dNs also stimulate mtDNA replication in cells with mutations in *POLG* (mitochondrial DNA polymerase) and in *MPV17* (which participates in mtDNA maintenance through an unknown mechanism). These results seem to indicate that the therapeutic mechanism of dNs involves a dNTP expansion that stimulate mtDNA replication. For this reason, dNs can be extended to MDDS not caused by alterations in dNTP metabolism.

This thesis has 3 working blocks. In the first block, the efficacy of dNs for some MDDS has been evaluated *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies have been carried out by administering dNs to patient-derived fibroblasts with mutations in 10 genes associated to MDDS, most of them not involved in the metabolism of dNTPs. The results have revealed that dNs stimulate mtDNA replication in almost all cases when there is *in vitro* mtDNA depletion. Therefore, dNs could be extended to MDDS not related to dNTP metabolism. *In vivo* studies have been carried out by administering dNs to mice lacking *Dguok* (*Dguok*^{-/-}), another gene associated with MDDS that participates in the metabolism of dNTPs. These studies have shown absence of therapeutic effect, probably due to the low bioavailability of purine dNs and/or lack of their phosphorylation.

Given that alterations in dNTP concentrations caused by dNs are potentially genotoxic, in the second block of the thesis the genetic safety of the treatment has been studied by analysing the integrity and replication fidelity of the mtDNA (presence of deletions and point mutations) using long PCR and next generation sequencing. The DNA samples used for these analyses were obtained from different sources: (I) from the *in vitro* efficacy studies, (II) from tissues of *Dguok*^{-/-} and *Tk2*^{-/-} mice tested for *in vivo* dN efficacy and (III) from blood of patients with TK2 deficiency treated with dNs during months or years. Moreover, nuclear DNA was studied in blood from TK2 deficient patients under treatment using a sequencing panel. All these studies have shown absence of genotoxicity caused by dN treatment.

Finally, in the third block of the thesis, the role of the equilibrative nucleoside transporter ENT1 in the therapeutic effect of dNs in the context of TK2 deficiency has been studied. These studies, performed in *Tk2*^{-/-} and *Ent1*^{-/-} mice, have revealed that ENT1 is necessary for the therapeutic effect of dNs in this disease and it has a role importing dNs into the mouse brain. These results open the door to modulate the activity of this transporter to improve dNs efficacy.

ÍNDEx

1. ABREVIACIONS	17
2. INTRODUCCIÓ	25
2.1. El mitocondri	27
2.1.1. CTE i sistema OXPHOS	28
2.1.2. L'ADNmt	29
2.1.2.1. Heteroplàsmia i homoplàsmia	32
2.1.2.2. Replicació de l'ADNmt	33
2.1.2.3. Reparació de l'ADNmt	35
2.2. Metabolisme de dNTPs	36
2.2.1. Anabolisme dels dNTPs	36
2.2.1.1. Anabolisme de dNTPs per la via <i>de novo</i>	36
2.2.1.2. Anabolisme de dNTPs per la via de salvament	37
2.2.2. Catabolisme dels dNTPs	38
2.2.3. Transport de dNTPs	39
2.2.4. Transport de dNs	41
2.2.4.1. ENT1	42
2.2.5. Manteniment dels <i>pools</i> de dNTPs	44
2.3. Malalties mitocondrials	46
2.3.1. Malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNmt	47
2.3.2. Malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNn	49
2.4. Síndromes de depleció i deleccions múltiples de l'ADNmt (MDDS)	50
2.4.1. Gens implicats en la maquinària de replicació de l'ADNmt	51
2.4.2. Gens implicats en el metabolisme de dNTPs	54
2.4.3. Gens implicats en la dinàmica mitocondrial	57
2.4.4. Gens implicats en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut	58
2.4.5. Models experimentals de MDDS	63
2.4.5.1. Models <i>in vitro</i>	64

2.4.5.2. Models <i>in vivo</i>	65
2.4.5.2.1. Ratolí KO per <i>Tk2</i>	66
2.4.5.2.2. Ratolí KO per <i>Dguok</i>	69
2.4.6. Tractament de les MDDS.....	70
2.4.6.1. Tractament amb dNs de MDDS relacionades amb el metabolisme de dNTPs	72
2.4.6.2. Tractament amb dNs de MDDS no relacionades amb el metabolisme de dNTPs	75
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	79
3.1. Hipòtesis	81
3.2. Objectius	82
4. MATERIAL I MÈTODES	83
4.1. Dissenys experimentals	85
4.1.1. Estudis d'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs en cultiu cel·lular ..	85
4.1.1.1. Model de depleció induïda de l'ADNmt amb BrEt	88
4.1.1.2. Model de depleció espontània de l'ADNmt	91
4.1.1.3. Estabilitat dels dNs en el medi de cultiu	92
4.1.2. Estudi de la seguretat gènica del tractament amb dNs en el model de ratolí KO per <i>Tk2</i>	93
4.1.3. Estudi de l'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs en el model de ratolí KO per <i>Dguok</i>	94
4.1.4. Estudis de seguretat gènica del tractament amb dNs en sang de pacients amb dèficit de TK2.....	96
4.1.4.1. Estudi de l'ADNmt	96
4.1.4.2. Estudi de l'ADNn	96
4.1.5. Estudis de la implicació del transportador de nucleòsids ENT1 en l'eficàcia dels dNs	98
4.1.5.1. Estudis de supervivència	98
4.1.5.2. Estudis farmacocinètics i de biodistribució	98
4.1.5.3. Estudi del nombre de còpies de l'ADNmt	100
4.2. Metodologia	100
4.2.1. Cultiu cel·lular.....	100

4.2.1.1. Línies cel·lulars	100
4.2.1.2. Condicions generals de cultiu, plaques i medis de cultiu	100
4.2.1.3. Recol·lecció de cèl·lules	101
4.2.1.4. Obtenció de <i>pellets</i> cel·lulars per anàlisis bioquímiques.....	102
4.2.1.5. Criopreservació de línies cel·lulars	102
4.2.1.5.1. Congelació de línies cel·lulars	102
4.2.1.5.2. Descongelació de línies cel·lulars.....	102
4.2.1.6. Dilució de densitat en la placa de cultiu	103
4.2.1.7. Comptatge i sembrat cel·lular	103
4.2.2. Experimentació animal	104
4.2.2.1. Models de ratolins i condicions d'estabulació	104
4.2.2.2. Genotipatge dels ratolins	105
4.2.2.3. Obtenció i processament de mostres de sang i òrgans.....	107
4.2.3. Extracció d'ADN	108
4.2.3.1. A partir de cèl·lules en cultiu.....	108
4.2.3.2. A partir de teixits de ratolí.....	108
4.2.3.2.1. Per genotipar	108
4.2.3.2.2. Per estudis bioquímics	109
4.2.3.3. A partir de sang de pacients amb mutacions en <i>TK2</i>	109
4.2.4. Quantificació d'ADN	109
4.2.5. Quantificació de proteïnes	110
4.2.6. Electroforesi.....	111
4.2.7. PCR quantitativa (qPCR).....	111
4.2.7.1. Preparació de les mostres	114
4.2.7.2. Preparació dels estàndards	114
4.2.7.3. Preparació de la mescla de reacció i de la placa	115
4.2.7.4. Controls de qualitat i de precisió del mètode	117
4.2.8. Anàlisi de presència de deleccions múltiples mitjançant PCR llarga	117
4.2.9. Seqüenciació d'alta profunditat	119
4.2.9.1. Preparació de les llibreries per a la seqüenciació de l'ADNmt	121

4.2.9.2. Preparació de les llibreries per a la seqüenciació de l'ADNn	123
4.2.9.3. Generació de clústers.....	126
4.2.9.4. Seqüenciació	128
4.2.9.5. Anàlisi de dades	129
4.2.10. Determinació de nucleòsids i dels seus catabòlits per HPLC-MS/MS	130
4.2.10.1. Processament de mostres de medi de cultiu	132
4.2.10.2. Processament de mostres de plasma	132
4.2.10.3. Processament de mostres d'òrgans.....	132
4.2.10.4. Injecció de les mostres per l'anàlisi mitjançant HPLC-MS/MS.....	133
4.2.11. Determinació de dNTPs en extractes enriquits en mitocondris.....	135
4.2.11.1. Obtenció de mitocondris aïllats d'òrgans	135
4.2.11.2. Extracció de dNTPs amb desproteïnització àcida amb àcid tricloroacètic..	137
4.2.11.3. Extracció de dNTPs amb desproteïnització orgànica amb metanol.....	137
4.2.11.4. Determinació enzimàtica de dNTPs	138
4.2.11.4.1. Preparació de les mostres i estàndards.....	138
4.2.11.4.2. Anellament dels oligonucleòtids i immobilització en la placa	138
4.2.11.4.3. Reacció d'extensió	139
4.2.11.4.4. Controls de qualitat i de precisió del mètode	142
4.2.12. Anàlisis estadístiques	142
5. RESULTATS.....	145
5.1. Eficàcia del tractament amb dNs.....	147
5.1.1. Eficàcia del tractament amb dNs en models <i>in vitro</i>	147
5.1.1.1. Determinació de les concentracions de dNs en medi de cultiu	147
5.1.1.2. Model de depleció induïda de l'ADNmt amb BrEt	150
5.1.1.2.1. Cèl·lules de controls sans.....	150
5.1.1.2.2. Cèl·lules amb mutacions en <i>TWINK</i>	151
5.1.1.2.3. Cèl·lules amb mutacions en <i>DNA2</i>	152
5.1.1.2.4. Cèl·lules amb mutacions en <i>RNASEH1</i>	153
5.1.1.2.5. Cèl·lules amb mutacions en <i>RRM2B</i>	154
5.1.1.2.6. Cèl·lules amb mutacions en <i>OPA1</i>	154

5.1.1.2.7. Cèl·lules amb mutacions en <i>SPG7</i>	156
5.1.1.2.8. Cèl·lules amb mutacions en <i>MPV17</i>	156
5.1.1.2.9. Cèl·lules amb mutacions en <i>SUCLA2</i>	157
5.1.1.2.10. Cèl·lules amb mutacions en <i>SUCLG1</i>	158
5.1.1.3. Model de depleció espontània de l'ADNmt	160
5.1.1.3.1. Cèl·lules de controls sans	160
5.1.1.3.2. Cèl·lules amb mutacions en <i>DGUOK</i>	160
5.1.1.3.3. Cèl·lules amb mutacions en <i>MPV17</i>	161
5.1.1.3.4. Cèl·lules amb mutacions en <i>SUCLG1</i>	162
5.1.2. Eficàcia del tractament amb dNs en el model de ratolí <i>Dguok</i> ^{-/-}	164
5.1.2.1. Nombre de còpies d'ADNmt	164
5.1.2.2. Concentracions dels dNs en plasma	166
5.1.2.3. Contingut dels dNs en fetge	168
5.1.2.4. Contingut mitocondrial dels dNTPs en fetge	170
5.1.2.5. Contingut mitocondrial dels dNTPs en cervell	171
5.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs	173
5.2.1. Seguretat gènica del tractament amb dNs en els models <i>in vitro</i>	173
5.2.1.1. Model de depleció amb BrEt	175
5.2.1.2. Model de depleció espontània	179
5.2.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs <i>in vivo</i> estudiada en models de ratolí	181
5.2.2.1. Model de ratolí KO per <i>Tk2</i>	181
5.2.2.2. Model de ratolí KO per <i>Dguok</i>	191
5.2.3. Seguretat gènica del tractament amb dNs estudiada en sang de pacients amb dèficit de TK2	202
5.2.3.1. Estudi de l'ADNmt	202
5.2.3.2. Estudi de l'ADNn	205
5.3. Implicació dels transportadors de nucleòsids en l'efecte terapèutic dels dNs de pirimidina	217
5.3.1. Estudis de supervivència	217
5.3.2. Estudis farmacocinètics	222

5.3.3. Contingut de dNs en diferents òrgans en ratolins de 8 – 12 setmanes.....	224
5.3.3.1. Concentracions de dNs en plasma	224
5.3.3.2. Contingut de dNs en fetge	226
5.3.3.3. Contingut de dNs en múscul esquelètic.....	228
5.3.3.4. Contingut de dNs en cervell	229
5.3.4. Contingut de dNs en diferents òrgans en ratolins de 12 dies d'edat	231
5.3.4.1. Concentracions de dNs en plasma	231
5.3.4.2. Contingut de dNs en fetge	234
5.3.4.3. Contingut de dNs en múscul esquelètic.....	236
5.3.4.4. Contingut de dNs en cervell	238
5.3.5. Contingut de ribonucleòsids (rNs) en diferents òrgans en ratolins de 12 dies d'edat	240
5.3.6. Estudi del nombre de còpies d'ADNmt	243
5.3.6.1. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 12 dies d'edat.....	243
5.3.6.2. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 5 dies d'edat.....	245
6. DISCUSSIÓ	247
6.1. Eficàcia dels dNs per al tractament de MDDS	251
6.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs.....	263
6.3. Paper d'ENT1 en el fenotip del dèficit de TK2 i la resposta al tractament amb dNs	269
7. CONCLUSIONS	279
8. BIBLIOGRAFIA.....	283
9. FIGURES SUPLEMENTÀRIES	315

1. ABREVIACIONES

ABAT	Gamma aminobutirat transaminasa
ADA	Adenosina desaminasa
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfat
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosina monofosfat
ARNm	ARN missatge
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferència
AST	Aspartat aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfat
BER	De l'anglès, <i>Base Excision repair</i> , reparació per excisió de base
BrEt	Bromur d'etidi
CDA	Citidina desaminasa
CDP	Citidina difosfat
CGH	De l'anglès, <i>comparative genomic hybridisation</i> , hibridació genòmica comparativa
CMP	Citidina monofosfat
CNT	De l'anglès, <i>concentrative nucleoside transporter</i> , transportador concentratiu de nucleòsids
Ct	De l'anglès, <i>cycle threshold</i> , cicle llindar
Ctd	Citidina
CTE	Cadena de transport d'electrons
dAdo	Desoxiadenosina
dADP	Desoxiadenosina difosfat
dATP	Desoxiadenosina trifosfat
dCDP	Desoxicitidina difosfat
dCK	Desoxicitidina kinasa
dCtd	Desoxicitidina

dCTP	Desoxicitidina trifosfat
dGDP	Desoxiguanosina difosfat
dGK	Desoxiguanosina kinasa
dGMP	Desoxiguanosina monofosfat
dGTP	Desoxiguanosina trifosfat
dGuo	Desoxiguanosina
dIno	Desoxiinosina
DMEM	De l'anglès, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNDP	Desoxiribonucleòsid difosfat
dNK	Desoxinucleòsid kinasa
dNMP	Desoxiribonucleòsid monofosfat
dN	Desoxiribonucleòsid
dNTP	Desoxiribonucleòsid trifosfat
dTDP	Desoxitimidina difosfat
dThd	Desoxitimidina o timidina
dTMP	Desoxitimidina monofosfat
dTTP	Desoxitimidina trifosfat
dUDP	Desoxiuridina difosfat
dUMP	Desoxiuridina monofosfat
dUrd	Desoxiuridina
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina
ENT	De l'anglès, <i>equilibrative nucleoside transporter</i> , transportador equilibratiu de nucleòsids
ESI	De l'anglès, <i>electrospray ionization</i> , ionització per electrospray
eV	Electronvolt
FBS	De l'anglès, <i>fetal bovine serum</i> , sèrum fetal boví
FBSd	Sèrum fetal boví dialitzat
GABA	Àcid gamma aminobutíric
GDA	Guanina desaminasa

GDP	Guanosina difosfat
GMP	Guanosina monofosfat
Guo	Guanosina
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a detecció per espectrometria de masses en tàndem
HSP	De l'anglès <i>heavy-strand promoter</i> , promotor de la cadena pesant
KI	De l'anglès, <i>knock-in</i>
KO	De l'anglès, <i>knock-out</i>
KSS	De l'anglès, <i>Kearns Sayre Syndrome</i> , síndrome de Kearns Sayre
LHON	De l'anglès, <i>Leber hereditary optic neuropathy</i> , neuropatia òptica hereditària de Leber
LSP	De l'anglès <i>light-strand promoter</i> , promotor de la cadena lleugera
MDDS	De l'anglès, <i>mitochondrial depletion and multiple deletions syndromes</i> , síndromes de depleció i delecions múltiples de l'ADNmt
MELAS	De l'anglès, <i>mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes</i> , encefalomiopatia mitocondrial, acidosi làctica i episodis semblants a ictus
MERFF	De l'anglès, <i>myoclonic epilepsy with ragged red fibers</i> , epilèpsia mioclònica amb fibres roges trencades
MTHF	Metilè tetrahidrofolat
NARP	De l'anglès, <i>neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa</i> , neuropatia, atàxia i retinitis pigmentosa
NDPK	Kinases de nucleòsid difosfat
NGS	De l'anglès, <i>next generation sequencing</i> , seqüenciació d'última generació
NMPK	Kinases de nucleòsid monofosfat
Ori _H	Origen de replicació de la cadena pesant
Ori _L	Origen de replicació de la cadena lleugera
OXPHOS	Fosforilació oxidativa
pb	Parells de bases
PBS	Tampó fosfat salí

PEO	De l'anglès, <i>progressive external oftalmoplegia</i> , oftalmoplegia externa progressiva
PNP	Purina nucleòsid fosforilasa
POLG	Polimerasa gamma
PRPP	Fosforibosil pirofosfat
qPCR	PCR quantitativa
RITOLS	De l'anglès, <i>ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand</i> , incorporació de ribonucleòtids en la cadena retardada
RNR	Ribonucleòtid reductasa
rN	Ribonucleòsid
ROS	De l'anglès, <i>reactive oxygen species</i> , espècies reactives de l'oxigen
SCS	Succinil CoA sintetasa
SI	Estàndard intern
SNHL	De l'anglès, <i>sensorineural hearing loss</i> , pèrdua neurosensorial de l'oïda
TBE	Tampó tris – borat – EDTA
TCA	Àcid tricloroacètic
Thy	Timina
TK1	Timidina kinasa 1
TK2	Timidina kinasa 2
TMPK	Timidina monofosfat kinasa
TOA	Tri-n-octilamina
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilat sintetasa
UDI	De l'anglès, <i>unique dual index</i>
UDP	Uridina difosfat
UMI	De l'anglès, <i>unique molecular index</i>
UMP	Uridina monofosfat
UNG	Uracil-ADN N-glicosilasa
Urd	Uridina
V	Volts
WT	De l'anglès, <i>wild type</i> , silvestre

XDH	Xantina deshidrogenasa
-----	------------------------

2. INTRODUCCIÓ

2.1. El mitocondri

Els mitocondris són orgànuls localitzats en el citosol de totes les cèl·lules eucariotes (excepte eritròcits) que es van originar per endosimbiosi entre una cèl·lula eucariota i un α -proteobacteri¹. La principal funció dels mitocondris és l'obtenció d'energia en forma d'ATP gràcies a la cadena de transport d'electrons (CTE) i la fosforilació oxidativa (OXPHOS)². A part de l'obtenció de l'energia necessària per al funcionament de la cèl·lula, els mitocondris també juguen un paper en altres processos com són la generació i neutralització d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), l'apoptosi, el metabolisme del calci, la síntesi de vitamines, la síntesi del grup hemo o de grups ferro-sofre i el metabolisme de lípids^{3,4,5,6}.

Els mitocondris presenten una membrana externa, un espai intermembrana i membrana interna que delimita la matriu mitocondrial. La membrana mitocondrial externa, formada per fosfolípids, és permeable a ions i molècules petites no carregades a través de porines, com és el *voltage-dependent anion channel* (VDAC). Molècules més grans, com són les proteïnes, travessen la membrana externa a través de transportadors específics. Com que aquesta membrana és més porosa, no hi ha diferència de potencial entre el citoplasma i l'espai intermembrana. La membrana mitocondrial interna, a part de tenir una composició lipídica i proteica diferent a la membrana externa, és molt impermeable i només la creuen ions i molècules a través de transportadors específics. Com a resultat, hi ha una diferència de potencial entre l'espai intermembrana i la matriu mitocondrial. Aquesta diferència de potencial és aprofitada pel complex V del sistema OXPHOS, localitzat en la membrana interna, per generar ATP (Secció 2.1.1). Amb l'objectiu d'incrementar la seva superfície i poder contenir més complexos de la CTE, la membrana mitocondrial interna crea invaginacions anomenades crestes mitocondrials. La matriu mitocondrial conté l'ADN mitocondrial (ADNmt) en múltiples còpies, a part de la maquinària de replicació i transcripció d'aquest, la maquinària de traducció i enzims anabòlics i catabòlics que participen en el cicle de Krebs, la β -oxidació d'àcids grassos o el metabolisme de nucleòtids, entre d'altres⁷.

Els mitocondris, en general, no es troben com a orgànuls aïllats en el citoplasma, sinó que es troben formant xarxes dinàmiques resultants de processos de fusió i fissió entre ells per donar resposta a les demandes energètiques o a l'estat metabòlic cel·lular⁸. La fusió

mitocondrial permet l'intercanvi de material entre diferents mitocondris, ja sigui proteïnes, metabòlits com nucleòtids o ADNmt i es creu que pot ser una resposta per a millorar la supervivència de la cèl·lula. La fissió mitocondrial s'ha associat a disfunció mitocondrial, encara que també és necessària per a la distribució dels mitocondris en la divisió cel·lular o per al moviment dels mitocondris dins de la cèl·lula en zones que els requereixin^{9,10}.

El mitocondri conté unes 1.500 proteïnes diferents¹¹, que ajuden a dur a terme totes les funcions d'aquest òrganul, però d'aquestes només 13 estan codificades per l'ADNmt (menys del 0,9% del total de proteïnes presents en el mitocondri). Això indica que el funcionament del mitocondri està regulat per dos genomes: l'ADN nuclear (ADNn), que té herència materna i paterna i l'ADNmt que té herència exclusivament materna¹². L'ADNmt només codifica els ARNr i els ARNt, necessaris per a la traducció dels 13 ARNm que provenen de l'ADNmt, mentre que la resta de factors de traducció, així com tots els factors que intervenen en la replicació, reparació i transcripció de l'ADNmt i la resta de funcions mitocondrials estan codificats en l'ADNn¹².

2.1.1. CTE i sistema OXPHOS

La CTE està formada per 4 complexos, el citocrom *c* i la ubiquinona o coenzim Q. La CTE conjuntament amb el complex V o ATP sintetasa constitueixen el sistema OXPHOS localitzat a la membrana mitocondrial interna. Aquest sistema, mitjançant fosforilació oxidativa, genera energia en forma d'ATP, que representa el 90% de l'ATP cel·lular, esdevenint la principal font d'energia¹³.

El sistema OXPHOS està constituït per 92 proteïnes diferents, de les quals 79 són codificades per l'ADNn, mentre que només 13 són codificades per l'ADNmt: el complex I (NADH deshidrogenasa) el formen 44 subunitats diferents (una d'elles per duplicat, de manera que el nombre total de subunitats és de 45), de les quals 7 són codificades per l'ADNmt. El complex II està format per 4 subunitats totes elles de codificació nuclear, el complex III (citocrom b) conté 11 subunitats de les quals 1 és codificada per l'ADNmt, el complex IV (citocrom c oxidasa) conté 14 subunitats de les quals 3 són codificades per l'ADNmt i el complex V (ATP sintetasa) conté 19 subunitats de les quals 2 són codificades per l'ADNmt^{12,14}.

En la CTE el NADH i FADH_2 generats en el cicle de Krebs a partir de la glucòlisi o la β -oxidació dels àcids grassos són oxidats pel complex I (en el cas del NADH) i II (en el cas del FADH_2), obtenint d'aquesta manera electrons que passen al coenzim Q, després al complex III i d'aquest al citocrom c i complex IV on són transferits a l'oxigen, que actua com a acceptor final d'electrons i es redueix a aigua. El transport d'electrons a través dels complexos I, III i IV és acoblat al transport de protons de la matriu mitocondrial cap a l'espai intermembrana. Com que la membrana mitocondrial interna és impermeable als protons, això genera un gradient electroquímic utilitzat pel complex V per sintetitzar ATP a partir d'ADP i fosfat inorgànic (P_i) acoblat al transport dels protons de l'espai intermembrana cap a la matriu mitocondrial a favor de gradient (Figura 2.1)¹⁵.

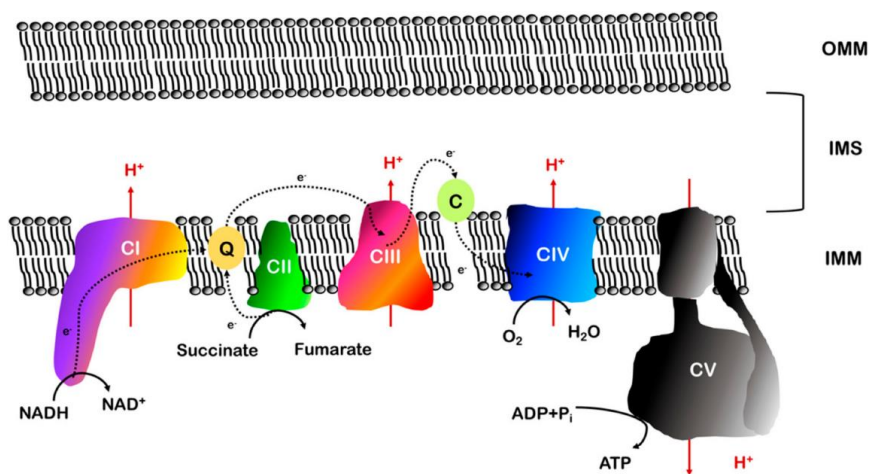


Figura 2.1. Representació del sistema OXPHOS. El sistema OXPHOS està localitzat a la membrana mitocondrial interna i conté la CTE (els quatre complexos (CI – CIV), el coenzim Q i el citocrom c) i l'ATP sintetasa (CV). Abreviacions: OMM: outer mitochondrial membrane (membrana mitocondrial externa), IMS: intermembrane space (espai intermembrana), IMM: inner mitochondrial membrane (membrana mitocondrial interna). Imatge obtinguda de ¹⁵.

2.1.2. L'ADNmt

Degut al seu origen endosimbiòtic, el mitocondri encara conserva ADN, que és conegut com a ADNmt. L'ADNmt és una molècula d'ADN circular de doble cadena amb una longitud de 16.569 parells de bases (pb) en humans i 16.299 pb en ratolins amb una densitat d'informació genètica molt alta, ja que codifica 37 gens en total, tots ells molt contigus i

sense introns, que es transcriuen de forma policistrònica^{16,17} i que en alguns casos es solapen parcialment, com és el cas del gen *MT-ATP8* i *MT-ATP6* i de *MT-ND4* i *MT-ND4L* (Figura 2.2).

Les dues cadenes d'ADN que formen l'ADNmt es diferencien en base al seu contingut de nucleòtids: es distingeixen una cadena pesant (*H-strand*) amb alt contingut en guanines i una cadena lleugera (*L-strand*) amb baix contingut en guanines. La cadena lleugera és la seqüència codificant per a la majoria de gens mitocondrials. Això vol dir que la cadena lleugera conté la seqüència d'ADN que és idèntica a l'ARNm (amb la substitució dels uracils per les timines) en la majoria de gens. Així doncs, la majoria de gens mitocondrials (28 gens) es transcriuen a partir de la cadena pesant i tenen com a seqüència codificant la cadena lleugera i 9 gens es transcriuen a partir de la cadena lleugera i tenen com a seqüència codificant la cadena pesant^{18,19}.

Dels 37 gens inclosos a l'ADNmt 2 codifiquen l'ARNr (12S i 16S), 13 codifiquen subunitats dels complexos I, III, IV i V del sistema OXPHOS i 22 codifiquen ARNt (un ARNt per cada un dels 20 aminoàcids excepte l'ARNt de la serina i leucina, que en tenen dos de diferents). A part de la seqüència codificant, que comprèn la majoria de la seqüència de l'ADNmt, hi ha molt poques regions no codificants que actuen com a reguladores sobre l'ADNmt. Una d'aquestes seqüències reguladores és el *displacement loop* (*D-loop*) que conté els promotors per a la transcripció de la cadena pesant (HSP) i lleugera (LSP) de l'ADNmt. El *D-loop*, com que és una seqüència reguladora, és més susceptible de patir mutacions que una regió codificant i presenta una alta variabilitat en la seva seqüència en les zones conegudes com a regions hipervariables²⁰, que determinen els haplogrups²¹. L'ADNmt presenta dues regions reguladores més que corresponen als orígens de replicació de la cadena pesant (*Ori_H*) localitzada en el *D loop* i lleugera (*Ori_L*) localitzada fora del *D loop* (Figura 2.2).

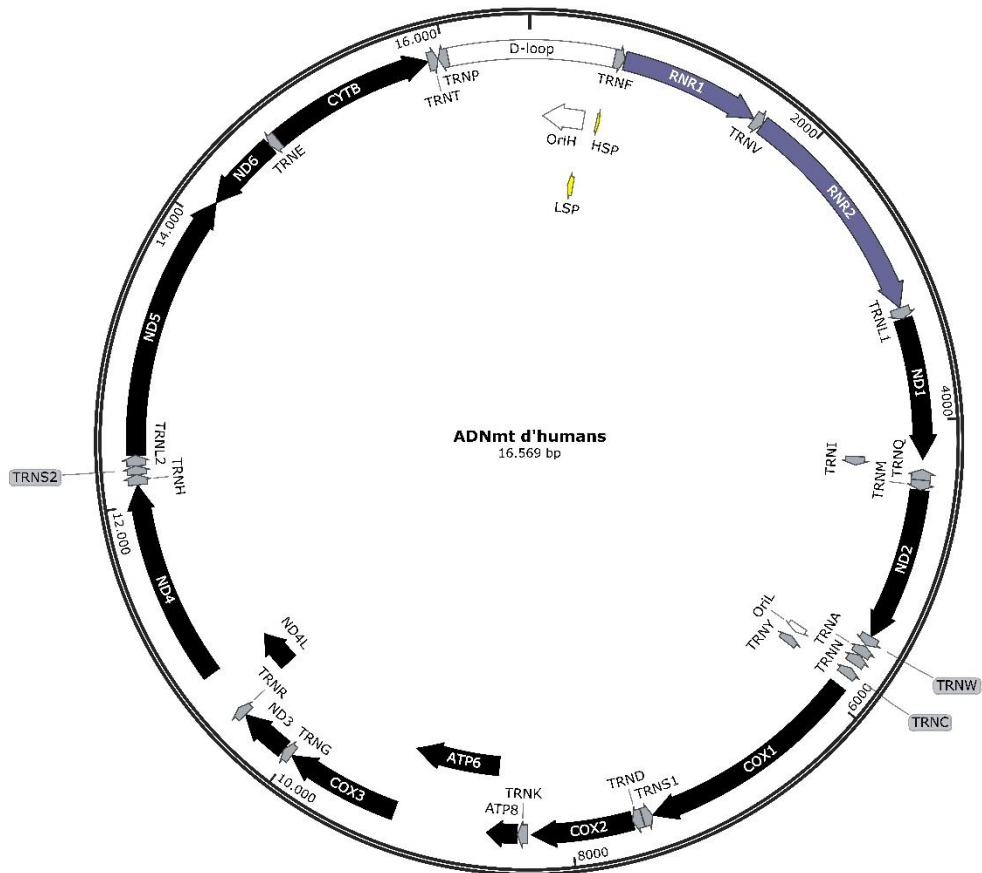


Figura 2.2. Genoma mitocondrial en humans. En blau estan marcats els 2 gens que codifiquen els ARNr, en negre estan marcats els 13 gens que codifiquen subunitats dels complexos OXPHOS i en gris estan marcats els 22 gens que codifiquen els ARNt. La direcció de la fletxa indica si el gen està codificat en la cadena pesant o lleugera: si la fletxa va en direcció de les agulles del rellotge el gen està codificat en la cadena pesant i si la fletxa va en direcció contrària a les agulles del rellotge el gen està codificat en la cadena lleugera. En blanc s'indiquen els orígens de replicació de la cadena pesant (Ori_H) i de la cadena lleugera (Ori_L). En groc s'indica el promotor de transcripció de la cadena pesant (HSP) o de la cadena lleugera (LSP). Abreviacions: TRNF: ARNt fenilalanina, RNR1: ARNr 12S, TRNV: ARNt valina, RNR2: ARNr 16S, TRNL1: ARNt leucina 1, ND1: NADH deshidrogenasa 1, TRNI: ARNt isoleucina, TRNQ: ARNt glutamina, TRNM: ARNt metionina, ND2: NADH deshidrogenasa 2, TRNW: ARNt triptòfan, TRNA: ARNt alanina, TRNN: ARNt asparagina, TRNC: ARNt cisteïna, TRNY: ARNt tirosina, COX1: citocrom c oxidasa I, TRNS1: ARNt serina 1, TRND: ARNt àcid aspàrtic, COX2: citocrom c oxidasa II, TRNK: ARNt lisina, ATP8: ATP sintetasa 8, ATP6: ATP sintetasa 6, COX3: citocrom C oxidasa III, TRNG: ARNt glicina, ND3: NADH deshidrogenasa 3, TRNR: ARNt arginina, ND4L: NADH deshidrogenasa 4L, ND4: NADH deshidrogenasa 4, TRNH: ARNt histidina, TRNS2: ARNt serina 2, TRNL2: ARNt leucina 2, ND5: NADH deshidrogenasa 5, ND6: NADH deshidrogenasa 6, TRNE: ARNt àcid glutàmic, CYTB: citocrom b, TRNT: ARNt treonina, TRNP: ARNt prolina. Imatge generada amb SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

L'ADNmt es localitza en la matriu mitocondrial i, a diferència de l'ADNn, no es troba associat a histones, sinó que forma part de nucleoides²². Els nucleoides són estructures ancorades a la membrana interna del mitocondri formades per ADNmt i proteïnes que participen tant en la transcripció com en la replicació i reparació d'aquest. El nombre de còpies d'ADNmt que hi ha en els nucleoides no està clar i depèn del tipus cel·lular i/o la tècnica utilitzada per a la seva quantificació^{23,24}. Algunes de les proteïnes presents en els nucleoides són TFAM, que és la proteïna majoritària d'aquestes estructures^{25,26}, Twinkle, POLG, POLG2 o mtSSB²⁷, totes elles intervenen en la replicació (Secció 2.1.2.2). Així doncs, els nucleoides es consideren estructures dinàmiques que controlen la transcripció, replicació i transmissió de l'ADNmt²⁸.

2.1.2.1. Heteroplàsmia i homoplàsmia

L'ADNmt es troba en múltiples còpies dins del mateix mitocondri²⁴ i el seu nombre de còpies és diferent segons el tipus cel·lular i segons les condicions fisiològiques²⁹, podent haver des d'unes 5 còpies per cèl·lula en l'espermatozoide³⁰ fins a 500.000 en l'òvul³¹. L'estat poliploide de l'ADNmt fa que la població d'aquest en el mitocondri no sigui totalment homogènia i hi hagin subpoblacions d'ADNmt amb mutacions en diferents posicions de la molècula d'ADN coexistent. Això introdueix el concepte d'heteroplàsmia, que indica la proporció de molècules d'ADNmt que tenen una mutació en una posició determinada respecte al total de molècules d'ADNmt (ja sigui del mitocondri, de la cèl·lula o d'un teixit determinat). Per exemple, si una mutació sobre l'ADNmt té un grau d'heteroplàsmia del 10% vol dir que el 10% del total de molècules d'ADNmt d'aquell mitocondri, cèl·lula o teixit tenen aquella mutació en concret. Per contra, poden haver posicions altament conservades que no estan mutades en tota la població d'ADNmt respecte a la seqüència de referència, o que totes les molècules d'ADNmt tenen aquella variant (el 100%) respecte la seqüència de referència. En ambdós casos la variant està present en totes les molècules d'ADNmt i, per tant, totes les molècules d'ADNmt són iguals per aquelles posicions. En aquests casos es parla d'una variant homoplàsmica.

El grau d'heteroplàsmia de les variant sobre l'ADNmt no és constant al llarg de la vida dels individus ni entre els diferents mitocondris, cèl·lules o òrgans. Els processos que poden provocar canvis en l'heteroplàsmia poden ser biaixos en la biogènesi o biaixos en la degradació d'una molècula d'ADNmt portadora d'una variant respecte a altres molècules

d'ADNmt³². L'efecte coll d'ampolla que es dona en el desenvolupament de cèl·lules somàtiques i durant la transmissió de l'ADNmt en la línia germinal materna³³, on unes poques molècules d'ADNmt es transmeten a les cèl·lules filles, també pot crear una transmissió esbiaixada de molècules d'ADNmt a les cèl·lules descendents induint canvis en l'heteroplàsmia de les variants sobre l'ADNmt. Aquest últim efecte també pot causar variacions en l'heteroplàsmia entre germans i teixits del mateix individu³⁴.

2.1.2.2. Replicació de l'ADNmt

La replicació de l'ADNmt es dona de forma independent al cicle cel·lular i, per tant, de forma independent a la replicació de l'ADNn i a la divisió cel·lular³⁵. A més, el procés de replicació de l'ADNmt està controlat en la seva totalitat per factors codificats en l'ADNn¹². El model més acceptat de replicació de l'ADNmt és el model de replicació asincrònica o asimètrica^{36,37}. Aquest model deu el seu nom a que les dues cadenes d'ADNmt no es repliquen alhora, sinó que primer s'inicia la polimerització de la cadena pesant utilitzant la cadena lleugera com a motlle i quan aquesta està completada en un 70% aproximadament, s'inicia la síntesi de la cadena lleugera utilitzant la cadena pesant com a motlle. La cadena pesant, com que es sintetitza en primer lloc, també se l'anomena cadena líder (*leading strand*), mentre que a la cadena lleugera, com inicia la seva síntesi més tard que la cadena pesant també se l'anomena cadena retardada (*lagging strand*).

El procés de replicació comença quan l'ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT), juntament amb TFAM transcriuen a partir del promotor de la cadena lleugera (LSP) cap a ARN. Aquest transcrit d'ARN és processat per l'enzim RNASH1 per a que tingui un extrem 3' lliure que serveix com a encebador de la polimerasa gamma (POLG)³⁸. La POLG, gràcies a l'acció de l'helicasa Twinkle que desenrotlla les dues cadenes d'ADN, sintetitza ADN de la cadena pesant utilitzant l'ADN de la cadena lleugera com a motlle a partir de l'origen de replicació de la cadena pesant (Ori_H) situat immediatament *downstream* del LSP. La cadena pesant parental, que durant l'elongació de la cadena pesant naixent queda en forma monocatenària, es recobreix de *mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein* (mtSSB) per protegir la cadena simple d'ADN de la degradació³⁹ i per evitar que la POLRMT faci transcrits aleatoris a partir d'aquesta. Quan s'ha polimeritzat aproximadament un 70% de la cadena pesant naixent la forquilla de replicació arriba a l'origen de replicació de la cadena

lleugera (O_{riL}) i es crea un bucle en la cadena pesant parental que impedeix la unió de mtSSB. D'aquesta manera, aquesta regió d'ADN queda exposada, permetent que la POLRMT s'uneixi a ella i creï un encebador nou d'ARN de 25 nucleòtids que és utilitzat per la POLG per a la síntesi de la cadena lleugera, que s'inicia en sentit contrari a partir de l' O_{riL} utilitzant la cadena pesant com a motlle. A més, la POLG va retirant la mtSSB present en la cadena pesant parental a mesura que avança la forquilla de replicació de la cadena naixent lleugera per tal de fer accessible l'ADN motlle per a la replicació. A partir d'aquest punt les dues cadenes són sintetitzades en sentit contrari fins a completar-se de forma asincrònica, ja que la cadena pesant s'acaba de sintetitzar abans que la cadena lleugera. Quan la POLG completa la síntesi de les dues cadenes d'ADNmt es desplaça l'encebador d'ARN i aquest és eliminat per DNA2, RNAsAH1⁴⁰ i MGME1⁴¹. Finalment, la DNA lligasa III lliga els extrems de les dues cadenes noves per a circularitzar-les⁴² i com que en aquest procés de replicació les cadenes d'ADNmt queden entrecreuades, la topoisomerasa TOP3 α allibera el superenrotllament i permet la separació de les molècules d'ADNmt^{43,44} (Figura 2.3).

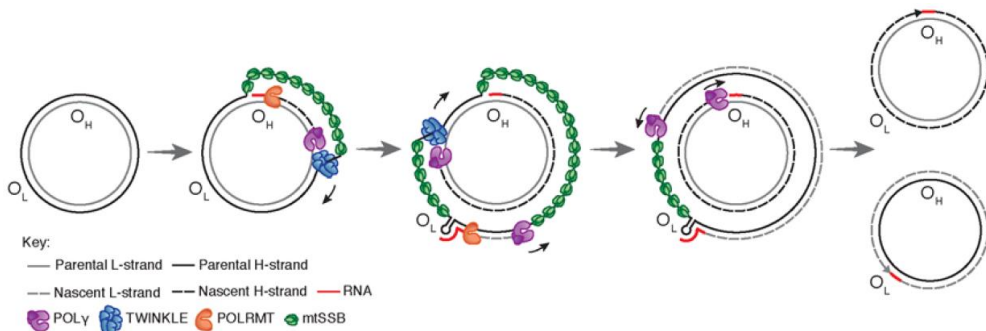


Figura 2.3. Model asincrònic de replicació de l'ADNmt. Aquest és el model de replicació més acceptat, on s'inicia la replicació de l'ADN a partir d'encebadors contra el promotor de la cadena lleugera i avança a partir de l'origen de replicació de la cadena pesant (O_H) fins a sintetitzar el 70% de la cadena pesant i arribar a l'origen de replicació de la cadena lleugera (O_L) que inicia la replicació de la cadena lleugera en sentit contrari. Imatge obtinguda de ⁴⁴.

Adicionalment, com s'han trobat híbrids d'ADN i ARN en intermediaris de la replicació de l'ADNmt s'ha proposat un model que estableix que l'ADN monocatenari de la cadena pesant parental no s'uneix a mtSSB, sinó que ho fa a transcrits d'ARN. Aquest dúplex ADN – ARN protegeix l'ADN monocatenari de la degradació, donant lloc així a una cadena retardada provisional formada per fragments discontinus d'ARN que exerceixen d'encebadors al llarg

de la cadena pesada i que posteriorment són reemplaçats per ADN per formar la cadena lleugera. Aquest model es diu RITOLS (*Ribonucleotide Incorporation ThroughOut the Lagging Strand*) o *bootlace*^{45,46} i no entra en conflicte amb el model anterior, ja que s'ha vist que depenent del tipus i estat cel·lular es detecta més o menys aquest tipus de replicació amb híbrids d'ADN – ARN⁴⁷. Finalment, s'ha descrit un tercer model de replicació de l'ADNmt on aquest es replica de forma sincrònica en dos direccions a partir de diferents orígens de replicació^{47,48} i on no hi ha híbrids d'ADN – ARN, tot i que el mecanisme exacte de replicació es desconeix⁴⁹.

2.1.2.3. Reparació de l'ADNmt

Les mutacions sobre l'ADNmt es poden deure a exposició a agents mutagènics ambientals, a errors de l'ADN polimerasa durant la replicació de l'ADNmt, errors en la maquinària de reparació de l'ADNmt, per defectes en la maquinària de degradació de l'ADNmt danyat o per l'alta taxa de replicació de l'ADNmt⁵⁰. Tot i així, la causa més comú de dany en l'ADNmt és la presència d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) que es generen en la CTE, ja que l'ADNmt es troba espacialment a prop de la zona on es generen ROS. De fet, l'ADNmt presenta una ràtio de mutacions 10 vegades superior que l'ADN⁵¹.

La reparació de l'ADNmt, d'igual manera que la replicació, depèn completament de factors codificats en l'ADNn. El principal mecanisme de reparació de l'ADNmt és el *Base Excision Repair* (BER), ja que aquest permet reparar bases oxidades, que és la principal causa de dany sobre l'ADNmt⁵². El BER és iniciat per part d'ADN glicosilases que reconeixen danys sobre l'ADN i eliminen la base nitrogenada de l'esquelet de desoxiribosa. Les glicosilases poden ser mono o bifuncionals depenent de si manquen o tenen activitat endonucleasa. Les glicosilases monofuncionals solen eliminar danys per desaminació o bases alquilades, mentre que les glicosilases bifuncionals eliminen danys per oxidació de l'ADN. Durant el procés de reparació de l'ADNmt intervenen, entre altres proteïnes, les endonucleases DNA2 i MGME1, que s'encarreguen d'eliminar els fragments d'ADN monocatenari generats en el BER^{53,54}, la polimerasa POLG, que introdueix el nucleòtid complementari i la lligasa LIG3, que crea l'enllaç fosfodièster entre el nou nucleòtid inserit i l'ADN⁵⁵.

2.2. Metabolisme de dNTPs

L'ADNmt s'ha de replicar i reparar per respondre a diferents situacions com són la divisió mitocondrial o cel·lular o quan es produeixen danys sobre l'ADNmt. Aquests dos processos requereixen la presència de desoxiribonucleòsids trifosfat (dNTPs), que són utilitzats per a la síntesi de l'ADN. Per aquest motiu, tant en el citosol com en el mitocondri tenen lloc reaccions anabòliques, que s'encarreguen de sintetitzar dNTPs, i reaccions catabòliques, que s'encarreguen de degradar dNTPs, per mantenir una correcta homeòstasi d'aquests en els dos compartiments cel·lulars.

2.2.1. Anabolisme dels dNTPs

En la cèl·lula existeixen dues formes anabòliques d'obtenir dNTPs: la ruta *de novo* i la ruta de salvament. La ruta *de novo* obté nucleòtids a partir de molècules més petites com aminoàcids o CO_2 i opera en el citosol, principalment durant la fase de replicació (fase S) del cicle cel·lular. La ruta de salvament és una ruta de reciclatge que obté nucleòtids a partir de nucleòsids, desoxiribonucleòsids i nucleobases que provenen de la dieta o del metabolisme dels àcids nucleics, opera tant en el citosol com en el mitocondri i està activa en fases de proliferació i en fases de quiescència⁵⁶.

2.2.1.1. Anabolisme de dNTPs per la via *de novo*

Aquesta via és exclusivament citosòlica⁵⁷ i és diferent per a la síntesi de purines i pirimidines. La síntesi de purines comença a partir del fosforibosil pirofosfat (PRPP) obtingut en la via de les pentoses fosfat i mitjançant diverses reaccions on intervenen tres aminoàcids (glutamina, glicina i àcid aspàrtic), folat i CO_2 dona lloc a AMP i GMP, que poden ser fosforilats cap a ADP i GDP. La síntesi de pirimidines comença a partir de la glutamina i mitjançant diverses reaccions on intervé el CO_2 , l'àcid aspàrtic i la PRPP s'obté UMP i CMP⁵⁸. Així doncs, els productes finals de la via *de novo* són ribonucleòtids, útils per a la síntesi de l'ARN i altres funcions metabòliques.

Els ribonucleòsids difosfat de CDP, ADP, GDP i UDP obtinguts per aquesta via són reduïts cap desoxiribonucleòsids difosfat (dNDPs) gràcies a l'acció de la ribonucleòtid reductasa (RNR) obtenint dCDP, dADP, dGDP i dUDP, respectivament (Figura 2.4). La RNR és un enzim

heterotetramèric format per un homodímer de la subunitat catalítica gran (R1, codificat per *RRM1*) i un homodímer de la subunitat petita. L'homodímer de la subunitat petita pot estar format per dues proteïnes diferents: R2, que és codificat per *RRM2* o p53R2, que és codificat per *RRM2B*^{59,60}. L'associació de la subunitat gran amb una o altra subunitat petita està regulada pel cicle cel·lular. Durant la fase S del cicle cel·lular dues subunitats grans R1 s'associen amb dues subunitats petites R2, mentre que fora d'aquesta fase la transcripció de la subunitat R2 és inhibida, la proteïna R2 és degradada i les dues subunitats grans R1 s'associen amb dues subunitats petites de p53R2, que s'expressa durant tot el cicle cel·lular⁵⁶. A més, l'activitat de la RNR formada per R1/R2 és més alta que la que està formada per R1/p53R2, ja que durant la divisió cel·lular calen quantitats més altes de dNTPs per a la replicació de l'ADN⁶¹.

La síntesi de dTTP en la via *de novo* va per una via addicional a la RNR, on intervé la timidilat sintetasa (TS) que, utilitzant metilè tetrahidrofolat (MTHF) com a donant del grup metil, metila la desoxiuridina monofosfat (dUMP) per obtenir timidina monofosfat (dTMP) (Figura 2.4). La dTMP és fosforilada per la timidina monofosfat kinasa (TMPK) per obtenir timidina difosfat (dTDP). Tant l'expressió de la TS com la de TMPK és regulada pel cicle cel·lular i s'expressen en la fase S^{62,63}.

Els productes de la RNR (dCDP, dADP, dGDP) i de la TMPK (dTDP) que són els dNDP, són addicionalment fosforilats per les kinases de nucleòsid difosfat (NDPKs) fins a obtenir-se els desoxiribonucleòsids trifosfat o dNTPs utilitzats per a la síntesi de l'ADN⁵⁶. Aquests compostos, juntament amb els desoxiribonucleòsids monofosfat (dNMPs) i dNDPs, encara que són sintetitzats en el citoplasma, poden ser importats al mitocondri (Secció 2.2.3) (Figura 2.4).

2.2.1.2. Anabolisme de dNTPs per la via de salvament

Com que la ruta de salvament es dona tant en citosol com en mitocondri hi ha enzims paral·lels en els dos compartiments que duen a terme funcions similars. En aquesta ruta es parteix de desoxiribonucleòsids (dNs) que provenen de la dieta o del metabolisme cel·lular i que són fosforilats per una desoxiribonucleòsid kinasa cap a dNMPs. Aquest pas és el pas limitant de la via i està catalitzat per 4 enzims equivalents entre citosol i mitocondri que

presenten diferències en la selectivitat de substrats: timidina kinasa 1 (TK1), timidina kinasa 2 (TK2), desoxicitidina kinasa (dCK) i desoxiguanosina kinasa (dGK). La TK1 està localitzada en el citosol i catalitza la fosforilació de timidina (dThd) i desoxiuridina (dUrd)⁶⁴, mentre que la TK2 és mitocondrial i catalitza la fosforilació de dThd, desoxicitidina (dCtd) i dUrd⁶⁵. La dCK és citosòlica i catalitza la fosforilació de dCtd, desoxiadenosina (dAdo) i desoxiguanosina (dGuo)⁶⁶, mentre que la dGK està localitzada en el mitocondri i fosforila la dAdo i dGuo⁶⁷. El producte final d'aquests 4 enzims, els dNMPs, són fosforilats addicionalment per kinases de nucleòsid monofosfat (NMPKs) per obtenir dNDP i aquests són finalment fosforilats per les NDPKs obtenint-se així els desoxiribonucleòsids trifosfat o dNTPs que són necessaris per a la síntesi de l'ADN⁵⁶ (Figura 2.4).

Mitjançant experiments d'immunoprecipitació s'han trobat les NDPKs mitocondrials associades a les subunitats alpha (codificada per *SUCLG1*) i beta (codificada per *SUCLA2*) de la succinil CoA sintetasa⁶⁸ i a la gamma aminobutirat transaminasa (*ABAT*)⁶⁹. Aquesta interacció molecular ha fet que alguns autors hagin interpretat les mutacions en *SUCLA2*, *SUCLG1* i *ABAT* com un defecte en el metabolisme dels dNTPs^{70,71}, però aquests dos enzims no intervenen directament en el metabolisme de nucleòtids, sinó que el primer intervé en el cicle de Krebs⁶⁸, mentre que el segon intervé en la degradació del neurotransmissor GABA a nivell mitocondrial⁶⁹.

2.2.2. Catabolisme dels dNTPs

El catabolisme de dNTPs contribueix a mantenir l'homeòstasi d'aquests a través de la seva degradació. Els dNTPs poden ser desfosforilats successivament obtenint-se d'aquesta forma dNDPs i dNMPs⁷². Els dNMPs poden perdre el grup fosfat i convertir-se en dNs gràcies a l'acció de fosfohidrolases de nucleòsid monofosfat o també anomenades 5' nucleotidases⁷³. En humans s'han descrit 7 formes diferents amb expressió ubiqua en els diferents òrgans. De les 7 formes diferents 5 es localitzen en el citosol (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III, cdN), una en la superfície externa de la membrana plasmàtica (eN) i una (mdN) en el mitocondri^{73,74}.

Complementàriament, l'enzim SAMHD1 actua com a desoxiribonucleòtid trifosfohidrolasa catalitzant la hidròlisi del trifosfat del dNTP, obtenint-se així directament dNs a partir de dNTPs⁷⁵. Aquest enzim és especialment actiu fora de la fase S, mentre que en la fase de

replicació és proteolitzat⁷⁶. Addicionalment, l'enzim dCTP pirofosfatasa 1 (DCTPP1), localitzat en citosol i mitocondri, hidrolitza directament dCTP, dTTP i dUTP cap a dNMPs^{77,78} (Figura 2.4).

Un cop obtinguts els dNs gràcies als enzims catabòlics esmentats anteriorment, aquests poden continuar la seva degradació. La degradació dels dNs es duta a terme en primer lloc per dues desaminases: la citidina desaminasa (CDA) i l'adenosina desaminasa (ADA). La CDA converteix la dCtd en dUrd i l'ADA converteix la dAdo en desoxiinosina (dIno). En segon lloc, mitjançant reaccions de fosforòlisi (reaccions de trencament d'una molècula gràcies a l'addició d'un fosfat) portades a terme per la timidina fosforilasa (TP) i la purina nucleòsid fosforilasa (PNP), es separa la base nitrogenada de la desoxiribosa. La TP catalitza la fosforòlisi de la dUrd (obtinguda en la reacció catalitzada per la CDA) i la fosforòlisi de la dThd, obtenint-se uracil i timina, respectivament. La PNP catalitza la fosforòlisi de la dIno (obtinguda gràcies a l'ADA) i la fosforòlisi de la dGuo, obtenint-se hipoxantina i guanina, respectivament⁷⁹. Tant la hipoxantina com la guanina poden passar a xantina gràcies a l'acció de la xantina deshidrogenasa (XDH) i de la guanina desaminasa (GDA) (Figura 2.4).

2.2.3. Transport de dNTPs

Donat que les demandes de dNTPs són diferents en el citosol i en el mitocondri les concentracions d'aquests compostos són diferents en els dos compartiments. En condicions de quiescència les concentracions de dNTPs cel·lulars són baixes i el mitocondri té una alta dependència de la seva ruta de salvament. En condicions de replicació, per contra, la via *de novo* està activa i les concentracions de dNTPs cel·lulars són molt més altes, cosa que fa que el mitocondri no sigui tan depenent de la seva via de salvament per a la biosíntesi de dNTPs⁸⁰. De fet, s'ha descrit que els dNMPs, els dNDPs i els dNTPs obtinguts per la via *de novo* en el citosol poden ser importats al mitocondri^{81,82} a través dels transportadors PNC1 (codificat pel gen *SLC25A33*) i PNC2 (codificat pel gen *SLC25A36*)^{83,84}.

L'intercanvi observat entre citosol i mitocondri mitjançant transportadors específics de molècules amb càrrega, com són els dNMPs, dNDPs i dNTPs, no s'ha observat en la membrana plasmàtica^{85,86}, però sí que s'han descrit transportadors de nucleòsids i nucleobases tant en la membrana cel·lular com en el mitocondri⁸⁷.

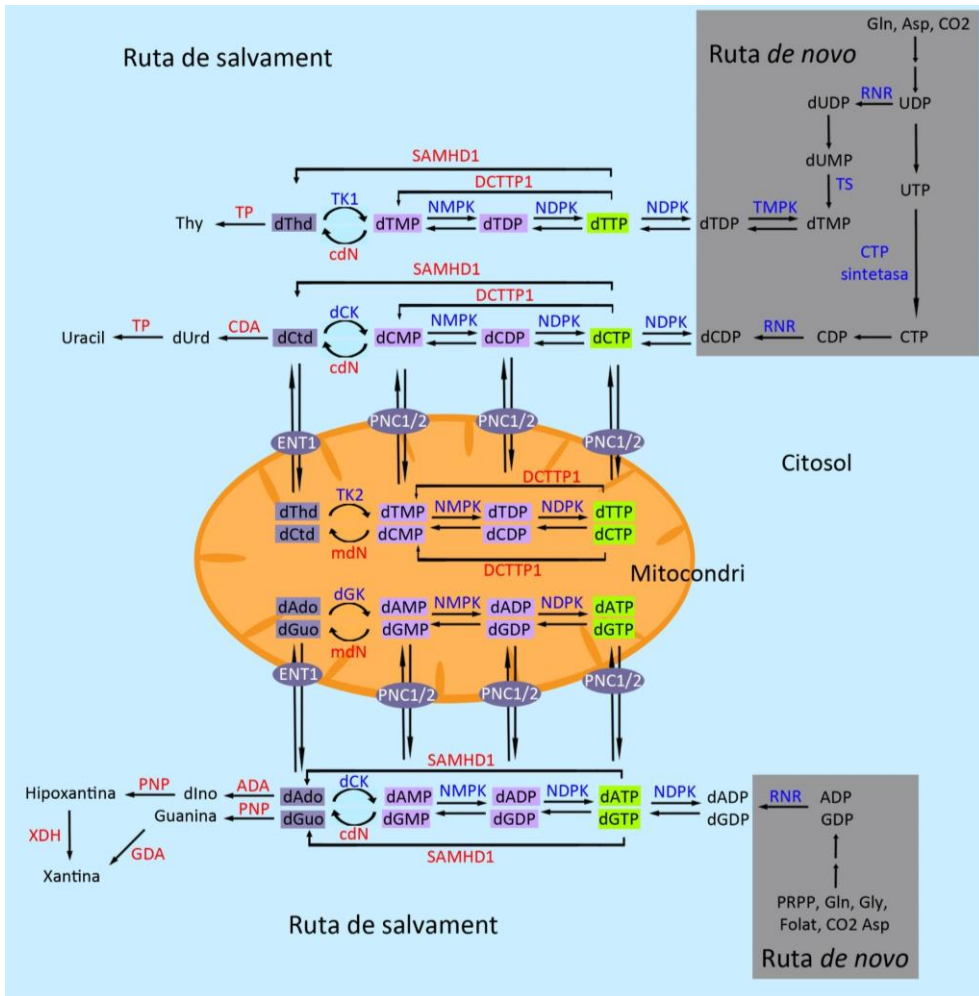


Figura 2.4. Esquema de les vies principals del metabolisme dels desoxiribonucleòtids. La ruta de salvament té lloc en el citoplasma i en el mitocondri i la ruta de novo té lloc únicament en el citoplasma i està marcada en gris. Les fletxes seguides en la via de novo indiquen una sèrie de reaccions intermèdies no indicades en l'esquema fins a obtenir el substrat de la RNR (UDP, ADP i GDP). Els enzims predominantment anabòlics estan marcats en blau i els enzims predominantment catabòlics, en roig. Els productes finals de les vies, els dNTPs, estan marcats amb un quadre verd i tots ells poden ser importats al mitocondri. Els dNMPs i dNDPs, que també poden ser importats al mitocondri, estan marcats amb un quadre lila. Els dNs, que poden ser importats al mitocondri a través d'ENT1, estan marcats amb un quadre gris.

2.2.4. Transport de dNs

Tot i que els dNs són neutres en els rangs de pH fisiològics, són molècules hidrofíliques que requereixen l'acció de transportadors que permetin el seu pas a través de les membranes lipídiques cap a l'interior de la cèl·lula i entre els diferents compartiments cel·lulars separats per membranes com són els mitocondris o lisosomes⁸⁸. Els transport de nucleòsids està mediat per dues famílies de transportadors: SLC28 i SLC29. Els transportadors de la família SLC28 són transportadors concentratius que mouen nucleòsids a través de les membranes en contra de gradient de concentració acoblant aquest al transport de ions de sodi (i protons per a un membre d'aquesta família, el CNT3)⁸⁹. Aquests transportadors tenen alta afinitat però baixa selectivitat. Els transportadors de la família SLC29 són transportadors equilibratius que mouen nucleòsids i nucleobases a favor de gradient de concentració i que tenen menor afinitat que els de la família SLC28 però més selectivitat⁹⁰.

La família de transportadors concentratius SLC28 inclou 3 transportadors: CNT1 (codificat per *SLC28A1*), CNT2 (codificat per *SLC28A2*) i CNT3 (codificat per *SLC28A3*). Aquests 3 transportadors presenten diferències en la seva especificitat de substrat: el CNT1 regula el transport de nucleòsids de pirimidina⁹¹, el CNT2 regula el transport de nucleòsids de purina i uridina⁹² i el CNT3 regula el transport de nucleòsids de purina i pirimidina⁹³.

La família de transportadors equilibratius SLC29 inclou 4 transportadors: ENT1 (codificat per *SLC29A1*), ENT2 (codificat per *SLC29A2*), ENT3 (codificat per *SLC29A3*) i ENT4 (codificat per *SLC29A4*). Aquests transportadors, com els CNT, es diferencien en la seva especificitat de substrat: ENT1 i ENT2 tenen un paper important en el transport de dNs i poden transportar tots els nucleòsids i nucleobases, encara que amb diferent K_m ⁹⁴, mentre que ENT3 i ENT4 tenen un paper menys important en el metabolisme de dNs⁹⁵, ja que ENT3 transporta uridina i adenosina de forma depenent al pH (amb un pic d'activitat a pH 5,5)^{90,96} i ENT4 només adenosina, a part de monoamines^{97,98}. A més, la localització intracel·lular d'aquests 4 transportadors és diferent. ENT1 està localitzat en la membrana plasmàtica⁹⁵ i en el mitocondri⁸⁷, ENT2 en la membrana plasmàtica⁹⁵ i en la membrana nuclear⁹⁹, ENT3 en el mitocondri⁹⁶ i lisosomes (fet que explica el seu pic d'activitat a pH àcid)¹⁰⁰ i ENT4 en la membrana plasmàtica⁹⁷.

L'expressió i localització tissular dels transportadors de dNs és molt diferent entre els 3 membres de la família de CNT i els 4 membres de la família ENT, a part d'entre les dues famílies CNT i ENT^{90,101,102}. L'ARNm d'ENT1, ENT2 i ENT3 es considera ubicu, mentre que la proteïna ENT2 no ho és tant en comparació amb ENT1 i ENT3. Els CNTs mostren una distribució tissular més restrictiva que els ENT i, com aquests primers transportadors juguen un paper important en l'absorció dels dNs aportats per la dieta i en la seva reabsorció a nivell renal, es troben localitzats en epiteli, en nefrones i tracte gastrointestinal. En aquests teixits l'expressió de CNT i ENT està polaritzada: a la part apical hi ha més CNT i en la part basal, en contacte amb la circulació sanguínia, hi ha més ENT^{88,90,101,103}.

De tots els transportadors de nucleòsids (tant de la família SLC28 i SLC29) només s'han descrit mutacions patogèniques en 3 d'ells: ENT1¹⁰⁴, ENT3^{105,106} i CNT1¹⁰⁷.

2.2.4.1. ENT1

Els transportadors ENT han estat àmpliament estudiats, ja que juguen un paper en el transport i l'efecte terapèutic dels anàlegs de nucleòsids utilitzats per al tractament de càncer, infeccions víriques com VIH, hepatitis B i C o herpesvirus o malalties inflamatòries com Crohn^{108,109}. Com que aquesta tesi es centra en l'estudi dels dNs com a tractament de les síndromes de depleció i deleccions múltiples de l'ADNmt (MDDS) (Secció 2.4.6.1), vam decidir incloure-hi l'estudi d'un d'aquests transportadors, ENT1, ja que es troba present en les membranes plasmàtica i mitocondrial i podria tenir un paper en l'entrada dels dNs administrats.

ENT1 es troba altament expressat en la membrana plasmàtica dels eritròcits¹¹⁰ i té un rol important en l'entrada de dNs i dels seus anàlegs en aquestes cèl·lules^{111,112}, a més de jugar un paper en l'eritropoesi¹¹³. De fet, s'ha identificat ENT1 com a un antigen sanguini present en els eritròcits i dues mutacions diferents presents en homozigosi (p.Glu391Lys i c.5891+1G>C) causen absència del transportador i determinen un grup sanguini poc freqüent anomenat Augustine negatiu (A^(a-))¹¹⁴. La primera mutació esmentada no afecta la capacitat de transport d'ENT1¹¹⁵, mentre que la segona mutació causa una absència total de proteïna i s'ha associat a atacs de pseudogota i presència de calcificacions en les articulacions en 3 pacients diferents¹⁰⁴.

L'any 2004 es va generar un ratolí *knock-out* (KO) per *Slc29a1* (el gen que codifica ENT1)¹¹⁶. Aquest ratolí s'ha utilitzat en la part experimental d'aquesta tesi i d'ara en endavant es referirà a aquest com a ratolí KO per *Ent1* o ratolí *Ent1*^{-/-}. Aquest model murí, que manca aquest transportador important en el transport d'adenosina, ha permès estudiar molts dels processos regulats per aquest nucleòsid, com són processos de neurotransmissió en el cervell¹¹⁷, producció i reabsorció òssia¹¹⁸ i la resposta a l'infart de miocardi¹¹⁹.

En un primer moment, es va utilitzar aquest model murí per estudiar el paper de l'adenosina en el consum d'etanol, ja que s'havia descrit que l'exposició crònica a etanol causa una disminució de l'expressió d'ENT1¹²⁰. Aquest treball va revelar que els ratolins que manquen ENT1 tenen menys atàxia i menys efectes hipnòtics associats al consum d'etanol, així com més preferència per al consum d'aquest producte. Es creu que tots aquests efectes són deguts a un descens de l'adenosina extracel·lular en el nucli estriat causat per la manca d'ENT1, cosa que fa que l'adenosina no pugui fer la seva funció sobre els seus receptors en les neurones¹¹⁶. Per altra banda, es sap que l'activació dels receptors d'adenosina en el cervell disminueix els comportaments associats a ansietat i també s'ha utilitzat aquest model per veure que els ratolins que manquen ENT1 reproduïen aquest fenotip. En aquest cas, a diferència del que s'havia observat en l'estudi del rol d'ENT1 per al consum d'etanol, es creu que el comportament dels ratolins KO es deu a un increment de l'adenosina extracel·lular en l'amígdala¹²¹, tot i que en cap dels dos estudis s'ha pogut mesurar l'adenosina extracel·lular per limitacions tècniques i per la seva baixa concentració.

Posteriorment, donat que l'adenosina regula l'osteogènesi, es va utilitzar aquest mateix model murí per estudiar aquests processos i es va veure que els ratolins KO per *Ent1* presentaven calcificacions sense inflamació en articulacions que progressaven amb l'edat (tal com s'ha observat en els pocs pacients amb mutacions en *SLC29A1*¹⁰⁴), però no en vasos sanguinis^{122,123}, a més d'una pèrdua de massa òssia¹²⁴ que causa mobilitat reduïda i paràlisis en ratolins KO envellits^{122,124}. Donat que els patrons de calcificacions en aquest ratolí són similars als observats en humans durant l'envelliment en una patologia anomenada hiperostosi esquelètica difusa idiopàtica, s'ha proposat l'ús d'aquest ratolí com a model preclínic d'aquesta patologia, encara que en humans no s'ha associat la falta d'ENT1 a aquesta condició¹²².

Adicionalment, s'ha utilitzat aquest model de ratolí KO per *Ent1* per estudiar el paper d'ENT1 en la resposta a infart de miocardi. Aquest estudi va mostrar que els ratolins que mancaven ENT1 tenien una mida de zona infartada inferior que els animals que expressaven ENT1, tot indicant que la falta d'aquest transportador incrementa la quantitat extracel·lular d'adenosina i aquests incrementen la supervivència de les cèl·lules infartades a través d'un mecanisme desconegut¹²⁵.

Finalment, com que ENT1 juga un paper en el transport d'anàlegs de nucleòsids, s'ha utilitzat el model de ratolí KO per *Ent1* per demostrar que el transport de ribavirina (anàleg de nucleòsid utilitzat com a antivíric) en eritròcits és altament depenent d'ENT1¹¹².

2.2.5. Manteniment dels *pools* de dNTPs

Com s'ha indicat anteriorment, la quantitat cel·lular dels dNTPs està altament regulada, tant a nivell anabòlic com catabòlic i aquesta regulació es fa tant nivell al·lostèric com genètic. De fet, en condicions de replicació, on calen quantitats altes de dNTPs per sintetitzar ADNn, el contingut de dNTPs es troba en un rang de 10 – 100 pmols/milió de cèl·lules, amb una contribució mitocondrial del 10%. En condicions de quiescència, on no calen tants dNTPs perquè no hi ha replicació de l'ADNn (només de l'ADNmt, que és molt més petit), les concentracions de dNTPs són unes 10 vegades inferiors, tant en el citosol com en el mitocondri⁸⁰. Tot i haver una alta regulació de la quantitat de dNTPs i en la simetria entre els 4 dNTPs (la concentració dels 4 dNTPs no és equimolar) s'ha descrit que increments o descensos de les seves quantitats o canvis en l'estequiometria dels 4 dNTPs pot causar inestabilitat genòmica, que es manifesta en forma de mutacions puntuals, recombinació o anormalitats cromosòmiques (reordenaments, trencament o pèrdua cromosòmica)^{126,127}.

En una revisió dels anys 90¹²⁶ ja es van descriure més de 200 treballs portats a terme en diferents organismes *in vivo* i *in vitro* (incloent el bacteriòfag T4 i diferents espècies de procariotes i eucariotes com llevat, plantes, cèl·lules de ratolins i cèl·lules humanes) on es va veure que una reducció del dTTP, del dCTP, del dGTP, de la combinació de dATP i dGTP i de la combinació de dATP i dTTP portaven a inestabilitat genòmica. El mateix passava quan hi havia una elevació de dTTP, de dCTP, de dATP, de dGTP o d'una combinació de dATP i dGTP. Les alteracions de les quantitats dels dNTPs en la llarga llista d'estudis anteriorment

esmentats es van dur a terme mitjançant organismes mutants de gens associats al metabolisme de dNTPs, mitjançant l'administració de dNs o precursors de dNTPs o mitjançant l'administració de drogues que tenen com a diana algun enzim implicat en el metabolisme de dNTPs¹²⁷.

En humans, l'associació entre les alteracions de les concentracions dels dNTPs i la mutagenicitat sobre l'ADN ha estat descrit *in vitro*¹²⁶. L'únic cas de pacients on mutacions en un gen relacionat amb el metabolisme dels dNTPs s'ha associat a mutacions sobre l'ADNmt és el cas de mutacions en el gen *TYMP*, que codifica la TP (Secció 2.2.2) i que causen una malaltia anomenada MNGIE (les sigles en anglès d'encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial)^{128,129}. En aquest cas, la deficiència de l'activitat TP porta a un increment dels substrats d'aquest enzim, la dThd i la dUrd, que no es poden degradar cap a timina (Thy) i uracil, respectivament (Figura 2.4). L'increment de dThd inhibeix competitiu la fosforilació de dCtd per part de la TK2, donant lloc a dues conseqüències: l'augment de dTTP en el compartiment citosòlic i mitocondrial⁵⁷ (que al seu torn inhibeix la TK2) i la depleció secundària de dCTP mitocondrial deguda a l'inhibició de TK2¹³⁰. Aquestes alteracions sobre les quantitats dels dNTPs porten a depleció de l'ADNmt (causada per la depleció de dCTP)¹³⁰, presència de deleccions múltiples^{131,132} i presència de mutacions puntuals sobre l'ADNmt^{133,134}. Aquestes observacions s'han confirmat en un model murí de la malaltia¹³⁵. Cal puntualitzar que no s'ha observat inducció de mutacions sobre l'ADNn estudiant les seqüències típicament afectades en MNGIE (AAAT)¹³³, tot i que sí que s'ha observat una incidència de tumors en el 3% dels pacients¹³⁶.

Els mecanismes pels quals les alteracions de les quantitats de dNTPs causen mutacions sobre l'ADN s'expliquen per dos motius, ambdós dependents de la concentració de dNTPs. El primer és per competició entre el dNTP complementari o correcte i els dNTPs incorrectes o no complementaris que poden estar en excés durant la replicació de l'ADN, afavorint així la seva incorporació de forma errònia. El segon mecanisme és l'anomenat "efecte de nucleòtid següent" que implica competició entre l'activitat ADN exonucleasa 3' – 5' correctora i l'activitat ADN polimerasa de l'enzim. En el cas concret dels pacients amb MNGIE, l'efecte de nucleòtid següent té lloc per l'acceleració de l'activitat ADN polimerasa en contextos de dues, tres o més bases "A" seguides en el motlle que és deguda a la gran disponibilitat de

substrat dTTP complementari. L'acceleració de l'activitat polimerasa fa que l'activitat correctora de l'ADN polimerasa mitocondrial (POLG) pugui fallar en la correcció d'una base eventualment errònia en la part 5' immediatament anterior a la cua poli-T introduïda. Això fixa les mutacions somàtiques que s'observen en diferents graus d'heteroplàsmia en els teixits dels pacients de MNGIE¹³³.

2.3. Malalties mitocondrials

Encara que el mitocondri intervé en molts processos cel·lulars, quan es parla de malalties mitocondrials es consideren exclusivament malalties causades per afectacions del sistema OXPHOS¹³⁷. Com que l'activitat OXPHOS està controlada per dos genomes (l'ADNn i l'ADNmt) les patologies mitocondrials poden estar causades per mutacions en l'ADNn (en gens que codifiquen proteïnes necessàries per a la funció OXPHOS) i per mutacions en l'ADNmt. L'herència genètica de les malalties mitocondrials pot ser autosòmica dominant, autosòmica recessiva o lligada al cromosoma X per a mutacions que afecten a l'ADNn o d'herència materna per a mutacions que afecten a l'ADNmt. Rarament, s'han descrit patologies degudes a mutacions *de novo* no heretades¹³⁸.

Les malalties mitocondrials tenen una presentació clínica molt heterogènia, ja que poden debutar a qualsevol edat, afecten diferents òrgans (normalment els que tenen una alta demanda energètica com el sistema nerviós, sistema muscular, sistema endocrí, cor, fetge o ronyons) i presenten uns símptomes molt diversos. Establir la prevalença (casos existents d'una patologia) o incidència (casos nous d'una patologia) de les malalties mitocondrials és complicat, ja que són malalties minoritàries. Això sumat a la seva variabilitat genotípica i fenotípica que causa dificultat en el seu diagnòstic¹³⁹, fa que les dades de prevalença i incidència siguin poc sòlides. En estudis previs es va establir la prevalença d'aquestes patologies en 1 cas cada 5.000 – 10.000 habitants¹⁴⁰. En un estudi més recent amb una cohort diferent de pacients s'ha estimat que en persones menors de 16 anys la seva prevalença és de 5 a 15 persones per cada 100.000 habitants¹³⁸. En adults (majors de 16 anys) s'ha estimat que la prevalença de les malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNmt és de 9,6 casos per cada 100.000 habitants i la prevalença de les malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNn és de 2,9 per cada 100.000 habitants¹⁴¹. A

nivell espanyol, s'ha estimat que la incidència de les malalties mitocondrials entre l'any 2014 i 2020 en població infantil va ser de 6,34 casos per cada milió d'habitants i en població adulta de 1,36 casos per cada milió d'habitants, amb una incidència total de 2,3 casos per cada milió d'habitants¹⁴².

2.3.1. Malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNmt

Aquestes malalties segueixen un patró d'herència materna i sempre s'afecta el sistema OXPHOS, ja que tots els gens codificats en l'ADNmt estan directament implicats en l'expressió d'aquest sistema. Depenent de la regió de l'ADNmt mutada pot haver una afectació total o parcial del sistema OXPHOS. Si les mutacions es localitzen en algun dels 13 gens que codifiquen subunitats del sistema OXPHOS la conseqüència és normalment un defecte aïllat en el complex al qual pertany aquella subunitat en concret. Si les mutacions es localitzen en els gens que codifiquen els 22 ARNt o els 2 ARNr el resultat és una afectació general del sistema OXPHOS, ja que no es poden transcriure correctament les 13 proteïnes codificades en l'ADNmt que estan localitzades en els diferents complexos del sistema OXPHOS (excepte el complex II que és de codificació exclusivament nuclear).

Donat l'estat poliploide de l'ADNmt, el grau d'heteroplàsmia de les mutacions té importància en el desenvolupament i progressió d'aquestes patologies. Variants patogèniques sobre l'ADNmt poden no tenir un efecte negatiu si aquestes es mantenen en un nivell d'heteroplàsmia baixos, ja que hi ha un nombre suficient de molècules d'ADNmt sense la variant patogènica que compensen l'efecte deletori d'aquesta mutació. Si les molècules d'ADNmt portadores de la variant patogènica superen un llindar d'heteroplàsmia i adquireixen un pes important en la població d'ADNmt poden desencadenar una patologia. El llindar que han de superar aquestes variants patogèniques per desencadenar una patologia és diferent segons el tipus cel·lular i segons la mutació sobre l'ADNmt¹⁴³.

Mutacions sobre l'ADNmt causen un conjunt de síndromes amb clínica variable i heterogenia. Algunes d'aquestes síndromes són: MELAS (que són les inicials en anglès d'encefalomiopatia mitocondrial, acidosi làctica i episodis semblants a ictus), MERRF (que són les inicials en anglès d'epilèpsia mioclònica amb fibres roges trencades), LHON (que són les inicials en anglès de neuropatia òptica hereditària de Leber), síndrome de Kearns Sayre

(KSS) (que cursa amb oftalmoplegia progressiva, retinopatia pigmentaria i atàxia cerebel·lar), síndrome de Pearson (que cursa amb anèmia sideroblàstica, pancitopènia i fallida de l'activitat exocrina del pàncrees), síndrome de Leigh (que cursa amb encefalopatia amb signes cerebel·losos i del tronc de l'encèfal), NARP (que són les inicials en anglès dels símptomes de neuropatia, atàxia i retinitis pigmentosa), CPEO (que són les inicials en anglès d'oftalmoplegia externa crònica progressiva i que cursa també amb ptosi bilateral)¹⁴⁴ o SNHL (que són les inicials en anglès de pèrdua d'oïda neurosensorial) i que està causada per la presència de mutacions en l'ADNmt que predisposen a sordesa quan hi ha una exposició a aminoglicòsids¹⁴⁵ (Taula 2.1).

Taula 2.1. Síndromes causades per mutacions en l'ADNmt. Dades obtingudes a partir de ^{144,145,146}.

Síndrome	Alteració molecular en l'ADNmt	Símptomes	Edat de presentació
MELAS	Mutacions en gens codificants d'ARNt o de proteïnes	Episodis semblants a ictus, encefalopatia amb convulsions, demència, debilitat muscular, afectació psicomotora, pèrdua d'audició, baixa estatura	Infantesa, adolescència o adulta
MERRF	Mutacions en gens codificants d'ARNt	Convulsions, atàxia, debilitat muscular, pèrdua d'audició	Infantesa, adolescència o adulta
LHON	Mutacions en gens codificants de proteïnes	Atròfia òptica i pèrdua de visió	Adulta
KSS	Deleció simple	Oftalmoplegia externa progressiva, retinitis pigmentosa, pèrdua auditiva, atàxia, demència, diabetis mellitus	Infantesa, adolescència o adulta
Pearson	Deleció simple	Anèmia sideroblàstica, pancitopènia, fallida del pàncrees exocrí, fallida hepàtica, tubulopatia renal	Infantesa
Leigh	Mutacions en gens codificants de proteïnes	Hipotonia, regressió psicomotora, atàxia, disfunció del tronc encefàlic	Infantesa
NARP	Mutacions en el gen <i>MT-ATP6</i>	Debilitat muscular, atàxia, retinitis pigmentosa, neuropatia motora i sensorial	Adulta
CPEO	Mutacions en gens codificants de proteïnes	Oftalmoplegia externa progressiva, debilitat muscular	Adulta
SNHL	Mutacions en els gens <i>MT-RNR1</i> i <i>MT-TS1</i>	Pèrdua bilateral de l'oïda	Infantesa, adolescència o adulta

2.3.2. Malalties mitocondrials causades per mutacions en l'ADNn

Com que en el mitocondri es localitzen més de 1.500 proteïnes de codificació nuclear que intervenen en les diferents funcions que duu a terme aquest òrganul¹¹, mutacions en totes aquestes proteïnes poden causar afectacions de les diferents funcions mitocondrials, tot i que, tal com s'ha indicat anteriorment, el terme de malaltia mitocondrial inclou solament patologies on s'afecta el sistema OXPHOS¹³⁷. L'herència genètica d'aquestes patologies pot ser autosòmica dominant, autosòmica recessiva o lligada al cromosoma X.

Depenent del procés molecular que es veu afectat en aquestes malalties es poden classificar en 3 categories: es pot afectar directament el sistema OXPHOS, es pot afectar el sistema que participa en la integritat de la membrana mitocondrial, i de forma indirecta el sistema OXPHOS que està localitzat en ella, o es pot afectar el sistema de replicació de l'ADNmt que de forma indirecta afecta al sistema OXPHOS, ja que no tenir l'ADNmt en condicions òptimes afecta l'expressió de les 13 subunitats del sistema OXPHOS que aquest codifica¹⁴⁴ (Taula 2.2). La presentació clínica d'aquestes malalties també és molt heterogènia i cursa amb símptomes que solapen amb els causats per les mutacions sobre l'ADNmt (Taula 2.1), a part d'altres que inclouen encefalopatia, neuropatia, miopatia, cardiopatia, hepatopatia o una combinació d'elles⁷⁰.

Taula 2.2. Processos moleculars que afecten al sistema OXPHOS en les malalties mitocondrials d'origen nuclear. Dades obtingudes a partir de ^{144,147,148}.

Alteració molecular	Defectes
Afectació directa del sistema OXPHOS	Proteïnes que codifiquen factors del sistema OXPHOS
	Factors d'acoblament del sistema OXPHOS
	Factors que participen en la síntesi proteica en el mitocondri, processament d'ARNm o processament de proteïnes
	Transportadors de proteïnes
Afectació de la integritat de la membrana mitocondrial	Enzims biosintètics de lípids o cofactors
	Proteïnes involucrades en la dinàmica mitocondrial i composició de la membrana
	Proteïnes involucrades en la biogènesi mitocondrial
Afectació de la replicació de l'ADNmt	Factors que afecten al manteniment de l'ADNmt

2.4. Síndromes de depleció i deleccions múltiples de l'ADNmt (MDDS)

Aquesta tesi es centra en les síndromes de depleció i deleccions múltiples de l'ADNmt (MDDS), que són un conjunt de malalties mitocondrials causades per mutacions en gens nuclears que codifiquen proteïnes que intervenen en la replicació i en el correcte manteniment de l'ADNmt. Mutacions en aquests gens causen alteracions quantitatives i qualitatives sobre l'ADNmt. L'alteració quantitativa observada en els teixits més afectats dels pacients és la depleció, que és una reducció del nombre de còpies de l'ADNmt. Les alteracions qualitatives observades en els teixits més afectats dels pacients són les deleccions múltiples sobre les molècules de l'ADNmt i en alguns casos, presència de mutacions puntuals sobre l'ADNmt^{72,149}.

En un primer moment, quan es van descriure aquestes síndromes, es van classificar com a dues entitats diferents: per una banda estaven les síndromes de depleció de l'ADNmt, que afectaven a pacients pediàtrics i que sovint mostraven una patologia molt greu^{150,151} i per altra banda estaven les síndromes de deleccions múltiples, que afectaven a pacients adults^{152,153}. A mesura que es van descriure més casos de pacients es va veure que les causes genètiques que porten a la depleció i deleccions múltiples eren sovint les mateixes i, de fet, mutacions en un mateix gen en uns pacients poden causar depleció mentre que en altres poden causar deleccions múltiples o una combinació de les dues alteracions^{72,154}. Per aquest, motiu la tendència actual és considerar aquestes alteracions de l'ADNmt com a diferents presentacions moleculars del mateix grup de malalties.

Les manifestacions clíniques de les MDDS, com a patologies mitocondrials que són, són molt heterogènies, amb una àmplia gamma de símptomes que es poden manifestar en edat infantil de forma molt greu o en l'etapa adulta de forma més moderada. A més, hi ha un solapament entre genotips i fenotips, és a dir, mutacions en un mateix gen poden causar manifestacions clíniques diferents i mutacions en diferents gens poden tenir una manifestació clínica molt semblant entre pacients⁷². Addicionalment, les MDDS afecten diferents teixits i depenent de l'òrgan majoritàriament afectat es classifiquen en

encefalohepatopatia, encefalomiopatia, encefaloneuropatia, encefalopatia neurogastrointestinal, miopatia, oftalmoplegia, atròfia òptica o neuropatia¹⁵⁴.

S'han descrit mutacions en més de 30 gens nuclears que causen MDDS. Aquests gens participen en la replicació o manteniment de l'ADNmt de diferents formes, per la qual cosa s'han classificat els gens que causen MDDS en quatre categories depenent de la seva funció^{70,72,155}: gens que codifiquen proteïnes que formen part de la maquinària de replicació de l'ADNmt (Taula 2.3), gens que codifiquen proteïnes que intervenen en el metabolisme de dNTPs (Taula 2.4), gens que codifiquen proteïnes que intervenen en la dinàmica mitocondrial (Taula 2.5) o gens que codifiquen proteïnes que intervenen en el manteniment o replicació de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut (Taula 2.6) (Figura 2.5).

2.4.1. Gens implicats en la maquinària de replicació de l'ADNmt

Aquesta categoria inclou gens que codifiquen proteïnes que fan la seva funció en la forquilla de replicació de l'ADNmt i participen directament en alguns dels passos d'aquest procés. El replisoma bàsic per a la síntesi de l'ADNmt *in vitro* està constituït per tres proteïnes: la polimerasa gamma (formada per tres subunitats codificades per dos gens diferents, *POLG* i *POLG2*), l'helicasa *twinkle* i la proteïna d'unió a l'ADN de cadena simple *mtSSB*¹⁵⁶. Mutacions en aquestes proteïnes, a part d'altres que intervenen en la maduració de l'ADNmt sintetitzat, s'han associat a MDDS (Taula 2.3).

La polimerasa gamma està formada per un heterotrímer d'una subunitat gran (codificada per *POLG*) i dues subunitats petites (codificades per *POLG2*). La subunitat gran té les activitats catalítiques de l'enzim (activitat polimerasa en direcció 5' – 3', activitat 5' – desoxiribosa fosfat liasa i activitat exonucleasa correctora en direcció 3' – 5') mentre que les dues subunitats petites actuen de lloc d'unió a l'ADN i aporten processivitat a l'enzim¹⁵⁷. Mutacions tant en *POLG*¹⁵⁸ com en *POLG2*^{159,160,161,162} s'han associat a MDDS, ja que tant la replicació, com la unió de l'enzim a l'ADNmt estan afectades. De fet, les mutacions en *POLG* són la causa més comú de MDDS¹⁵⁸ i s'han associat a dany hepàtic, convulsions i dificultat per a l'alimentació en població infantil i a atàxia, neuropatia perifèrica, convulsions i oftalmoplegia externa progressiva (PEO) en adults¹⁶³. Mutacions en *POLG2* s'han descrit en menys pacients que per a *POLG* i s'han associat a PEO^{159,160,161,162}.

L'helicasa *twinkle* (codificat pel gen *TWNK*), present en forma homohexamèrica, s'encarrega d'obrir les dues cadenes d'ADN en direcció 5' a 3' per fer accessible aquest a la polimerasa gamma¹⁶⁴. Mutacions en aquest gen causen un estancament de la forquilla de replicació que es manifesta en forma de depleció i delecions múltiples sobre l'ADNmt¹⁶⁵ que causen PEO, atàxia espinocerebel·lar d'aparició infantil¹⁶⁶ i síndrome de Perrault, que cursa amb hipoacúsia neurosensorial i amb disgenèsia ovàrica¹⁶⁷. D'entre tots els gens associats a MDDS, només mutacions en *TWNK*¹⁶⁸ i en el domini exonucleasa de *POLG*¹⁶⁹ s'han associat a mutacions puntuals somàtiques sobre l'ADNmt.

Mutacions en *SSBP1* que codifica la proteïna mtSSBP, que recobreix l'ADN monocatenari en el procés de replicació, també s'han associat a MDDS i es manifesten amb atròfia òptica amb degeneració de la retina¹⁷⁰. TFAM, la proteïna més abundant en els nucleoides, que participa en la síntesi de l'encebador d'ARN necessari per replicar l'ADNmt²⁵, també s'ha associat a MDDS que cursen amb dany hepàtic i causen mort infantil¹⁷¹.

En els últims passos de la síntesi de l'ADNmt intervenen una sèrie de proteïnes que permeten la maduració del nou ADNmt sintetitzat. Aquest procés inclou la separació i resolució de les estructures que queden entre les cadenes parentals i filles. Mutacions en alguns dels gens que codifiquen proteïnes que intervenen en aquests processos (*MGME1*, *TOP3A*, *DNA2*, *RNASEH1* i *LIG3*) també s'han associat a MDDS. *MGME1* és una exonucleasa que elimina ADN monocatenari i que intervé en la maduració del nou ADNmt sintetitzat. Mutacions en aquest gen s'han associat a oftalmoplegia externa i fallida respiratòria⁵⁴. *TOP3α* (codificada per *TOP3A*) és una topoisomerasa que s'encarrega de relaxar el superenrotllament que es dona en la replicació de l'ADN i de resoldre les molècules d'ADNmt parentals de les molècules filles. Mutacions en aquest gen causen PEO, microcefàlia i retard en el creixement¹⁷². *DNA2* i *RNASEH1* s'encarreguen d'eliminar els encebadors d'ARN i mutacions en ells causen miopatia progressiva en el primer cas¹⁷³ i PEO, debilitat muscular, neuropatia perifèrica sensorial i motora i atàxia cerebel·lar progressiva en el segon cas¹⁷⁴. El gen *LIG3* codifica l'ADN lligasa III que circularitza l'ADNmt al final de la seva síntesi. Mutacions en el citat gen causen encefalopatia neurogastrointestinal¹⁷⁵. Finalment, s'ha descrit un sol pacient amb PEO i miopatia amb mutacions en *ENDOG*¹⁷⁶, que codifica l'endonucleasa G, que té una funció desconeguda però que es creu que participa en la replicació de l'ADNmt¹⁷⁷.

Taula 2.3. Gens associats a MDDS que codifiquen proteïnes que participen en la maquinària de replicació de l'ADNmt. En la taula s'indica el gen; la proteïna; la seva funció; el tipus d'herència de les mutacions: autosòmica recessiva (AR) o autosòmica dominant (AD); l'afectació sobre l'ADNmt: depleció (D), deleccions múltiples (DM) o mutacions puntuals (MP) i la referència del primer cas descrit amb associació amb les MDDS.

Gen	Proteïna	Funció	Herència	Afectació sobre l'ADNmt	Referència
<i>POLG</i>	ADN polimerasa gamma subunitat 1 (POLG)	ADN polimerasa, exonucleasa	AR/AD	D/DM/MP	178
<i>POLG2</i>	ADN polimerasa gamma subunitat 2 (POLG2)	Processivitat en la polimerització	AR/AD	D/DM	159
<i>TWNK</i>	Twinkle	Helicasa	AR/AD	D/DM/MP	179
<i>TFAM</i>	Factor de transcripció A (TFAM)	Regulador de la transcripció	AR	D	171
<i>SSBP1</i>	Proteïna d'unió a l'ADN de cadena simple (mtSSB)	Estabilització de l'ADN de cadena simple	AR/AD	D	170
<i>MGME1</i>	Exonucleasa de manteniment del genoma mitocondrial 1 (MGME1)	Exonucleasa	AR	D/DM	54
<i>TOP3A</i>	ADN topoisomerasa 3 α (TOP3 α)	Topoisomerasa	AR	D/DM	172
<i>DNA2</i>	Helicasa/nucleasa depenent d'ATP per a la replicació de l'ADN DNA2	Helicasa i nucleasa	AD	DM	173
<i>RNASEH1</i>	Ribonucleasa H1 (RNASEH1)	Ribonucleasa	AR	D/DM	174
<i>LIG3</i>	ADN lligasa 3	ADN lligasa	AR	D	175
<i>ENDOG</i>	Endonucleasa G (ENDOG)	Endonucleasa	AR	DM	176

2.4.2. Gens implicats en el metabolisme de dNTPs

Tal com s'ha vist en la Secció 2.2, les concentracions de dNTPs estan altament regulades en la cèl·lula i en el mitocondri i es sap que mutacions en gens que codifiquen enzims implicats en el metabolisme de dNTPs causen alteracions en les quantitats cel·lulars i/o mitocondrials d'aquests nucleòtids¹²⁷. Les alteracions dels dNTPs mitocondrials tenen conseqüències sobre la replicació i el manteniment de l'ADNmt, de manera que mutacions en gens associats al metabolisme de dNTPs causen alteracions sobre l'ADNmt i, per tant, MDDS. L'afectació de les concentracions dels nucleòtids que causen MDDS es pot donar per mutacions en gens que codifiquen proteïnes de localització citoplasmàtica (*TYMP*, *RRM1*, *RRM2B* i *GUK1*) o mitocondrial (*TK2* i *DGUOK*), d'acord amb la connexió entre el metabolisme de dNTPs dels dos compartiments cel·lulars (Taula 2.4).

Mutacions en el gen *TYMP*, que codifica la TP, causen desequilibris en les concentracions dels dNTPs portant a l'augment dels dos substrats d'aquest enzim (dThd i dUrd) i a l'augment concomitant de dTTP i descens secundari de dCTP (Secció 2.2.5). La depleció del dCTP és la causa de la depleció de l'ADNmt¹³⁰ i es considera que les alteracions dels dNTPs causen deleccions múltiples^{131,132} i mutacions puntuals sobre l'ADNmt¹³³ (Secció 2.2.5). La conseqüència final de mutacions en *TYMP* és una forma de MDDS que s'anomena MNGIE que cursa amb dismotilitat gastrointestinal, caquèxia, neuropatia perifèrica i miopatia^{128,135}.

Mutacions en dues de les subunitats de la ribonucleòtid reductasa també s'han associat a MDDS, ja que la via *de novo*, on la ribonucleòtid reductasa té un paper clau i que es dona en el citosol i aporta dNTPs al mitocondri, es veu afectada (Secció 2.2.1.1). Per una banda, mutacions en la subunitat gran R1 (codificada per *RRM1*) s'han trobat en cinc pacients de quatre famílies diferents i causen ptosi, oftalmoplegia i miopatia, a part d'altres símptomes diferents entre els pacients¹⁸⁰. Per altra banda, mutacions en una de les dues possibles subunitats petites, la subunitat p53R2 (codificada per *RRM2B*) que s'expressa en condicions de quiescència, causen afectacions greus com són encefalomiopatia fatal amb tubulopatia renal¹⁸¹, però també causen afectacions més lleus com són PEO o fenotips similars a MNGIE^{182,183,184,185,186,187}. Cal indicar que fins ara no s'han associat MDDS amb mutacions sobre la subunitat petita p53-independent de la ribonucleòtid reductasa R2, que s'expressa en condicions de replicació.

GUK1 és una NMPK/dNMPK de localització citosòlica que fosforila la guanosina monofosfat (GMP) i desoxiguanosina monofosfat (dGMP) cap a guanosina difosfat (GDP) i desoxiguanosina difosfat (dGDP), i per tant juga un paper important en la síntesi de dNTPs que poden ser utilitzats per a la replicació i manteniment de l'ADNmt. Recentment, mutacions en aquest gen s'han descrit en quatre pacients de tres famílies diferents amb una forma de MDDS que cursa amb fenotips diversos com són dany hepàtic, atròfia muscular i ptosi (Hidalgo et al, manuscrit enviat).

Mutacions en els dos enzims implicats en la ruta de salvament de dNTPs amb localització mitocondrial (TK2 i dGK) causen malalties molt greus. Per una banda, mutacions en *TK2* s'han associat a miopatia amb clínica molt variable, que va des de manifestacions molt greus en la infantesa que resulten en la mort del pacient per fallida respiratòria¹⁸⁸ a manifestacions miopàtiques més lleus amb una progressió més lenta i que típicament es donen en adults^{189,190,191}. Per altra banda, mutacions en *DGUOK* s'han associat amb hepatopatia i síndrome hepatocerebral^{192,193} que pot ser fulminant en pacients pediàtrics¹⁹⁴, tot i que en algun cas també s'ha associat amb formes miopàtiques en adults¹⁹⁵.

A banda dels gens esmentats, existeix un report aïllat d'un pacient adult amb ptosi, debilitat muscular proximal i deleccions múltiples en l'ADNmt, amb mutacions en el gen *GMPPR*, que codifica la guanosina monofosfat reductasa¹⁹⁶. Aquest enzim transforma la inosina monofosfat en guanosina monofosfat. Com que es tracta d'un cas aïllat i l'associació causal entre la disfunció de la guanosina monofosfat reductasa i les alteracions de l'ADNmt i disfunció mitocondrial no han estat demostrades, cal que es confirmi aquesta associació amb més pacients i més dades experimentals abans d'assumir que les mutacions en aquest gen són una causa de MDDS.

Taula 2.4. Gens associats a MDDS que codifiquen proteïnes que participen en el metabolisme de dNTPs. En la taula s'indica el gen; la proteïna; la seva funció; el tipus d'herència de les mutacions: autosòmica recessiva (AR) o autosòmica dominant (AD); l'afectació sobre l'ADNmt: depleció (D), delecions múltiples (DM) o mutacions puntuals (MP) i la referència del primer cas descrit amb associació amb les MDDS. *(Hidalgo et al, manuscrit enviat).

Gen	Proteïna	Funció	Herència	Afectació sobre l'ADNmt	Referència
<i>TYMP</i>	Timidina fosforilasa (TP)	Catabolisme de dNTPs citosòlic	AR	D/DM/MP	128
<i>RRM1</i>	Ribonucleòtid reductasa subunitat M1 (RRM1)	Anabolisme de dNTPs citosòlic	AR/AD	D/DM	180
<i>RRM2B</i>	Ribonucleòtid reductasa subunitat M2B (P53R2)	Anabolisme de dNTPs citosòlic	AR/AD	D/DM	181
<i>GUK1</i>	Guanilat kinasa (GUK1)	Anabolisme de dNTPs citosòlic	AR	D/DM	*
<i>TK2</i>	Timidina kinasa (TK2)	Anabolisme de dNTPs mitocondrial	AR	D/DM	188
<i>DGUOK</i>	Desoxiguanosina kinasa (dGK)	Anabolisme de dNTPs mitocondrial	AR	D/DM	192

Taula 2.5. Gens associats a MDDS que codifiquen proteïnes que participen la dinàmica mitocondrial. En la taula s'indica el gen; la proteïna; la seva funció; el tipus d'herència de les mutacions: autosòmica recessiva (AR) o autosòmica dominant (AD); l'afectació sobre l'ADNmt: depleció (D), delecions múltiples (DM) o mutacions puntuals (MP) i la referència del primer cas descrit amb associació amb les MDDS.

Gen	Proteïna	Funció	Herència	Afectació sobre l'ADNmt	Referència
<i>OPA1</i>	Proteïna dynamin-like 120 KDa (OPA1)	Fusió mitocondrial	AD	DM	197
<i>MFN2</i>	Mitofusina 2 (MFN2)	Fusió mitocondrial	AR/AD	D/DM	198
<i>SPG7</i>	Paraplegina	Subunitat de la proteasa m-AAA	AR	DM	199
<i>AFG3L2</i>	AFG3-like protein 2 (AFG3L2)	Subunitat de la proteasa m-AAA	AD	DM	200
<i>MSTO1</i>	Misato	Fusió mitocondrial	AR	D	201
<i>MICOS13</i>	Subunitat MIC13 del complex MICOS	Formació de les crestes mitocondrials	AR	D	202

2.4.3. Gens implicats en la dinàmica mitocondrial

La dinàmica mitocondrial consisteix en la fusió i fissió dels mitocondris per respondre a les necessitats cel·lulars, ja que els mitocondris no es troben com a orgànuls aïllats entre ells, sinó que formen una xarxa dinàmica. Aquest procés permet l'intercanvi de metabòlits, com són els dNTPs, l'intercanvi d'enzims que participen en la replicació de l'ADN o l'intercanvi de molècules d'ADNmt^{203,204}. Així doncs, aquest procés participa de forma indirecta en el correcte manteniment de l'ADNmt i per aquest motiu mutacions en gens que codifiquen proteïnes que participen en aquests processos s'han associat amb MDDS (Taula 2.5).

El procés de fusió mitocondrial requereix l'acció de tres GTPases, que utilitzen l'hidròlisi del GTP per obtenir energia i dur a terme les seves funcions. Aquestes proteïnes són mitofusina 1 i 2 (codificades per *MFN1*, *MFN2*), per fusionar la membrana externa mitocondrial i OPA1 (codificada per *OPA1*), per fusionar la membrana interna mitocondrial¹⁵. OPA1, a part de participar en la dinàmica mitocondrial, es creu que pot participar en l'ancoratge de l'ADNmt a la membrana mitocondrial interna²⁰⁵. Només s'han trobat mutacions associades a MDDS en dos gens directament implicats en la fusió mitocondrial: *MFN2* i *OPA1*. Mutacions en *MFN2* causen neuropatia axonal, atròfia òptica i la malaltia de Charcot – Marie – Tooth¹⁹⁸, mentre que mutacions en *OPA1* causen atròfia òptica i síndrome de Behr, que cursa amb atròfia òptica i afectacions neurològiques que inclouen atàxia, signes piramidals, espasticitat i retard mental¹⁹⁷.

A part de les mutacions en els dos gens involucrats directament en la fusió mitocondrial (*MFN2* i *OPA1*), també s'han descrit mutacions en altres gens que participen de forma indirecta en la dinàmica mitocondrial com són *MSTO1*, *MICOS13*, *AFG3L2* i *SPG7* (Taula 2.5).

La proteïna Misato (codificada per *MSTO1*) està localitzada en la membrana mitocondrial externa i té un rol desconegut en la fusió mitocondrial, ja que només es sap que el seu silenciament causa fragmentació mitocondrial²⁰⁶. Mutacions en aquest gen causen miopatia i atàxia^{201,207}.

MICOS13 o també anomenat *QIL* (*Mitochondrial COntact Site and cristae organizing system subunit 13*) codifica MIC13, que és una proteïna que forma part del sistema MICOS. Aquest sistema està present en la membrana mitocondrial interna i intervé en la formació de les

invaginacions per formar les crestes mitocondrials²⁰⁸. Mutacions en aquest gen causen hepatooencefalopatia^{202,209,210}.

Tant AFG3L2 com paraplegina (codificada per *SPG7*) es troben formant part d'un mateix complex de proteïnes anomenat proteasa m-AAA, que es localitza en la membrana mitocondrial interna i s'encarrega del control de qualitat de proteïnes²¹¹. Mutacions en *AFG3L2* causen un mal processament de la proteïna OPA1 que porta a fragmentació mitocondrial i al desenvolupament de MDDS que es manifesta amb PEO, atròfia òptica i atàxia cerebel·losa^{200,212}. Mutacions en *SPG7*, causen PEO i espasticitat^{199,213}. Tot i que mutacions en aquest gen no s'han associat directament a un defecte d'OPA1, es creu que també el podrien causar, ja que es troba formant part del mateix complex que AFG3L2.

2.4.4. Gens implicats en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut

Aquesta categoria inclou gens que participen en una gran varietat de processos i que, a la vegada, intervenen de forma indirecta en el correcte manteniment de l'ADNmt, encara que de forma desconeguda (Taula 2.6). D'aquests gens, quatre codifiquen canals transportadors localitzats en la membrana interna mitocondrial (*SLC25A4*, *MPV17*, *SLC25A21* i *SLC25A10*), tres codifiquen proteïnes que interaccionen amb un enzim implicat en el metabolisme de dNTPs, la NDPK (*SUCLA2*, *SUCLG1* i *ABAT*) i la resta participa en altres processos que també afecten l'ADNmt de forma desconeguda.

SLC25A4 codifica la isoforma cardíaca i muscular del transportador d'ADP i ATP mitocondrial ANT1. Ni l'ADP ni l'ATP no formen part de l'ADN i aquesta proteïna no participa directament en el metabolisme dels dNTPs, però alguns autors la inclouen en aquesta categoria assumint que un desequilibri de l'ADP i l'ATP mitocondrial pot generar indirectament alteracions en l'homeòstasi dels dNTPs. Mutacions en aquest gen causen PEO²¹⁴.

MPV17 codifica una proteïna localitzada en la membrana mitocondrial interna que es creu que és un canal²¹⁵ de funció desconeguda, tot i que alguns autors han postulat que podria estar implicada en el transport de dNTPs²¹⁶, ja que diferents mutacions *in vivo* i *in vitro* s'han associat a una disminució de dGTP i dTTP, a part de depleció de l'ADNmt²¹⁷. Mutacions en

aquest gen causen hepatoencefalopatia. Les manifestacions hepàtiques són molt greus i causen fallida hepàtica i la mort en la infantesa. Les alteracions neurològiques inclouen retard en el desenvolupament i hipotonia^{218,219}. També s'han descrit casos d'aparició en edat adulta que cursen amb leucoencefalopatia²²⁰ o encefalopatia²²¹.

SLC25A21 és un transportador localitzat en la membrana mitocondrial interna i que catalitza el transport d'àcid oxoadípic (intermediari de la síntesi de lisina, triptòfan i hidroxilisina) i oxoglutarat (intermediari del cicle de Krebs). Només s'ha descrit un cas de mutacions en aquest gen associat a MDDS que cursa amb atròfia muscular²²². SLC25A10 és un transportador localitzat en la membrana mitocondrial interna que mou àcids dicarboxílics (emprats en el cicle de Krebs) acoblant el seu transport a l'intercanvi de fosfat, sulfat o tiosulfat. Així doncs, aquest transportador participa en el cicle de Krebs i en el metabolisme del sofre²²³. Mutacions en aquest gen s'han descrit en un únic pacient que mostrava anèmia microcítica i miopatia que es manifestava amb hipotonia i quadriparesis²²⁴.

Hi ha tres gens que en els articles on es van associar a MDDS i en algunes revisions bibliogràfiques posteriors s'han classificat com a gens implicats en el metabolisme de dNTPs, encara que no hi estan directament relacionats. Els dos primers gens són *SUCLG1* i *SUCLA2*. Aquests dos gens codifiquen subunitats que formen part de la succinil CoA sintetasa (SCS), un enzim del cicle de Krebs que forma succinat a partir de succinilCoA. La SCS és un heterodímer format per la subunitat α (codificada per *SUCLG1*) i una subunitat β (codificada per *SUCLA2* o *SUCLG2*). L'associació de la subunitat α amb una o altra subunitat β depèn del teixit: l'associació amb la subunitat β codificada per *SUCLA2* es dona en múscul i cervell i l'associació de la subunitat β codificada per *SUCLG2*, en fetge i ronyó. A més, l'associació de la subunitat α amb una o altra subunitat β té implicacions en el producte generat per la reacció: la subunitat β codificada per *SUCLA2* genera ATP i la subunitat β codificada per *SUCLG2* genera GTP²²⁵. El motiu pel qual aquests dos gens (*SUCLG1* i *SUCLA2*) se'ls ha associat amb el metabolisme de dNTPs és que experiments d'immunoprecipitació han mostrat interacció entre aquests dos factors i la NDPK⁶⁸. El motiu pel qual en algunes revisions bibliogràfiques i en aquesta tesi no es classifiquen dins de la categoria d'alteracions en el metabolisme de dNTPs és perquè no hi ha evidència que aquestes proteïnes

intervinguin en el metabolisme dels dNTPs ni que mutacions en aquests gens causin perturbacions en la seva homeòstasi.

En una revisió recent s'han recopilat les dades clíniques dels 33 pacients descrits amb mutacions en *SUCLG1* i dels 64 pacients descrits amb mutacions en *SUCLA2*²²⁵, que solen cursar amb encefalomiopatia i amb acidosi causada per àcid metilmalònic²²⁶, encara que mutacions en el primer gen resulten en fenotips més greus amb implicació hepàtica^{227,228,229}. Curiosament, no s'ha descrit cap mutació associada a MDDS en l'altra subunitat β de l'enzim SCS (codificada per *SUCLG2*), la qual cosa podria ser deguda a que això sigui incompatible amb la vida²³⁰.

Un dels possibles mecanismes patogènics del dèficit de *SUCLA2* és a través de l'increment de la succinilació de residus de lisina de proteïnes, com a conseqüència de l'augment del substrat de la SCS, el succinil CoA, que no pot passar a succinat per la inactivació de la subunitat β codificada per *SUCLA2* que està mutada. L'increment de la succinilació porta a una inactivació de proteïnes i podria explicar part del fenotip de la malaltia, encara que la depleció de l'ADNmt observada en els pacients és independent de l'excés de succinilació²³¹.

El tercer gen que en alguns casos s'ha classificat dins del grup d'alteracions del metabolisme de dNTPs, però que no hi està relacionat, és *ABAT*. Aquest gen codifica la gamma-aminobutirat aminotransferasa, que catalitza la transaminació de l'àcid gamma aminobutíric (GABA) i 2-oxoglutarat, cap a succinat semialdehid i L-glutamat²³². S'ha descrit que mutacions en aquest gen causen encefalomiopatia⁶⁹. El motiu pel qual s'ha associat aquest gen al metabolisme de dNTPs és perquè la proteïna gamma-aminobutirat aminotransferasa immunoprecipita amb NDPK i perquè la suplementació amb dNTPs en cultius de fibroblasts de pacients amb mutacions en *ABAT* rescata la depleció de l'ADNmt *in vitro*⁶⁹. El fet de que la suplementació amb dNTPs reverteixi la depleció de l'ADNmt no indica necessàriament que aquest gen estigui implicat en el metabolisme de dNTPs, ja que també s'ha descrit reversió de depleció amb dNTPs en casos de mutacions en gens no implicats en el metabolisme de dNTPs^{217,233}. Per tant, *ABAT* participa en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut.

GFER codifica un factor de creixement (factor de creixement ERV1-like) que té activitat sulfhidril oxidasa depenent de FAD i que participa com a xaperona en l'espai intermembrana²³⁴. Mutacions en aquest gen causen cataractes, hipotonia muscular progressiva, pèrdua d'oïda i retard en el desenvolupament^{235,236}.

AGK codifica l'acilglicerol kinasa, un enzim que fosforila monoacilglicerol i diacilglicerol cap a àcid fosfatídic, que és un component de la membrana mitocondrial i un precursor de la cardiolipina, un fosfolípid present només en la membrana mitocondrial interna²³⁷. Aquests dos lípids es troben associats a la proteïna transportadora d'ADP i ATP mitocondrial ANT1 (presentada a l'inici d'aquesta secció) i es creu que són importants per a la seva funció^{238,239}. D'aquesta manera l'acció de l'AGK sobre el manteniment de l'ADNmt podria estar relacionada amb l'estabilitat d'ANT1. Mutacions en aquest gen causen la síndrome de Sengers que cursa amb cataractes, cardiomiopatia hipertròfica, miopatia esquelètica, intolerància a l'exercici i acidosi làctica^{240,241}.

FBXL4 codifica la proteïna *F-box and leucine-rich repeat protein 4*, que està localitzada en l'espai intermembrana i que en el citoplasma està relacionada amb la ubiquitinització^{242,243}. Es desconeix la relació entre aquesta proteïna i el manteniment de l'ADNmt, tot i que en un model de ratolí s'ha vist que la depleció de l'ADNmt observada és deguda a mitofàgia²⁴⁴. Mutacions en aquest gen causen encefalomiopatia^{245,246}.

MRM2 és una metiltransferasa que metila la uridina en una posició en concret de la subunitat gran de l'ARNr 16S²⁴⁷. Mutacions en *MRM2* s'han descrit en un únic pacient que amb presentació clínica similar a MELAS.

C1QBP està localitzada en la matriu mitocondrial i té una funció desconeguda, tot i estar relacionada amb inflamació. Mutacions en aquest gen causen cardiomiopatia i PEO^{248,249}.

Taula 2.6. Gens associats a MDDS que codifiquen proteïnes que participen en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut. En la taula s'indica el gen; la proteïna; la seva funció; el tipus d'herència de les mutacions: autosòmica recessiva (AR) o autosòmica dominant (AD); l'afectació sobre l'ADNmt: depleció (D), delecions múltiples (DM) o mutacions puntuals (MP) i la referència del primer cas descrit amb associació amb les MDDS.

Gen	Proteïna	Funció	Herència	Afectació sobre l'ADNmt	Referència
<i>SLC25A4</i>	ADP/ATP translocasa 1 (ANT1)	Transportador d'ADP/ATP	AD/AR	DM	214
<i>MPV17</i>	MPV17	Canal de membrana amb funció desconeguda	AR	D/DM	218
<i>SLC25A21</i>	Transportador de 2-oxodicarboxilat (SLC25A21)	Transportador d'àcid oxoadípic	AR	D	222
<i>SLC25A10</i>	Transportador d'àcid dicarboxílic (SLC25A10)	Transportador d'àcids dicarboxílics	AR	D	224
<i>SUCLA2</i>	Succinat CoA lligasa subunitat beta (SUCLA2)	Cicle de Krebs	AR	D	228
<i>SUCLG1</i>	Succinat CoA lligasa subunitat alpha (SUCLG1)	Cicle de Krebs	AR	D	227
<i>ABAT</i>	4-aminobutirat aminotransferasa (ABAT)	Aminotransferasa	AR	D	69
<i>AGK</i>	Acilglicerol kinasa (AGK)	Metabolisme lipídic	AD	D	240
<i>GFER</i>	Proteïna 40 de l'acoblament i import a l'espai intermembrana (GFER)	Factor de creixement	AR	DM	235
<i>FBXL4</i>	<i>F-box/LRR-repeat protein 4</i> (FBXL4)	Ubiquitinització	AR	D	245
<i>MRM2</i>	ARNr metiltransferasa 2 (MRM2)	Modificació de l'ARNr	AR	D	247
<i>C1QBP</i>	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein</i> (C1QBP)	Inflamació	AR	DM	248

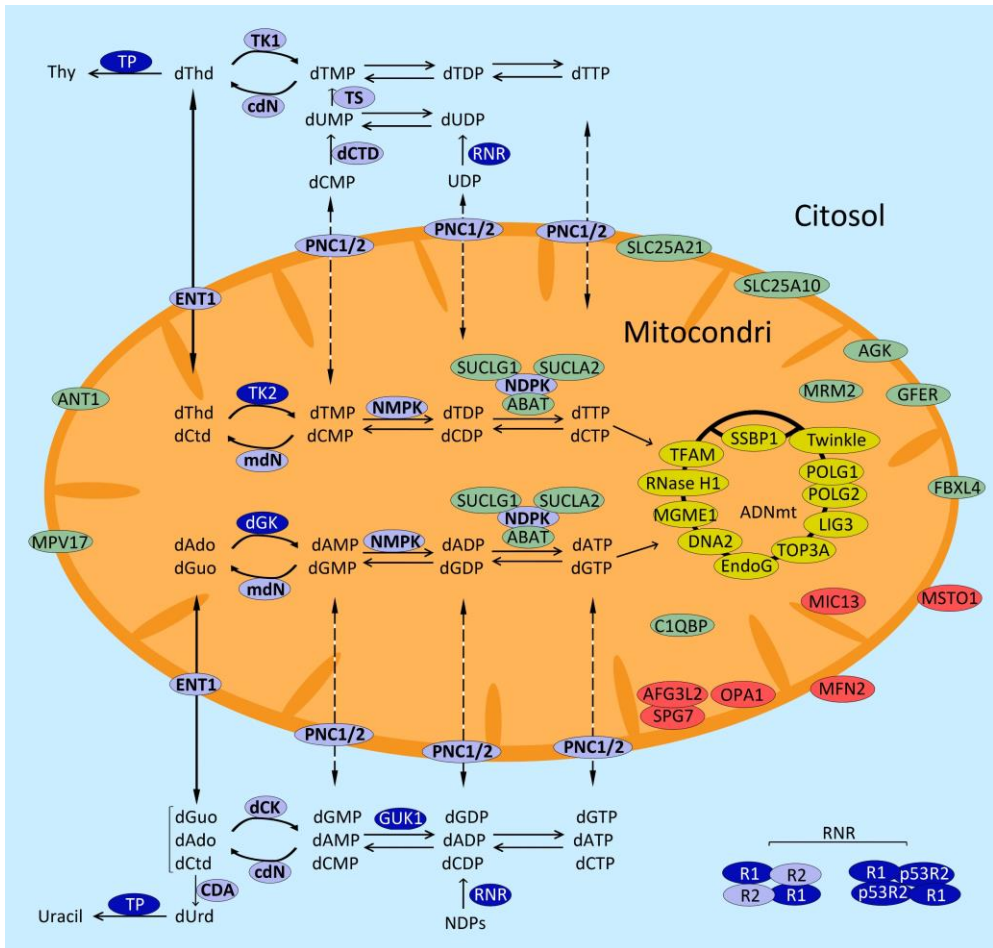


Figura 2.5. Rutes metabòliques i proteïnes amb afectacions causants de MDDS. Les proteïnes que estan involucrades en la replicació de l'ADNmt i en les quals s'han descrit mutacions associades a MDDS estan dibuixades en groc. Les proteïnes que estan involucrades en el metabolisme de dNTPs estan dibuixades en blau (blau fosc per a les proteïnes d'aquest grup en les quals s'han descrit mutacions associades a MDDS). Les proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial en les quals s'han descrit mutacions associades a MDDS estan dibuixades en roig. Les proteïnes en les que s'han descrit mutacions associades a MDDS i que participen en el manteniment de l'ADNmt a través d'un mecanisme desconegut estan dibuixades en verd. Figura modificada a partir de ⁷².

2.4.5. Models experimentals de MDDS

Donat que les MDDS poden ser causades per mutacions en diferents gens donant lloc a fenotips molt heterogenis, és difícil establir un model d'aquestes síndromes. Tot i així, s'han pogut desenvolupar diferents models *in vitro* i *in vivo*.

2.4.5.1. Models *in vitro*

Encara que existeix la possibilitat d'estudiar les alteracions de la replicació de l'ADNmt a través de múltiples aproximacions *in vitro* (com és la replicació *in vitro* a partir de proteïnes purificades o models *in organello*), en aquest apartat ens limitarem a introduir el potencial de l'ús de cèl·lules del pacient per estudiar la malaltia com a model *in vitro*.

Els millors tipus cel·lulars on estudiar les MDDS són aquells que estan més afectats i que pateixen les alteracions moleculars que porten a la malaltia. Normalment, aquests tipus cel·lulars són les cèl·lules musculars, hepàtiques o nervioses, però la seva obtenció en pacients vius és molt difícil, molt invasiva o inviable. Per aquest motiu, el tipus cel·lular amb el que més es treballa són els fibroblasts primaris de pell, que es poden obtenir mitjançant una biòpsia de pell, una tècnica poc invasiva. De tota manera, els fibroblasts de pell tenen una limitació com a model d'aquestes síndromes, ja que aquest teixit no es veu afectat en cap de les formes de MDDS i, per tant, sovint no reproduïxen els fenotips moleculars observats en els teixits més afectats dels pacients com són la presència de delecions múltiples o la depleció de l'ADNmt. Entre els pocs casos de fibroblasts de pell que desenvolupen depleció espontània en cultiu es troben els mutants en *DGUOK*⁸⁵ i en *MPV17*²¹⁷.

Per poder emprar els fibroblasts primaris de pell com a model de MDDS s'han desenvolupat models experimentals alternatius. Una opció consisteix en forçar artificialment la depleció de l'ADNmt amb agents químics i estudiar la recuperació de les molècules d'ADN un cop retirat el mateix.

La depleció de l'ADNmt en els fibroblasts es pot induir mitjançant l'ús de bromur d'etidi (BrEt). Aquest agent intercalant de l'ADN s'uneix de forma reversible²⁵⁰ preferiblement a l'ADNmt quan s'utilitza a dosis baixes²⁵¹, però quan s'utilitza a dosis més altes també afecta l'ADNn²⁵². La selectivitat del BrEt per l'ADNmt es deu a que la membrana mitocondrial

afavoreix la seva acumulació en la matriu mitocondrial a causa del potencial de membrana negatiu²⁵². El mecanisme pel qual el BrEt indueix la depleció sobre l'ADNmt no està molt clar, encara que es sap que aquest agent indueix superenrotllament i canvis en l'estructura de l'ADNmt^{250,253} que dificulten la transcripció²⁵⁴ i que també podrien afectar l'accés de la maquinària de replicació, que portaria a la depleció. L'ús del BrEt ha estat àmpliament emprat en els models de fibroblasts de MDDS^{233,255}. També s'utilitza per crear les cèl·lules Rho0, que no tenen ADNmt com a resultat d'incubar les cèl·lules amb BrEt durant llargs períodes de temps i múltiples divisions cel·lulars²⁵⁶. Com a alternativa al BrEt també s'ha proposat l'ús d'anàlegs de nucleòsids que trunquen la replicació de l'ADN com per exemple la didesoxicitidina²⁵⁷.

En el model d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt primer s'incuben les cèl·lules amb BrEt durant uns dies (el nombre de dies varia segons l'experiment, però és al voltant de 10 dies) per induir la seva depleció. Posteriorment, es retira el BrEt i es quantifica l'ADNmt a diferents temps i en diferents condicions experimentals per monitorar l'evolució del seu nombre de còpies.

Alternativament a l'ús de fibroblasts està l'ús de mioblasts. Els mioblasts es poden obtenir directament de biòpsia muscular²⁵⁸, mitjançant un procediment invasiu o mitjançant la diferenciació de fibroblasts cap a mioblasts *in vitro* mitjançant l'ús del factor diferenciador de múscul MyoD²⁵⁹. Els mioblasts tenen l'avantatge que representen un dels teixits més afectats en els pacients, tot i que a vegades tampoc mostren depleció de l'ADNmt i cal induir-la amb BrEt²⁵⁸.

Tots aquests models han servit a l'estudi de la replicació de l'ADNmt pel que fa al seu nombre de còpies. La presència de delecions múltiples no s'ha observat²⁵⁸ o no s'ha estudiat²⁵⁹ en aquests models experimentals.

2.4.5.2. Models *in vivo*

Els models de MDDS *in vivo* s'han desenvolupat en diferents organismes com són el model que té una polimerasa gamma susceptible de fer errors en *Caenorhabditis elegans*²⁶⁰, els models de peix zebra (*Danio rerio*) KO per *polg*²⁶¹, per *mpv17*^{262,263}, per *sucla2*²³¹ o per

*dguok*²⁶⁴ o el model KO per *Dguok* en rata (*Ratus norvegicus*)²⁶⁵, encara que la majoria de models s'han fet en ratolins (*Mus musculus*) (Taula 2.7).

De tots els models animals de MDDS, en destaquem dos, que són els que s'han utilitzat en aquesta tesi: el ratolí KO per *Tk2* (*Tk2*^{-/-})²⁶⁶ i el ratolí KO per *Dguok* (*Dguok*^{-/-})²⁶⁷.

2.4.5.2.1. Ratolí KO per *Tk2*

El ratolí KO per *Tk2* (*Tk2*^{-/-}) generat a l'any 2008²⁶⁶, es va obtenir reemplaçant l'exó IV i part del V del gen per un *cassette* de resistència a neomicina. La regió delecionada de *Tk2* codifica el lloc d'unió al substrat de l'enzim, que és essencial per a que aquest dugui la seva funció, de manera que els ratolins homozigots KO manquen activitat TK2.

Els ratolins heterozigots per l'al·lel KO de *Tk2* tenen una aparença normal, de forma coherent amb l'herència recessiva del dèficit de TK2 i els ratolins homozigots KO per *Tk2* són viables i també tenen una aparença normal fins als 7 dies d'edat, moment a partir del qual s'observa un retard en el creixement respecte als animals salvatges o *wild-type* (WT). A partir d'aquest moment, els ratolins KO per *Tk2* presenten una alta mortalitat a partir de les dues setmanes de vida i cap animal viu més de 30 dies.

Quan es va estudiar l'ADNmt en aquest model es va veure que el múscul esquelètic, el cor, el fetge i la melsa dels ratolins KO per *Tk2* mostraven un nombre de còpies similar al dels animals WT en el moment del naixement mentre que el cervell i teixit adipós ja mostrava depleció en aquest moment. Als 14 dies d'edat la depleció es mostrava en tots els teixits esmentats amb una reducció que anava del 40 al 80%. Tot i haver depleció, no es va descriure presència de delecions múltiples o mutacions puntuals sobre l'ADNmt²⁶⁶.

Pel que fa a l'estudi histològic, no es van veure anormalitats en cap teixit excepte en cor, fetge i teixit adipós subcutani. Els ratolins KO per *Tk2* mostraven fibres desorganitzades en el cor i disrupcions de les crestes mitocondrials als 14 dies d'edat. En aquesta edat també es va veure un increment de vesícules lipídiques intracel·lulars en el fetge i una disminució quasi completa del teixit adipós subcutani que causava hipotèrmia i tremolors en els animals. L'expressió de gens relacionats amb el metabolisme de dNTPs només es va estudiar en fetge de ratolins de 7 dies on no es va veure cap efecte compensatori en els ratolins que mancaven TK2²⁶⁶.

Taula 2.7. Models de ratolí amb afectacions en gens relacionats amb les MDDS. En la taula s'indica la modificació genètica, el teixit que expressa la modificació genètica, el seu efecte sobre l'ADNmt i la referència on es descriu el model.

Gen	Modificació genètica	Teixit	Afectació sobre l'ADNmt	Referència
<i>Polg</i>	<i>Polg</i> ^{Y955C/Y955C}	Cor	Depleció en cor	268
<i>Polg</i>	<i>Polg</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en embrions i letalitat embrionària	269
<i>Polg</i>	<i>Polg</i> ^{D257A/D257A}	Ubicu	Delecions múltiples i mutacions puntuals	270
<i>Polg2</i>	<i>Polg2</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en embrions i letalitat embrionària	271
<i>Twink</i>	<i>Twink</i> ^{dup353-365}	Ubicu	Depleció en cervell. Delecions múltiples en cervell i múscul esquelètic	272
<i>Rnaseh1</i>	<i>Rnaseh1</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en embrions i letalitat embrionària	273
<i>Rnaseh1</i>	<i>Rnaseh1</i> ^{-/-}	Cor i múscul esquelètic	Depleció i delecions múltiples en cor i múscul esquelètic	38
<i>Mgme1</i>	<i>Mgme1</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció i delecions múltiples en cor, cervell, fetge i ronyons.	274
<i>Rrm2b</i>	<i>Rrm2b</i> ^{-/-}	Ubicu	ADNmt no estudiat	275
<i>Tymp i Upp1</i>	<i>Tymp</i> ^{-/-} <i>Upp1</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en cervell	135
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{-/-}	Cor i múscul esquelètic	Depleció en cor i múscul esquelètic	276
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{-/-}	Fetge	Depleció en fetge	277
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{H126N/H126N}	Ubicu	Depleció en cervell, múscul esquelètic, ronyons i cor	278
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en múscul esquelètic, cervell, fetge, teixit adipós i melsa	266
<i>Dguok</i>	<i>Dguok</i> ^{F180S/F180S}	Ubicu	Depleció en fetge, cervell i glàndula adrenal	279
<i>Dguok</i>	<i>Dguok</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en fetge, múscul esquelètic, cervell i cor	267
<i>Opa1</i>	<i>Opa1</i> ^{+/-}	Ubicu	No hi ha depleció en mostres d'orella	280
<i>Mpv17</i>	<i>Mpv17</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en fetge i múscul esquelètic	281,282
<i>Slc25a4</i>	<i>Slc25a4</i> ^{-/-}	Cor i múscul esquelètic	ADNmt no estudiat	283
<i>Sucla2</i>	<i>Sucla2</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en embrions i letalitat embrionària	284
<i>Sucla2 i Suclg1</i>	<i>Sucla2</i> ^{+/-} <i>Suclg1</i> ^{+/-}	Ubicu	Depleció en cervell i fetge	285
<i>Fbxl4</i>	<i>Fbxl4</i> ^{-/-}	Ubicu	Depleció en embrions	244

Quan es va estudiar el múscul esquelètic en profunditat es va veure que l'estructura dels mitocondris estava alterada i els mio blasts de ratolins KO per *Tk2* proliferaven i es diferenciaven menys cap a miotubs que els dels animals WT, fet que contribueix al fenotip miopàtic del dèficit de TK2 en ratolins²⁸⁶.

Aquest model, de forma semblant al que passa amb molts dels models animals de MDDS, no mostra exactament la patologia observada en humans, ja que els pacients amb dèficit de TK2 presenten principalment afectació miopàtica¹⁹¹, mentre que aquest model murí, encara que té una depleció marcada en el múscul esquelètic, té una afectació més clara en el sistema nerviós.

Aquest model ha estat utilitzat posteriorment per introduir la desoxiribonucleòsid kinasa (dNK) de *Drosophila melanogaster* (*Dm-dNK*), que, a diferència de la TK2, pot fosforilar els quatre dNs. Aquesta estratègia va aconseguir un increment en la fosforilació de la dThd, amb el consegüent augment del dTTP, que va evitar la depleció de l'ADNmt en cervell i múscul esquelètic. A més, en consonància amb el notable augment del dTTP en múscul esquelètic (un increment de més de 100 vegades respecte als valors de ratolins WT) i l'augment del dATP, dCTP i dGTP (de 2 a 5 vegades respecte a ratolins WT), tant els ratolins WT com KO per *Tk2* que expressaven el gen *Dm-dNK* van mostrar un augment d'enzims catabòlics com la TP, l'ADA, la CDA i la PNP. Com a resultat de l'augment de dNTPs i de la reversió de la depleció de l'ADNmt en cervell i múscul esquelètic, la supervivència dels ratolins KO per *Tk2* que expressaven *Dm-dNK* van ser igual a la dels ratolins WT, tot i tenir depleció en el fetge. A més, els ratolins KO per *Tk2* que expressaven *Dm-dNK* no van patir cap alteració, excepte tenir una quantitat menor de teixit adipós subcutani i visceral, que feia que aquests ratolins fossin més petits que els WT^{287,288}, tot indicant el paper específic i indispensable de TK2 en el metabolisme lipídic en el fetge.

Adicionalment, existeix un model KI per *Tk2*, al qual se li han introduït el canvi H126N en la proteïna²⁷⁸. El fenotip d'aquest ratolí és molt similar al KO per *Tk2* presentat anteriorment²⁶⁶, ja que el KI presenta debilitat muscular als 10 dies i cap individu viu més de 24 dies. A més, aquest model presenta alteracions en el contingut mitocondrial de dNTPs en cervell i fetge i depleció de l'ADNmt en cervell, múscul, ronyó, cor i medul·la espinal.

2.4.5.2.2. Ratolí KO per *Dguok*

El ratolí KO per *Dguok* (*Dguok*^{-/-}) es va generar l'any 2019 eliminant l'exó 2 del gen²⁶⁷. El desenvolupament dels ratolins KO per *Dguok* en les primeres etapes és com el dels animals WT, fins a la setmana 6, quan s'observa una disminució de pes en els dos sexes degut a una pèrdua de teixit adipós. Pel que fa a la supervivència, els ratolins KO per *Dguok* no van presentar més mortalitat, almenys fins als 5 mesos d'edat, que és l'edat màxima de seguiment que es va fer en la primera caracterització del model.

Pel que fa a l'ADNmt, els ratolins KO per *Dguok* presenten una depleció quasi total als 2 i 5 mesos d'edat en fetge. El cervell, cor i múscul esquelètic també mostraven depleció però no tan marcada. Com a resultat de la depleció de l'ADNmt en el fetge hi havia una reducció dels components de la CTE codificats per l'ADNmt, però no dels que estan codificats per l'ADNn. La reducció dels components en el múscul esquelètic també hi és present però no de forma tan marcada²⁶⁷.

Com que aquest ratolí mostra un fenotip d'afectació hepàtica, similar al que s'ha vist en molts pacients amb mutacions en *DGUOK*, s'ha estudiat aquest òrgan en profunditat en el model murí i s'ha vist que aquest té més cèl·lules en replicació i més estrès oxidatiu que s'associa a dany hepàtic i que es corrobora amb l'augment de les transaminases alanina aminotransferasa (ALT) i aspartat aminotransferasa (AST). A més, a nivell hepàtic hi ha una activació del catabolisme de lípids, els components de l'enzim RNR (RRM1 i RRM2), claus en la síntesis de dNTPs per la via *de novo*, mentre que els nivells d'expressió d'enzims de la via de salvament com són TK2 i dCK no estan augmentats²⁶⁷.

Posteriorment, l'any 2021, es va publicar un altre treball pel mateix grup on aprofundien més en la caracterització del fenotip i feien un seguiment en edats més avançades en el mateix model murí. En aquest estudi es va observar el mateix grau de depleció en tots els teixits estudiats als 12 mesos d'edat²⁸⁹. Addicionalment, es va observar una caiguda dels nivells de proteïnes que formen part de la CTE de codificació mitocondrial i nuclear, però no dels seus ARNm. Al mateix temps també es va veure una caiguda en l'expressió de proteïnes involucrades en la traducció mitocondrial i dels ARNt codificats per l'ADNmt, tot suggerint una resposta compensatòria a nivell de transcripció de components de la CTE que era

truncada per la falta de traducció. Finalment, també es va veure un canvi metabòlic en els ratolins associat amb l'edat: en les primeres etapes hi havia més expressió de gens implicats en el metabolisme de la serina i folat, mentre que en les etapes més avançades hi havia més expressió de gens implicats en el cicle de Krebs²⁸⁹.

2.4.6. Tractament de les MDDS

Actualment no hi ha una cura per a cap MDDS i les aproximacions terapèutiques estan limitades al tractament d'alguns dels símptomes de forma inespecífica o no dirigida. L'avantatge d'aquests tractaments és que es poden aplicar a molts pacients amb malalties mitocondrials independentment de la seva causa genètica, encara que la seva eficàcia és limitada, ja que no actuen de forma específica sobre la causa directa de la patologia.

Algunes d'aquestes teràpies són l'ús d'antiepilèptics per tractar les convulsions²⁹⁰, alimentació nasogàstrica per tractar el dèficit alimentari, ventilació artificial o traqueotomia per tractar la disfunció respiratòria o operacions quirúrgiques per corregir la ptosi o les males postures com l'escoliosi o la cifosi⁷¹. Addicionalment, s'han proposat intervencions nutricionals com poden ser alimentació contínua per evitar hipoglucèmia⁷¹ o dietes cetogèniques riques en àcids grassos per estimular la β -oxidació²⁹¹. També s'ha proposat la suplementació de components de la CTE com succinat o ubiquinona en pacients amb mutacions en *MPV17*²⁹², levocarnitina, carnitina, coenzim Q10, idibenona o vitamines C, E o del grup B²⁹³. Tot i així, l'eficàcia de la suplementació no està molt clara²⁹⁴.

A part de les teràpies generals esmentades s'han desenvolupat teràpies dirigides que intenten solucionar algun dels problemes específics que presenta la malaltia. Aquestes estratègies, com que són dirigides, no es poden aplicar a tots els pacients amb patologies mitocondrials i van adreçades a pacients amb causes fisiopatològiques comunes.

Un exemple d'ús d'estratègies dirigides són els diversos tractaments proposats per MNGIE. Tal com s'ha descrit en la Secció 2.2.5, en aquesta malaltia hi ha una acumulació sistèmica de dThd i dUrd que causa un augment de dTTP i depleció de dCTP⁸⁵. Com una de les causes de la patologia és l'acumulació de dTTP secundari a l'acumulació de dThd s'ha plantejat l'hemodiàlisi per a eliminar l'excés d'aquest metabòlit que esdevé tòxic. La limitació d'aquest

procediment és que la dThd s'elimina de forma transitòria i torna a augmentar a les poques hores d'aturar el tractament¹²⁹.

Una alternativa per al tractament de MNGIE és el reemplaçament enzimàtic. S'ha plantejat l'encapsulació *ex vivo* de l'enzim TP d'*E.coli* recombinant en eritròcits propis del pacient. D'aquesta manera la TP recombinant dels eritròcits contribueix a baixar les concentracions de dThd i dUrd plasmàtics²⁹⁵. Aquesta teràpia té la limitació que encara que hi ha una baixada en la concentració de dThd i dUrd, aquesta no arriba als nivells de les persones sanes i cal fer periòdicament la infusió d'eritròcits amb la TP recombinant funcional^{296,297}. Finalment, com que la TP està altament expressada en plaquetes, limfòcits i fetge, i aquests actuen com a lloc de catabolització de la dThd i dUrd sistèmiques^{298,299} s'ha proposat el transplantament de moll d'ós³⁰⁰ o de fetge³⁰¹ com a teràpia, de manera que el nou òrgan que sí que té TP funcional pot eliminar l'excés dels dos dNs. Aquest dos últims procediments, tot i eliminar de forma definitiva l'excés de dThd i dUrd, són procediments molt agressius (especialment el transplantament de moll d'ós) i cal valorar la seva aplicació depenent de l'estat de salut del pacient amb MNGIE ³⁰².

El transplantament de fetge també s'ha dut a terme en pacients amb mutacions en *DGUOK*, *MPV17* i *POLG* on hi ha una greu afectació hepàtica, tot i que com que aquestes malalties són multisistèmiques, no s'aconsegueix curar la malaltia i només hi ha una millora en la simptomatologia hepàtica, que, d'altra banda, sol ser la causa de la mort³⁰³.

La teràpia gènica també s'ha proposat com a via per introduir un gen que doni lloc a una proteïna funcional que supleixi la disfuncional present en el pacient. Aquesta estratègia només ha estat desenvolupada en fases preclíniques en ratolins mutants per *Slc25a4*, on s'ha revertit el fenotip histològic³⁰⁴, en ratolins KO per *Mpv17*, on s'ha revertit la depleció de l'ADNmt i el dèficit del sistema OXPHOS en fetge³⁰⁵ o en el model murí de MNGIE, on s'ha observat una reducció dels nucleòsids en plasma en ratolins tractats amb un vector que tenia com a diana el teixit hematopoètic³⁰⁶ o el fetge^{307,308}.

Una altra aproximació terapèutica dirigida per al tractament de les MDDS és la suplementació amb dNs, en la qual es centra aquesta tesi i es desenvolupa en la següent secció.

2.4.6.1. Tractament amb dNs de MDDS relacionades amb el metabolisme de dNTPs

El tractament de les MDDS amb dNs té el seu origen en l'ús de desoxiribonucleòsid monofosfats (dNMPs) en MDDS causades per mutacions en gens relacionats amb el metabolisme dels dNTPs. L'any 2003 es va testar *in vitro* el tractament amb monofosfats de purina (dAMP i dGMP) en fibroblasts amb mutacions en *DGUOK*. Donat que les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK* tenen una pèrdua total o parcial de funció de l'enzim codificat per aquest gen (dGK) i no poden fosforilar els dNs de purina cap a monofosfat en el mitocondri (Figura 2.4), es va proposar una teràpia de *bypass* amb l'administració dels monofosfats, que són el producte de la reacció catalitzada per aquest enzim. Aquest estudi va mostrar que el tractament combinat dels dos monofosfats prevenia la depleció de l'ADNmt observat en les cèl·lules dels pacients³⁰⁹.

Dos treballs posteriors en cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*, un a l'any 2009 on es tractaven miotubs amb dAMP i dGMP²⁵⁸ i un a l'any 2012, on es tractaven fibroblasts de pell i miotubs diferenciats a partir de fibroblasts amb dAMP i dGMP³¹⁰, van mostrar que el tractament amb monofosfats també revertia la depleció de l'ADNmt.

Tot i així, es sap que els nucleòtids són compostos carregats que no poden travessar membranes, ja que no existeixen transportadors en la membrana plasmàtica que permetin el seu pas i, a més, aquests són desfosforilats per les fosfatases i exonucleotidases^{86,311}, la qual cosa plantejava interrogants sobre el mecanisme bioquímic subjacent a aquests resultats. Per aquest motiu, en un estudi posterior, es va administrar a fibroblasts amb mutacions en *DGUOK* els monofosfats de purina (dAMP i dGMP) i el seu efecte es va comparar amb el que s'observava tractant les mateixes cèl·lules amb els dNs (dAdo i dGuo), els dos substrats de l'enzim dGK. Els resultats van revelar que l'efecte positiu del tractament amb monofosfats també s'observava si es tractava amb els dNs. Aquests resultats es van interpretar com a que els monofosfats són compostos amb càrrega que no poden creuar membranes i són desfosforilats per ectonucleotidases en l'espai extracel·lular cap a dAdo o dGuo, que sí que poden difondre cap a l'interior de la cèl·lula, gràcies a l'acció de transportadors específics⁸⁵. La dAdo i dGuo, que són els dos substrats de la dGK (l'enzim mutat en els pacients), no es poden fosforilar (o només parcialment) a nivell mitocondrial

per aquest enzim en les cèl·lules deficientes en dGK, però sí que poden ser fosforilats per l'equivalent de la dGK en el citosol, la dCK, que és funcional en els pacients, i els desoxiribonucleòtids generats en el citosol poden entrar al mitocondri incrementant la quantitat de dNTPs⁸⁵ (Figura 2.4). De fet, l'ús de dAdo + dGuo també es va provar en un treball anterior mostrant eficàcia en la replicació de l'ADNmt en fibroblasts d'un pacient amb mutacions en *DGUOK*³¹².

L'ús de dNMPs també es va plantejar per al tractament de MDDS causades per mutacions en un altre gen involucrat en el metabolisme de dNTPs: *TK2*. En aquest cas, el model de ratolí KI de *Tk2*²⁷⁸ va ser tractat per via oral amb els monofosfats de pirimidina (dCMP i dTMP), que són els productes de la reacció catalitzada per l'enzim TK2 amb la idea de fer un *bypass* a l'enzim disfuncional (Figura 2.4), tal com s'havia plantejat amb les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*³⁰⁹. En aquest cas, els ratolins van mostrar un increment del contingut d'ADNmt, millora dels defectes en la CTE i van experimentar un augment en la supervivència³¹³.

Com s'ha indicat anteriorment, els monofosfats no poden creuar membranes i són desfosforilats cap a dNs per entrar a la cèl·lula^{86,311,314}, de manera que en un treball posterior es va comparar l'efecte del tractament amb monofosfats de pirimidina (dCMP i dTMP) amb el tractament amb dNs de pirimidina (dCtd i dThd) en el mateix model de ratolí KI per *Tk2*. Els dNs de pirimidina són el substrat de la TK2, però també dels seus dos enzims equivalents en el citosol, la dCK i la TK1, que són funcionals en el ratolí KI per *Tk2* i poden fosforilar aquests dos compostos cap a dCMP i dTMP, que poden ser importats al mitocondri i incrementar els dNTPs (Figura 2.4). En aquest treball es van veure els mateixos efectes positius amb el tractament amb dNs que amb els monofosfats^{315,316}, demostrant que l'efecte dels monofosfats és a través de la desfosforilació prèvia cap a dNs.

Un treball similar portat a terme sobre el ratolí KO per *Tk2*²⁶⁶ també va mostrar que els efectes del tractament oral amb dCtd i dThd eren idèntics als observats amb dCMP i dTMP (tant els efectes sobre el nombre de còpies de l'ADNmt com sobre la supervivència)³¹⁷. Tenint en compte que aquests ratolins eren KO per a *Tk2* (per tant, tenien absència absoluta d'activitat TK2), es va confirmar que l'efecte dels dNs és a través de la seva fosforilació per la dCK i TK1³¹⁷. D'aquesta manera, en el cas del dèficit de TK2, la teràpia amb dNs causa una

sobrecàrrega de dCtd i dThd que estimula la via de salvament citosòlica a través dels enzims dCK i TK1, respectivament, cap a la formació de monofosfats (dCMP i dTMP, respectivament), que poden ser importats al mitocondri pels transportadors de pirimidines PNC1 i PNC2³¹⁶, incrementant els nivells dels dNTPs en el mitocondri i fent un *bypass* a la falta de TK2 (Figura 2.4). Per aquest motiu a aquest mecanisme terapèutic se l'ha anomenat com a teràpia estimulada pel substrat³¹⁵.

En base als bons resultats del tractament amb dNMPs i dNs en els ratolins amb dèficit de TK2, el tractament amb dCtd + dThd es va aplicar de forma compassiva a una dosi oral de 400 mg/kg/dia en un estudi de 16 pacients amb dèficit de TK2 durant un període de temps que va d'11 a 47 mesos³¹⁸. El tractament va canviar la història natural de la patologia, ja que entre altres millores en la funció motora, respiratòria i pes corporal, es va observar un clar efecte positiu en la supervivència. Sense tractament només el 27% dels pacients amb debut en la infància i amb manifestacions greus sobreviuen després dels 2 anys del diagnòstic¹⁹¹, mentre que amb el tractament tots els pacients d'aquest subgrup estaven vius durant aquest període de temps³¹⁸, i de fet, continuen vius actualment (Figura 2.6). Addicionalment, el tractament no va causar efectes adversos greus i només va provocar diarrea en alguns pacients, que es va corregir ajustant la dosi i un augment de transaminases en dos pacients que es va corregir aturant el tractament³¹⁸. Un estudi posterior va avaluar més profundament l'efecte del tractament sobre la funció respiratòria, que està afectada en pacients amb dèficit de TK2, i es va veure millora en alguns dels símptomes³¹⁹. Actualment, l'ús dels dNs de pirimidina per al tractament del dèficit de Tk2 es troba en un assaig clínic actiu (NCT03845712).

Recentment, s'ha proposat i assajat la teràpia combinada d'administració de dNs de pirimidina i teràpia gènica per al tractament del dèficit de TK2 utilitzant el model murí KI per Tk2. Els resultats de l'estudi mostren que amb la teràpia combinada s'incrementa el contingut d'ADNmt en fetge i ronyó, a part d'allargar-se notablement la supervivència dels ratolins, tot indicant un efecte sinèrgic entre les dues intervencions terapèutiques³²⁰.

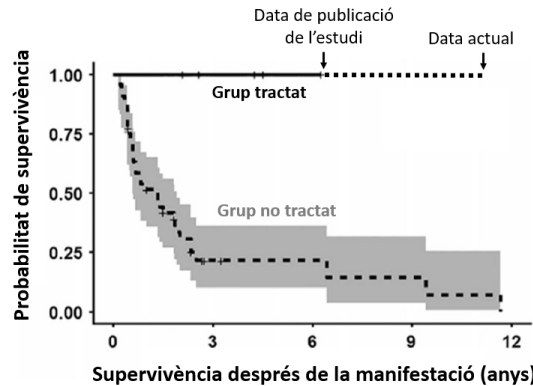


Figura 2.6. Supervivència dels pacients amb dèficit de TK2. El gràfic mostra en gris la supervivència de pacients amb dèficit de TK2 no tractats (obtinguda a partir de la història natural de la malaltia) i, en negre, la supervivència dels pacients amb dèficit de TK2 que han rebut tractament amb dCtd i dThd. En la línia de punts superior s'indica la supervivència del grup de pacients tractats des de la publicació de l'estudi fins a l'actualitat. Imatge modificada a partir de ³¹⁸.

L'ús de dNs també s'ha proposat en el tractament de MNGIE, on hi ha un excés de dThd que inhibeix competitivament la TK2 per a la fosforilació del seu altre substrat, la dCtd. Això resulta en una depleció secundària de dCTP (Secció 2.2.5). L'administració exògena de dCtd podria compensar aquesta inhibició i revertir la depleció del dCTP i en conseqüència de l'ADNmt^{85,130}.

Per altra banda, l'ús de dNs i dNMPs s'ha testat en cèl·lules amb mutacions en un altre gen associat al metabolisme de dNTPs: la *RRM2B*. Així doncs, s'ha comprovat que miotubs amb mutacions en *RRM2B* no reverteixen la depleció sobre l'ADNmt amb l'addició de dNMPs²⁵⁹ mentre que fibroblasts amb unes mutacions diferents en *RRM2B* sí que mostren reversió de la depleció quan es tracten amb dAdo, dCtd i dGuo³²¹.

2.4.6.2. Tractament amb dNs de MDDS no relacionades amb el metabolisme de dNTPs

El tractament amb dNMPs o dNs no només s'ha proposat per a MDDS causades per mutacions en gens que participen en el metabolisme dels dNTPs, sinó que també s'ha assajat de forma preclínica *in vitro* en models de MDDS causades per mutacions en gens que no participen directament en el metabolisme dels dNTPs. Un exemple d'aquest ús és el

tractament amb dNs en fibroblasts amb mutacions en *MPV17*, que van evitar la depleció de l'ADNmt observat en les cèl·lules no tractades²¹⁷.

També s'ha testat l'efecte dels dNMPs en dos models *in vitro* de dèficit de POLG: en miotubs obtinguts del pacient i en miotubs diferenciats a partir de fibroblasts obtinguts del pacient. En el cas de miotubs primaris, el tractament amb dAMP i dGMP va revertir de forma lleu la depleció observada en les cèl·lules²⁵⁸, mentre que els miotubs diferenciats a partir de fibroblasts revertien la depleció de l'ADNmt amb el tractament amb els 4 dNMPs²⁵⁹.

A part dels dos models *in vitro* en dèficit de POLG esmentats anteriorment, hi ha un tercer treball més recent que es centra en l'ús dels dNs, en comptes dels monofosfats. En aquest treball es va veure que els fibroblasts primaris de pacients amb mutacions que afecten diferents dominis de la proteïna POLG revertien totalment la depleció induïda de l'ADNmt en presència dels 4 dNs²³³. L'efecte dels dNs en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt també va ser reportat en un altre model cel·lular que consistia en cèl·lules mare neurals diferenciades a partir de fibroblasts portadors de mutacions en *POLG*²⁵².

L'eficàcia dels dNs en els models de dèficit de POLG, que és un gen relacionat amb el metabolisme de dNTPs i, per tant, no presenten una deficiència en la capacitat de síntesi d'aquests compostos, pot ser deguda a una estimulació de la replicació de l'ADNmt induïda per l'activació de la polimerasa gamma pels seus substrats, els dNTPs, que han augmentat la seva concentració gràcies a la suplementació amb dNs²³³. Aquesta observació feta en el laboratori de recerca on s'ha desenvolupat aquesta tesi obre la porta a pensar que els dNs, a través de l'increment de les concentracions de dNTPs, poden estimular la replicació de l'ADNmt i, per tant, revertir la depleció d'aquest no només en situacions on hi ha concentracions alterades de dNTPs degudes a una mutació en un gen relacionat amb el seu metabolisme (tal com s'ha vist en els casos de mutacions en *TK2*, *DGUOK* o *RRM2B*), sinó que també en altres MDDS causades per mutacions en gens relacionats amb altres funcions, com són la replicació de l'ADN (com és el cas de *POLG*), la dinàmica mitocondrial o altres funcions que tenen una relació amb el manteniment de l'ADNmt de forma encara desconeguda (com el cas de *MPV17*). Per aquest motiu, un bloc d'aquesta tesi es centra en

avaluar l'eficàcia del tractament amb dNs quan aquest s'expandeix a altres MDDS no causades directament per afectacions del metabolisme de dNTPs.

Tal com s'ha indicat, l'objectiu del tractament amb dNs és incrementar algun dels dNTPs que es troba reduït en els pacients o incrementar els 4 dNTPs per estimular la replicació de l'ADNmt. Les dues situacions poden crear un desequilibri dels dNTPs que, tal com es descriu en la Secció 2.2.5, pot resultar genotòxic. És per aquest motiu que en alguns treballs on s'estudiava l'eficàcia d'aquest tractament també es va estudiar el seu potencial efecte mutagènic. De tots els treballs esmentats que utilitzen dNs o dNMPs com a tractament només dos exploren aquesta possibilitat. El primer estudia el potencial efecte mutagènic de la combinació de dAMP i dGMP observant la morfologia cel·lular i la taxa de divisió cel·lular i ho complementa estudiant la presència de delecions sobre l'ADNmt mitjançant PCR llarga i l'estat de l'ADNn mitjançant un *array Comparative Genomic Hybridisation* (CGH)²⁵⁸. L'*array* CGH es basa en l'ús de sondes marcades amb fluorescència que hibriden amb diferents zones de l'ADNn, de manera que quantificant la fluorescència s'obté la quantitat relativa d'aquella regió de l'ADN, que es pot comparar amb una mostra control per identificar insercions o delecions en el genoma³²². Aquesta tècnica, però, té la limitació que no permet identificar mutacions puntuals a nivell de nucleòtid, inversions, translocacions o mutacions a baixa freqüència (menor al 30%). El segon treball²³³ explora la seguretat gènica només sobre l'ADNmt mitjançant l'estudi de presència de delecions amb PCR llarga i mitjançant la presència de mutacions puntuals (transicions, transversions, insercions o delecions) amb *Next Generation Sequencing* (NGS), que permet la identificació de mutacions amb freqüències molt baixes.

Encara que les dades que s'extreuen dels dos treballs indiquen que no hi ha inducció de mutacions i reordenaments cromosòmics la informació sobre la seguretat gènica dels dNMPs o dNs és limitada i es restringeix a un període d'exposició al tractament curt i en condicions *in vitro*. A més, encara que l'ADNmt s'ha pogut estudiar profundament, gràcies a que es tracta d'un genoma petit i a l'aplicació de la NGS, l'ADNn no ha estat estudiat amb la mateixa profunditat, degut a la seva extensió i complexitat. Per aquest motiu, cal expandir el coneixement sobre l'efecte dels dNs a l'ADNmt i l'ADNn, amb tècniques més resolutives com és la NGS, en els models *in vitro* disponibles, així com estendre el seu estudi en els

models *in vivo*, ja que aquests aporten informació més fidedigna del seu efecte perquè constitueixen un model d'exposició al tractament més llarg i en un context fisiològic. Així doncs, com que les dades sobre la seguretat gènica del tractament amb dNs són limitades, un altre objectiu d'aquesta tesi és explorar la seguretat gènica del tractament amb dNs.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

3.1. Hipòtesis

Els treballs previs que estudien l'ús de dNs per al tractament de les MDDS han mostrat la seva eficàcia tant a nivell preclínic com a nivell clínic (a l'espera dels resultats finals dels assajos clínics en curs) per a síndromes causades per mutacions en gens que afecten al metabolisme de dNTPs, com és el cas del dèficit de TK2. Aquest tractament també ha mostrat eficàcia en estudis preclínics per a MDDS causades per mutacions en gens que no participen directament en el metabolisme dels dNTPs, com és el cas de cèl·lules amb mutacions en *POLG* i *MPV17*. Aquests resultats previs ens fan plantejar la primera hipòtesi.

- Hipòtesi 1: Els dNs, a través de l'increment de les concentracions de dNTPs, poden estimular la replicació de l'ADNmt i, per tant, revertir la depleció en el nombre de còpies d'aquesta molècula no només quan hi ha mutacions en un gen directament relacionat amb el metabolisme d'aquests compostos, sinó que també en altres MDDS causades per mutacions en gens amb altres funcions.

El mecanisme d'acció del tractament basat en l'administració de dNs comporta alteracions en les concentracions i proporcions relatives dels dNTPs intracel·lulars que poden resultar genotòxiques. Aquesta noció ens fa plantejar la segona hipòtesi:

- Hipòtesi 2: La suplementació amb dNs per al tractament de les MDDS causa alteracions en les concentracions de dNTPs que poden estimular la replicació de l'ADNmt però que no resulten genotòxiques ni per l'ADNmt ni per l'ADNn.

El mecanisme terapèutic dels dNs requereix la seva entrada a les cèl·lules i la seva fosforilació cap a dNTPs en el citosol o en el mitocondri per la via de salvament. Tot i que es coneixen les kinases implicades en aquesta activació i s'ha estudiat el seu rol en aquesta teràpia en treballs anteriors, els mecanismes d'entrada dels dNs a la cèl·lula i al mitocondri en el context de les MDDS i del tractament amb dNs no han estat estudiats anteriorment. Això porta a plantejar la tercera hipòtesi:

- Hipòtesi 3: El transportador equilibratiu de nucleòsids ENT1 és un mediador necessari en el mecanisme terapèutic dels dNs per a les MDDS.

3.2. Objectius

Objectius per verificar la hipòtesi 1:

- Objectiu 1.1: Estudiar *in vitro* l'eficàcia del tractament amb dNs utilitzant cultius primaris de fibroblasts de pell de pacients amb MDDS causades per mutacions en diferents gens, participin o no, en el metabolisme de dNTPs.
- Objectiu 1.2: Estudiar *in vivo* l'eficàcia del tractament amb dNs de purina en el model de ratolí KO per *Dguok*.

En tots els casos, el biomarcador d'eficàcia del tractament serà el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules i òrgans estudiats.

Objectius per verificar la hipòtesi 2:

- Objectiu 2.1: Estudiar la seguretat gènica del tractament amb dNs sobre l'ADNmt en models *in vitro* de MDDS.
- Objectiu 2.2: Estudiar la seguretat gènica del tractament oral amb dNs sobre l'ADNmt en dos models *in vivo* de MDDS: el ratolí KO per *Tk2* tractat amb dNs de pirimidina i el ratolí KO per *Dguok* tractat amb dNs de purina.
- Objectiu 2.3: Estudiar la seguretat gènica del tractament amb dNs de pirimidina sobre l'ADNmt i l'ADNn en mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 sotmesos a tractament oral crònic amb aquests compostos.

Les principals variables a estudiar com a indicadors de la possible genotoxicitat seran el nombre de canvis trobats en la seqüència de l'ADNmt (o ADNn) en comparació amb la seqüència referència i la presència de delecions múltiples en l'ADNmt.

Objectius per verificar la hipòtesi 3:

- Objectiu 3.1: Estudiar el rol del transportador de nucleòsids ENT1 tant en el fenotip dels ratolins amb dèficit de TK2 com en l'efecte terapèutic dels dNs de pirimidina administrats com a tractament per aquesta malaltia.

Les principals variables a estudiar en el marc d'aquest objectiu seran la supervivència dels animals i la biodisponibilitat dels dNs administrats.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Dissenys experimentals

4.1.1. Estudis d'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs en cultiu cel·lular

L'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs es va testar en fibroblasts obtinguts a partir d'una biòpsia de pell de controls sans i de pacients amb variants patogèniques en diversos gens associats a MDDS (Taula 4.1). Les biòpsies de pell o, en la majoria dels casos, els fibroblastos ja aïllats, van ser cedits per a aquests i altres estudis pels nostres col·laboradors clínics i formen part de la col·lecció de mostres C.0003899, registrada al *Registro Nacional de Biobancos (Instituto de Salud Carlos III)* l'any 2016.

Els experiments *in vitro* es van portar a terme en condicions de quiescència perquè s'assemblen més a l'estadi dels teixits diferenciats, que són els afectats en les MDDS. A més, les cèl·lules en quiescència presenten concentracions endògenes de dNs i dNTPs reduïdes i molt depenents de la ruta de salvament⁸⁰, la qual cosa afavoreix l'impacte de l'addició dels dNs.

Quan s'estudia la depleció de l'ADNmt en fibroblasts hi ha dues possibilitats: algunes cèl·lules amb determinades mutacions en alguns gens mostren depleció de l'ADNmt, normalment en condicions de quiescència^{85,217}, mentre que en la majoria de casos les cèl·lules no mostren depleció. En el primer cas, com que les cèl·lules ja mostren depleció per elles mateixes, es pot assajar l'efecte dels dNs sobre el nombre de còpies de l'ADNmt. Aquest és el model de depleció espontània de l'ADNmt. En el segon cas, cal induir prèviament la depleció de l'ADNmt incubant les cèl·lules durant un període de temps amb BrEt. Un cop el nombre de còpies d'ADNmt ha disminuït, es retira el BrEt i es deixen les cèl·lules en cultiu per veure si poden recuperar el nombre de còpies d'ADNmt. Si les cèl·lules amb les variants patogèniques mostren retard en la velocitat de recuperació de l'ADNmt, es pot testar l'efecte dels dNs sobre el nombre de còpies de l'ADNmt. Aquest és el model d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt, que prèviament ja s'ha utilitzat en diversos estudis^{217,233,252,255}.

Per tal de decidir si l'eficàcia del tractament amb dNs en una línia cel·lular s'estudiava utilitzant el model de depleció espontània o depleció induïda es va establir com a criteri que una línia cel·lular mostrava depleció de l'ADNmt si el seu nombre de còpies es trobava dues desviacions estàndard per sota del valor mitjà dels controls en estat de quiescència (a l'inici dels experiments (t0), tal i com es defineix aquest punt temporal en els dissenys descrits a continuació).

Les úniques línies cel·lulars de les que es tenien dades prèvies obtingudes en el nostre laboratori de que presentaven depleció espontània de l'ADNmt eren les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*⁸⁵, per la qual cosa es va testar l'eficàcia i seguretat dels dNs en aquestes cèl·lules només en el model de depleció espontània de l'ADNmt. Tot i que també s'havia descrit per un altre grup que les cèl·lules amb mutacions en *MPV17* utilitzades en aquest treball presentaven depleció espontània²¹⁷ es va testar l'eficàcia i seguretat dels dNs per aquestes i la resta de cèl·lules de pacients induint la depleció de l'ADNmt amb BrEt i, en paral·lel, es va explorar també si tenien depleció espontània. Posteriorment, en aquelles línies on es va veure que tenien depleció espontània de l'ADNmt es va tornar a avaluar l'eficàcia i seguretat utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt.

Taula 4.1. Llista de fibroblasts amb variants patogèniques en gens associats a MDDS utilitzats per als experiments d'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs. El grup d'edat al qual pertany el pacient es refereix en el moment en què se li va fer la biòpsia per obtenir els fibroblasts.

Pacient	Gen	Variant patogènica (proteïna)	Grup d'edat	Model de depleció de l'ADNmt
P1	<i>TWINK</i>	p.[Val454Gly]	Adult	Induïda
P2	<i>TWINK</i>	p.[Arg357Pro]	Adult	Induïda
P3	<i>TWINK</i>	p.[Ala359Thr]	Adult	Induïda
P4	<i>DNA2</i>	p.[Glu410Lys]	Adult	Induïda
P5	<i>RNASEH1</i>	p.[Tyr163His];[Gln86del]	Adult	Induïda
P6	<i>RRM2B</i>	p.[Ala172Thr];[Glu228Lys]	Adult	Induïda
P7	<i>RRM2B</i>	p.[Ala172Thr];[Ala172Thr]	Adult	Induïda
P8	<i>TK2</i>	p.[Lys202del];[Lys202del]	Adult	Induïda
P9	<i>TK2</i>	p.[Lys202del];[Lys202del]	Adult	Induïda
P10	<i>TK2</i>	p.[Arg130Trp];[Lys202del]	Infantil	Induïda
P11	<i>TK2</i>	p.[His121Asn];[His121Asn]	Infantil	Induïda
P12	<i>TK2</i>	p.[Asp177Tyr];[Lys202del]	Infantil	Induïda
P13	<i>TK2</i>	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Adult	Induïda
P14	<i>TK2</i>	p.[Lys202del];[Ser511Ilefs*99]	Infantil	Induïda
P15	<i>TK2</i>	p.[Thr108Met];[Pro227Serfs*9]	Infantil	Induïda
P16	<i>DGUOK</i>	p.[Leu250Ser];[Leu250Ser]	Infantil	Esponatània
P17	<i>DGUOK</i>	p.[Phe256Ter22];[Glu165Val]	Infantil	Esponatània
P18	<i>OPA1</i>	p.[Leu949Pro]	Desconegut	Induïda
P19	<i>OPA1</i>	p.[Leu949Pro]	Desconegut	Induïda
P20	<i>OPA1</i>	p.[Thr612GlnfsX20]	Desconegut	Induïda
P21	<i>OPA1</i>	p.[Arg445His]	Desconegut	Induïda
P22	<i>OPA1</i>	p.[Phe552Leu]	Infantil	Induïda
P23	<i>SPG7</i>	p.[Leu732Pro]	Adult	Induïda
P24	<i>SPG7</i>	p.[Ala510Val];[Ala510Val]	Adult	Induïda
P25	<i>SPG7</i>	p.[Met667Ile];[Met667Ile]	Adult	Induïda
P26	<i>SPG7</i>	p.[Val311del];[Val311del]	Adult	Induïda
P27	<i>MPV17</i>	p.[Pro64Arg];[Pro98Leu]	Desconegut	Induïda i esponatània
P28	<i>MPV17</i>	p.[Asp92fs];[Asp92fs]	Desconegut	Induïda i esponatània
P29	<i>MPV17</i>	p.[Gln93Pro];[Gln93Pro]	Adult	Induïda i esponatània
P30	<i>SUCLA2</i>	p.[Gly350Ser];[Gly350Val]	Infantil	Induïda
P31	<i>SUCLG1</i>	p.[Ala209Glu];[Ala209Glu]	Infantil	Induïda i esponatània
P32	<i>SUCLG1</i>	p.[Gly301Arg];[Ile198Leufs*2]	Infantil	Induïda
P33	<i>SUCLG1</i>	p.[Ala209Glu];[Val153_Asn177del]	Infantil	Induïda

4.1.1.1. Model de depleció induïda de l'ADNmt amb BrEt

Aquest model (Figura 4.2) es va utilitzar per assajar l'eficàcia i seguretat gènica dels dNs en les cèl·lules amb mutacions en *TWNK*, *DNA2*, *RNASEH1*, *RRM2B*, *OPA1*, *SPG7*, *MPV17*, *SUCLA2* i *SUCLG1* i per estudiar la seguretat gènica en el cas de cèl·lules amb mutacions en *TK2* (Taula 4.1). Els estudis d'eficàcia en cèl·lules de pacients amb dèficit de *TK2* no eren rellevants donat que la teràpia basada en l'administració amb dNs per a aquests pacients es troba ja en fase clínica³¹⁸.

Les cèl·lules es descongelaven i expandien en plaques de cultiu P100 o P150 amb medi complet (Secció 4.2.1.2) fins a tenir-ne suficients per poder-les sembrar per a l'experiment. Un cop es tenia el nombre de cèl·lules necessari es sembraven 120.000 – 180.000 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous. Al cap de 3 o 4 dies, les cèl·lules arribaven a la confluència i s'induïa la inhibició del creixement per contacte entre les cèl·lules. En aquest moment, s'eliminava el medi, es feia un rentat amb tampó fosfat salí (PBS) per eliminar restes de sèrum fetal boví (FBS) i s'aplicava el medi de quiescència (Secció 4.2.1.2) que conté una proporció molt baixa de FBS dialitzat (0,1%) (que no conté els dNs que sí que estan presents en el FBS no dialitzat). Mitjançant la supressió pràcticament total de FBS (substituint per traces de FBS dialitzat) a part d'induir la quiescència per la supressió de factors de creixement, s'eliminen els dNs presents en el FBS no dialitzat que alterarien les concentracions experimentals dels dNs utilitzats per tractar les cèl·lules.

Després d'incubar els fibroblasts durant 4 dies en aquestes condicions, es recollien les cèl·lules per tripsinització en el primer punt (t0) que informa del nombre inicial de còpies d'ADNmt de la cèl·lula. A partir d'aquest moment, es va incubar un grup de cèl·lules durant 10 dies amb medi de quiescència en absència de BrEt per veure si aquestes manifestaven depleció espontània de l'ADNmt (Figura 4.1) i un altre grup de cèl·lules amb medi de quiescència suplementat amb BrEt 25 ng/mL durant 10 dies, per tal d'induir la depleció de l'ADNmt (Figura 4.2). Es van recollir les cèl·lules per tripsinització en aquest punt i, seguidament, es va continuar l'experiment només amb les cèl·lules en les que s'havia induït depleció de l'ADNmt amb BrEt (Figura 4.2). Es va retirar el tractament amb BrEt, es van rentar les cèl·lules amb PBS i un grup de cèl·lules es va incubar únicament amb medi de quiescència mentre que les altres cèl·lules es van incubar amb medi de quiescència suplementat amb els

4 dNs (dAdo, dGuo, dCtd i dThd) a una concentració de 50 μ M cada un. Per tal d'evitar la ràpida degradació de la dAdo catalitzada per l'enzim ADA, en tots els experiments amb suplementació de dAdo es va addicionar eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA, potent inhibidor de l'ADA⁸⁵) a concentració de 5 μ M. Com que aquest additiu acompanyava en tots els casos la suplementació amb dAdo, l'addició d'EHNA no s'esmenta de manera explícita en la part de resultats. No es van posar inhibidors de la degradació de la resta de dNs perquè es tenien dades prèvies de la seva estabilitat en medi de cultiu²³³. En el cas de les cèl·lules amb mutacions en *TK2* es va tractar només amb dCtd i dThd, ja que els pacients que estan sota tractament reben exclusivament aquests dos dNs.

En aquest disseny experimental primer s'incubava amb BrEt per induir la depleció de l'ADNmt i posteriorment s'eliminava aquest agent intercalant abans d'aplicar el tractament amb dNs ja que en estudis previs es va veure que la coïncubació de BrEt amb els dNs no resultava en una estimulació de la replicació de l'ADNmt (Figura Suplementària 1), mentre que quan es feia incubant en primer lloc amb BrEt, eliminant-lo i incubant en segon lloc amb els dNs sí que s'observava efecte dels dNs en la replicació de l'ADNmt²⁵².

Els medis amb el tractament es canviaven cada 3 o 4 dies i a dia 20 (t20) i 30 (t30) es recollien les cèl·lules per tripsinització i es congelaven a -20°C per posteriorment fer l'extracció d'ADN dels *pellets* cel·lulars (Secció 4.2.3.1) (Figura 4.2). Aquests dos punts (t20 i t30) informen de l'efecte dels dNs sobre el nombre de còpies de l'ADNmt. En alguns experiments no es van poder recollir les cèl·lules a dia 30 perquè aquestes presentaven signes d'estrès i hi havia molta mortalitat, la qual cosa va obligar a recollir aquestes cèl·lules uns dies abans, tal com s'indica en els experiments on s'ha procedit d'aquesta manera. En tots els experiments cada condició s'assajava per duplicat en dos pous de cultiu diferents processats en paral·lel.

Es va establir que una línia cel·lular no mantenia fenotip de depleció de l'ADNmt assolit a t10 quan, en retirar el BrEt, el nombre de còpies d'ADNmt mostrava una tendència a recuperar-se a t20 i/o t30.

Utilitzant aquest disseny experimental es va avaluar la presència de depleció espontània de l'ADNmt (a), l'eficàcia (b) i seguretat gènica (c) del tractament amb dNs:

- a) La presència de depleció espontània de l'ADNmt es va determinar mesurant el nombre de còpies d'ADNmt mitjançant PCR quantitativa (qPCR) (Secció 4.2.7) a t0 i a t10 sense BrEt (Figura 4.1).
- b) L'eficàcia del tractament es va testar mesurant el nombre de còpies d'ADNmt amb qPCR (Secció 4.2.7) sobre els ADNs obtinguts a t0, t10 amb BrEt i a t20 i t30 amb i sense tractament.
- c) La seguretat gènica del tractament es va estudiar testant la presència de delecions múltiples sobre l'ADNmt mitjançant PCR llarga (Secció 4.2.8) i la presència de mutacions sobre l'ADNmt mitjançant seqüenciació massiva (Secció 4.2.9) en les mostres recollides a t0 i t20 amb i sense tractament (Figura 4.2).

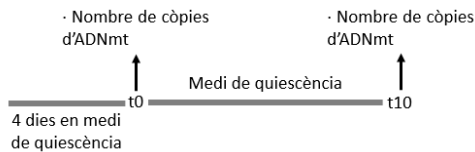


Figura 4.1. Disseny experimental dels estudis per veure si les diferents línies cel·lulars de fibroblasts mostren depleció espontània de l'ADNmt. El medi de quiescència es va mantenir durant tot l'experiment (amb un canvi de medi cada 3 o 4 dies). Cada experiment es va fer per duplicat (dos cultius de la mateixa línia i la mateixa condició) i en paral·lel en fibroblasts de controls sans i de pacients.

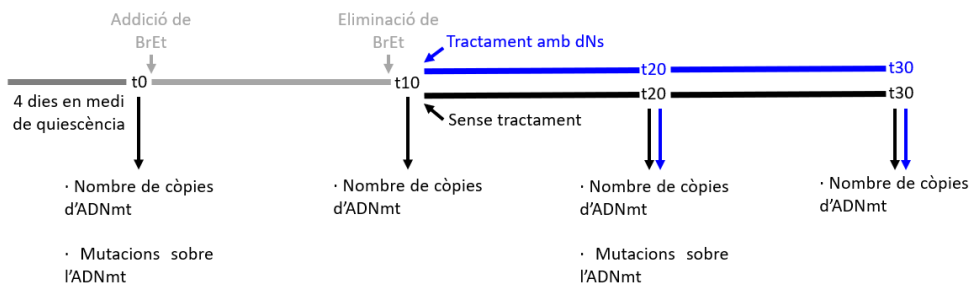


Figura 4.2. Disseny experimental dels assajos d'eficàcia i seguretat gènica dels dNs en fibroblasts utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt. La línia en gris fosc indica el temps en que les cèl·lules estan en medi de quiescència abans de començar l'experiment. La línia en gris clar indica el temps en que les cèl·lules estan incubades amb BrEt (25 ng/mL), les línies en blau indiquen el temps en que les cèl·lules estan exposades al tractament amb dNs (50 µM) i les línies negres indiquen el temps en que les cèl·lules estan exposades al medi de quiescència sense tractament. El medi de quiescència, amb els additius indicats en cada cas, es va mantenir durant tot l'experiment (amb un canvi de medi cada 3 o 4 dies). Cada experiment es va fer per duplicat (dos cultius de la mateixa línia i la mateixa condició) i en paral·lel en fibroblasts de controls sans i de pacients.

4.1.1.2. Model de depleció espontània de l'ADNmt

Aquest model (Figura 4.3) va ser utilitzat per assajar l'eficàcia i seguretat dels dNs en les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*, ja que sabem que presentaven depleció espontània de l'ADNmt en condicions de quiescència⁸⁵. Quan els experiments per explorar l'existència o no de depleció espontània (Figura 4.1) van mostrar que algunes altres cèl·lules tenien depleció espontània també es va utilitzar aquest model en aquests casos (les tres línies amb mutacions en *MPV17* i en una de les tres línies amb mutacions en *SUCLG1*) (Taula 4.1). La manera de descongelar, expandir i començar l'experiment fins a recollir el t0 va ser igual que per al model de depleció induïda de l'ADNmt (Secció 4.1.1.1). A partir d'aquest punt un grup de cèl·lules es mantenia amb medi de quiescència (condició sense tractament), mentre que la resta es tractava suplementant el medi de quiescència amb els 4 dNs a una concentració de 50 µM cada un i EHNA a concentració de 5 µM. Els medis es canviaven cada 3 o 4 dies i a dia 10 (t10), 20 (t20) i 30 (t30) es recollien les cèl·lules del grup amb i sense tractament per tripsinització i es congelaven a -20°C per posteriorment fer l'extracció d'ADN dels *pellets* cel·lulars (Secció 4.2.3.1). En tots els experiments cada condició s'assajava per duplicat en dos pous de cultiu diferents processats en paral·lel.

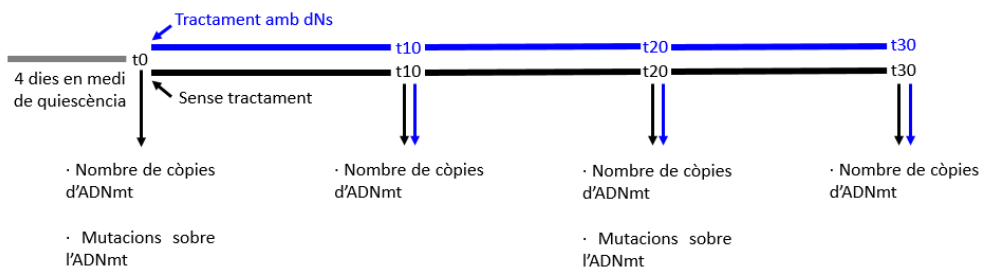


Figura 4.3. Disseny experimental dels assajos d'eficàcia i seguretat gènica dels dNs en fibroblasts utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en gris fosc indica el temps en que les cèl·lules estan en medi de quiescència abans de començar l'experiment. Les línies en blau indiquen el temps en que les cèl·lules estan exposades al tractament amb dNs (50 µM) i les línies negres indiquen el temps en que les cèl·lules estan exposades al medi de quiescència sense tractament. El medi de quiescència, amb dNs o sense, es va mantenir durant tot l'experiment (amb un canvi de medi cada 3 o 4 dies). Cada experiment es va fer per duplicat (dos cultius de la mateixa línia i la mateixa condició) i en paral·lel en fibroblasts de controls sans i de pacients.

L'eficàcia del tractament es va estudiar mesurant el nombre de còpies de l'ADNmt mitjançant qPCR (Secció 4.2.7) sobre els ADNs obtinguts a t0 i a t10, t20 i t30 amb i sense

tractament. La seguretat gènica del tractament es va estudiar testant la presència de deleccions múltiples sobre l'ADNmt mitjançant PCR llarga (Secció 4.2.8) i la presència de mutacions sobre l'ADNmt, mitjançant seqüenciació massiva (Secció 4.2.9) en les mostres recollides a t0 i t20 amb i sense tractament (Figura 4.3).

4.1.1.3. Estabilitat dels dNs en el medi de cultiu

L'estabilitat dels dNs en medi de cultiu va ser estudiada per tal de veure que aquests no es degraden ràpidament i són biodisponibles per a les cèl·lules. En aquest experiment, es van sembrar 120.000 – 180.000 fibroblasts per pou de controls sans i de pacients amb dèficit de TK2 en plaques de 6 pous, es va deixar que les cèl·lules arribessin a confluència, es va retirar el medi, es va rentar amb PBS i es va afegir medi de quiescència. Després de 4 dies es va renovar el medi: a un grup de cèl·lules se'ls va afegir medi de quiescència, mentre que a l'altre grup de cèl·lules se li va afegir medi de quiescència suplementat amb el 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA a concentració de 5 μ M, tal com s'havia fet en els experiments on es mesura l'eficàcia i seguretat (Secció 4.1.1.1 i Secció 4.1.1.2) (Figura 4.4). Addicionalment, es van incubar uns pous sense cèl·lules amb els mateixos medis amb i sense dNs. Després de 4 dies (el màxim de dies que les cèl·lules estan en el mateix medi en els experiments de tractament amb dNs *in vitro*) es va recollir el medi i es van determinar les concentracions de cada dN i dels seus productes de degradació mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a detecció per espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS) (Secció 4.2.10). En aquest experiment cada condició s'assajava per duplicat en dos pous de cultiu diferents processats en paral·lel.

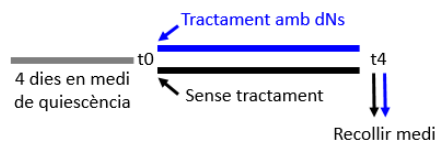


Figura. 4.4. Disseny experimental de l'estudi de l'estabilitat dels dNs en medi de cultiu. L'experiment es va fer per duplicat (dos cultius de la mateixa línia i la mateixa condició) en fibroblasts de controls sans i uns fibroblasts amb mutacions en TK2. La línia en gris fosc indica el temps en que les cèl·lules estan en medi de quiescència abans de començar l'experiment. La línia en blau indica el temps en que les cèl·lules estan exposades al tractament amb dNs i la línia negra indica el temps en que les cèl·lules estan exposades al medi de quiescència sense tractament. El medi de quiescència, amb dNs o sense, es va mantenir durant tot l'experiment.

4.1.2. Estudi de la seguretat gènica del tractament amb dNs en el model de ratolí KO per *Tk2*

L'eficàcia del tractament amb dNs de pirimidina (dCtd i dThd) s'havia estudiat prèviament en el laboratori en el model de ratolí KO per *Tk2*³¹⁷. En aquell estudi es van tractar diàriament ratolins *Tk2*^{+/+} i *Tk2*^{-/-} per sonda oral amb una combinació de dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg/dia cada un dissolts en PBS o amb vehicle (PBS). El tractament es va administrar a partir de 4 dies d'edat fins a una edat de 12 o 29 dies (ratolins tractats diàriament durant 8 dies o 25 dies, respectivament). En aquests dos punts, els ratolins van ser morts 1 hora després de l'administració de l'última dosi (per decapitació a edat de 12 dies i per dislocació cervical a edat de 29 dies) i es van obtenir teixits on es va testar l'eficàcia del tractament³¹⁷. Com que el ratolí *Tk2*^{-/-} sense tractar moria de mitjana al dia 16, mentre que quan es tractava amb dCtd i dThd vivia fins al dia 34 es van elegir els dies 12 i 29 per obtenir els òrgans dels ratolins, és a dir, uns dies abans que morissin de manera natural.

En el marc d'aquesta tesi, s'han aprofitat els teixits obtinguts en el treball anterior (conservats a -80°C des del moment de l'estudi) per avaluar la seguretat gènica sobre l'ADNmt del tractament amb dCtd i dThd (Figura 4.5). Es van recollir mostres de fetge, que és on principalment es metabolitzen els dNs, i mostres de múscul esquelètic, teixit especialment afectat en pacients amb mutacions en *TK2*. En el cas del múscul esquelètic es van recollir conjuntament gastrocnemi + soli. Aquests teixits van ser utilitzats per estudiar la presència de delecions múltiples amb PCR llarga (Secció 4.2.8) i per estudiar mutacions sobre l'ADNmt mitjançant seqüenciació massiva (Secció 4.2.9).

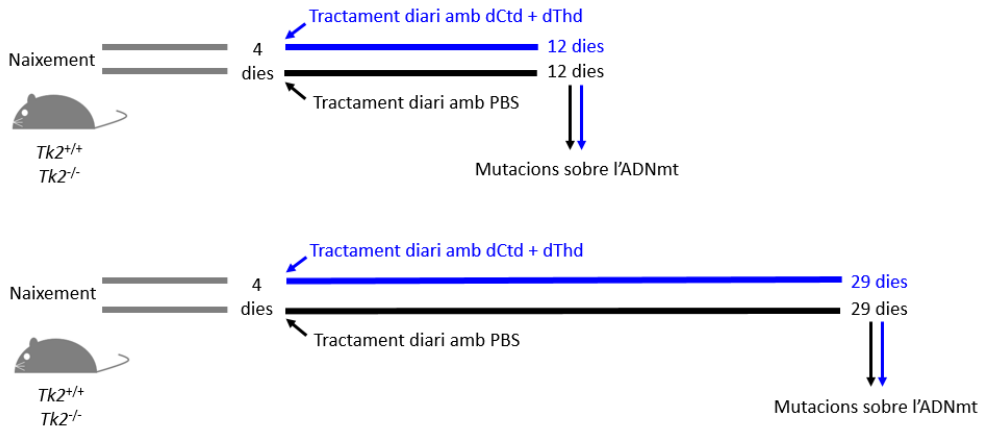


Figura 4.5. Disseny experimental de l'estudi de seguretat gènica del tractament amb dCtd + dThd en ratolins WT i KO per Tk2. Els ratolins es van tractar diàriament per sonda oral amb PBS o dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg/dia a partir del dia 4 fins als 12 o 29 dies d'edat, punt en el qual es va obtenir múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge per analitzar la presència de mutacions sobre l'ADNmt.

4.1.3. Estudi de l'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs en el model de ratolí KO per *Dguok*

L'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs també es va estudiar *in vivo* utilitzant un model de ratolí *Dguok*^{-/-} desenvolupat i caracteritzat prèviament²⁶⁷. Ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} van ser tractats per sonda oral amb PBS (vehicle) o una combinació de dAdo + dGuo a una dosi de 200 mg/kg/dia cada un dissolts en PBS. El tractament es va iniciar en ratolins de 8 dies d'edat i es va donar diàriament a primera hora del matí, excepte caps de setmana, fins que els ratolins tenien 6 setmanes d'edat. En aquest punt, els ratolins es van decapitar 1 hora després d'administrar l'última dosi del tractament i es van obtenir diferents òrgans i plasma per l'estudi de l'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs (Figura 4.6).

L'estudi de l'eficàcia del tractament es va fer mesurant el nombre de còpies d'ADNmt amb qPCR (Secció 4.2.7) en fetge, cervell, múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i cor dels ratolins tractats amb PBS i dNs. Es van elegir els tres primers òrgans perquè són els més afectats en pacients amb mutacions en *DGUOK*¹⁹² i el cor com a exemple de teixit típicament no afectat. A més, ja sabíem que el ratolí *Dguok*^{-/-} presenta una depleció de l'ADNmt molt acusada en fetge i cervell²⁶⁷.

Aquest estudi d'eficàcia del tractament amb dAdo + dGuo es va complementar amb mesures de la seva biodisponibilitat quantificant el contingut de dAdo i dGuo i dels seus productes de degradació mitjançant HPLC-MS/MS (Secció 4.2.10) en plasma i fetge obtinguts després d'una hora d'haver administrat l'última dosi del tractament (Figura 4.6).

Aquests estudis es van ampliar estudiant el contingut mitocondrial de dNTPs (Secció 4.2.11) en fetge i cervell per veure si els dNs administrats aconseguien alterar-los. Aquests darrers estudis es van fer en ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} de 8 setmanes d'edat 1 hora després d'haver donat una única administració per sonda oral de PBS o de dAdo + dGuo 200 mg/kg dissolts en PBS. Els estudis es van fer 1 hora després de l'administració del tractament perquè prèviament s'havia vist que aquest era el temps on es produïa el pic de concentració del tractament en plasma.

La seguretat gènica dels dNs sobre l'ADNmt es va avaluar en fetge i cervell en els ratolins de 6 setmanes d'edat que havien estat tractats diàriament amb dAdo + dGuo o vehicle. Mitjançant PCR llarga es va estudiar la presència de delecions múltiples (Secció 4.2.8) i mitjançant seqüenciació massiva (Secció 4.2.9) es va estudiar el nombre de mutacions sobre l'ADNmt (Figura 4.6). La seguretat gènica es va estudiar en fetge i cervell perquè aquests són els òrgans més afectats en pacients amb mutacions en *DGUOK*¹⁹² i a més, el fetge és el principal òrgan on es metabolitzen els dNs i les seves concentracions haurien de ser més elevades en aquest òrgan.

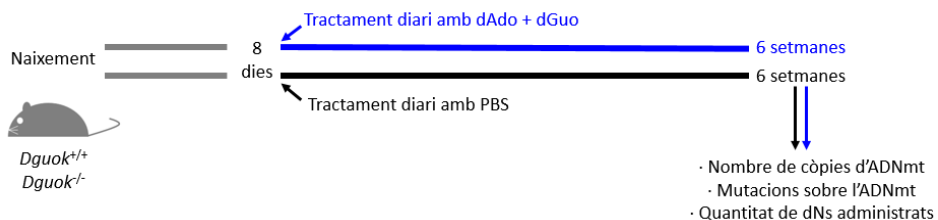


Figura 4.6. Disseny experimental de l'estudi de l'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dAdo + dGuo en ratolins WT i KO per Dguok. Els ratolins es van tractar diàriament, excepte caps de setmana, per sonda oral amb PBS o dAdo + dGuo a una dosi de 200 mg/kg/dia a partir del dia 8 fins a les 6 setmanes d'edat. En aquest punt es van obtenir diferents òrgans per analitzar el nombre de còpies d'ADNmt, la presència de mutacions sobre l'ADNmt i la quantitat dels dNs administrats, així com dels seus productes de degradació.

4.1.4. Estudis de seguretat gènica del tractament amb dNs en sang de pacients amb dèficit de TK2

Els estudis de seguretat gènica del tractament amb dNs en pacients amb mutacions en *TK2* es van fer a partir de mostres de sang analitzant l'ADNmt i l'ADNn.

4.1.4.1. Estudi de l'ADNmt

Per a l'estudi de mutacions sobre l'ADNmt es van fer servir mostres de sang de controls sans, de pacients amb dèficit de TK2 que no havien rebut tractament i de pacients amb dèficit de TK2 que rebien tractament diari amb dCtd + dThd per via oral (Taula 4.2). Posteriorment a l'extracció d'ADN en sang (Secció 4.2.3.3) es va estudiar la presència de deleccions múltiples mitjançant PCR llarga (Secció 4.2.8) i el nombre de canvis sobre l'ADNmt mitjançant seqüenciació massiva (Secció 4.2.9).

4.1.4.2. Estudi de l'ADNn

Per a l'estudi de l'impacte del tractament amb dNs sobre l'ADNn en pacients amb dèficit de TK2 es va estudiar l'ADNn de sang de 10 pacients abans de rebre el tractament i l'ADNn en sang dels mateixos pacients uns mesos o anys després d'estar sota tractament diari amb dCtd + dThd per via oral. Els 10 pacients analitzats van ser: P11, P12, P15, P34, P35, P36, P37, P38, P39 i P40 (Taula 4.2). L'anàlisi sobre l'ADNn es va fer mitjançant la seqüenciació de 275 gens inclosos en el panell *Human Comprehensive Cancer Panel* (QiAgen), que tenen especial susceptibilitat de patir mutacions i que, a més, estan associats amb càncer (Secció 4.2.9).

Adicionalment, es va afegir un control que consistia en ADN de sang d'un pacient amb mutacions somàtiques amb freqüències al·lèliques conegudes en alguns dels gens coberts pel panell. Aquest control es va utilitzar per validar els resultats del *Human Comprehensive Cancer Panel*. També es va afegir un control addicional que consistia en ADN de sang d'un individu sa. Aquesta mostra va permetre veure el rang normal de mutacions que es troben utilitzant aquest panell.

Taula 4.2. Pacients amb dèficit de TK2 en els que s'ha analitzat l'ADNmt en sang. En la taula s'indica la variant patogènica que presenten els pacients sobre la proteïna TK2 (NP_003840.2), el sexe, l'edat en el moment d'obtenció de la mostra de sang i el tipus de tractament que reben (dCtd + dThd o sense tractament) amb la seva dosi oral i el temps que portaven de tractament en el moment d'obtenir la mostra de sang. Finalment, s'indica en quins pacients s'ha analitzat també l'ADNn.

Pacient	Variant patogènica (proteïna)	Sexe	Edat	Tractament	Dosi (mg/kg/dia)	Període de tractament (mesos)	Genoma seqüenciat
P11	p.[His121Asn];[His121Asn]	Masculí	5	dCtd + dThd	260	76	ADNmt i ADNn
P12	p.[Asp177Tyr];[Lys202del]	Femení	7	dCtd + dThd	400	65	ADNmt i ADNn
P15	p.[Thr108Met];[Pro227Serfs*9]	Femení	6	dCtd + dThd	400	71	ADNmt i ADNn
P34	p.[Lys202del];[Lys202del]	Femení	76	dCtd + dThd	400	36	ADNmt i ADNn
P35	p.[Lys202del];[Lys202del]	Femení	66	dCtd + dThd	200	9	ADNmt i ADNn
P36	p.[Lys202del];[Lys202del]	Femení	64	dCtd + dThd	400	50	ADNmt i ADNn
P37	p.[Lys202del];[Lys202del]	Masculí	63	dCtd + dThd	260	35	ADNmt i ADNn
P38	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Femení	35	dCtd + dThd	400	67	ADNmt i ADNn
P39	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Femení	37	dCtd + dThd	130	28	ADNmt i ADNn
P40	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Femení	36	dCtd + dThd	400	43	ADNmt i ADNn
P41	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Femení	61	dCtd + dThd	200	10	ADNmt
P42	p.[Thr108Met];[Arg192Lys]	Masculí	19	dCtd + dThd	400	45	ADNmt
P43	p.[Tyr208Cys];[Tyr208Cys]	Femení	53	No tractat	-	-	ADNmt
P44	p.[Lys202del];[Lys202del]	Femení	44	No tractat	-	-	ADNmt
P45	p.[Ala139Thr];[Leu14Argfs*40]	Masculí	51	No tractat	-	-	ADNmt
P46	p.[202_202del];[Tyr208Cys]	Masculí	50	No tractat	-	-	ADNmt
P47	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Masculí	20	No tractat	-	-	ADNmt
P48	p.[His121Asn];[Lys202del]	Masculí	55	No tractat	-	-	ADNmt
P49	p.[Thr108Met];[Thr108Met]	Femení	38	No tractat	-	-	ADNmt

4.1.5. Estudis de la implicació del transportador de nucleòsids ENT1 en l'eficàcia dels dNs

4.1.5.1. Estudis de supervivència

Donat que vam poder tenir accés a un ratolí KO per a *Ent1* (*Ent1*^{-/-})¹¹⁶ es va creuar amb la colònia KO per *Tk2*²⁶⁶ per tal d'avaluar el possible paper del transportador de nucleòsids ENT1 en l'efecte terapèutic dels dNs sobre el dèficit de TK2 aparellant ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/-} amb *Ent1*^{+/-}*Tk2*^{+/-}. En primer lloc, es va estudiar la supervivència dels 4 grups de ratolins homozigots per a cada gen (*Ent1*^{+/-}*Tk2*^{+/-}, *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/-}, *Ent1*^{+/-}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}) per veure si hi havia algun efecte sinèrgic o antagònic entre ENT1 i TK2.

Posteriorment, es va administrar diàriament per sonda oral una combinació de dCtd + dThd dissolts en PBS a una dosi de 400 mg/kg/dia cada un als 4 genotips (*Ent1*^{+/-}*Tk2*^{+/-}, *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/-}, *Ent1*^{+/-}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}) a partir de 4 dies d'edat, tal com s'havia fet en l'estudi de l'eficàcia dels dNs en el model KO de *Tk2*³¹⁷ (Secció 4.1.2). Amb aquesta aproximació, monitorant la supervivència dels diferents grups de ratolins es va poder veure si ENT1 tenia un paper en l'efecte terapèutic dels dNs.

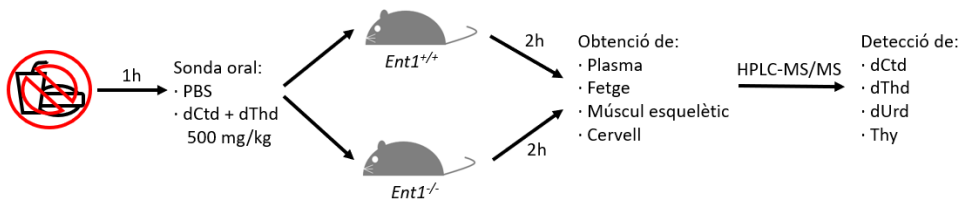
4.1.5.2. Estudis farmacocinètics i de biodistribució

Per tal d'estudiar el paper que juga ENT1 en la biodisponibilitat del tractament amb dCtd i dThd es va fer un estudi farmacocinètic d'aquests dos compostos en ratolins *Ent1*^{+/-} i *Ent1*^{-/-} de 9 – 12 setmanes d'edat. Primer es va extreure sang de la vena safena (aproximadament 50 µL) per determinar les concentracions basals dels compostos a analitzar. Posteriorment, es va administrar per sonda oral una dosi de dCtd + dThd de 500 mg/kg cada un i es va agafar sang de la vena safena a diferents temps després de l'administració (15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 i 480 minuts). Després, es van processar les mostres de sang per obtenir plasma (Secció 4.2.2.3), que va ser congelat a -20°C i posteriorment analitzat per quantificar dCtd, dThd i els seus primers productes de degradació, dUrd i Thy, respectivament, utilitzant HPLC-MS/MS (Secció 4.2.10).

Per tal d'aprofundir en el paper d'ENT1 en la biodisponibilitat i biodistribució de la dCtd i la dThd en diferents òrgans es va fer un estudi d'administració del tractament i posterior

mesura d'aquests compostos en diferents teixits en ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-} de 8 – 12 setmanes d'edat. En aquests experiment, primer de tot es va retirar el menjar i beure als ratolins 1 hora abans d'administrar el tractament per evitar possibles interferències en l'absorció del tractament degudes al contingut estomacal. Passada 1 hora, es va administrar per sonda oral PBS (vehicle) o la mateixa dosi de dCtd + dThd que en l'estudi farmacocinètic (500 mg/kg). Dues hores després de l'administració del tractament es van decapitar els animals i es va obtenir sang, cervell, múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge per determinar el contingut de dCtd, dThd i els seus primers productes de degradació, dUrd i Thy per HPLC-MS/MS (Secció 4.2.10) (Figura 4.7 a). La mort dels animals i obtenció de sang i òrgans es va fer 2 hores després de l'administració del tractament ja que gràcies als estudis farmacocinètics previs es va veure que el pic plasmàtic es donava al voltant d'una hora després de l'administració del tractament i, per tant, vam assumir que a les 2 hores el tractament ja hauria entrat als teixits que s'estudiaven.

a) 8 – 12 setmanes d'edat



b) 12 dies d'edat

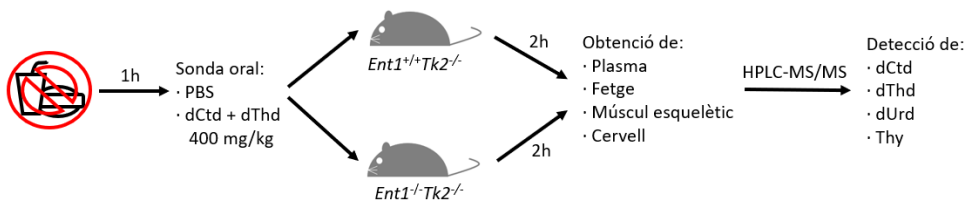


Figura 4.7. Disseny experimental dels estudis de biodistribució per avaluar l'efecte d'ENT1. Estudis realitzats en ratolins *Ent1*^{+/+} (*Ent1* WT) i *Ent1*^{-/-} (*Ent1* KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per via oral amb PBS o dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg cada un (a) o en ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO) de 12 dies d'edat tractats per via oral amb PBS o dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg cada un (b).

Donat que en els estudis de supervivència vam observar pèrdua d'efecte del tractament deguda a l'absència d'ENT1 (Secció 4.1.5.1 i Secció 5.3.1), resultava d'interés estudiar la biodistribució de la dCtd i dThd en els genotips *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}. Treballar amb

aquests dos genotips (que no expressen TK2) té una limitació que és que, tant en presència com en absència de tractament, els ratolins no arriben a edat adulta i, de fet, en absència de tractament els ratolins tenen una supervivència de 17 dies (Secció 5.3.1)³¹⁷. Per aquest motiu, els estudis d'administració de PBS o dCtd + dThd i la mesura de les seves concentracions tissulars, així com la dels seus productes de degradació s'ha fet en ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* menors de 17 dies d'edat, en aquest cas, de 12 dies d'edat. A més, la dosi de dCtd + dThd emprada en aquest cas, va ser la mateixa dosi de dCtd i dThd que es va donar en els experiments de supervivència (400 mg/kg) (Figura 4.7 b).

4.1.5.3. Estudi del nombre de còpies de l'ADNmt

Per veure si l'increment de supervivència degut a l'absència d'ENT1 en ratolins no tractats s'associava a canvis en el nombre de còpies d'ADNmt (Secció 5.3.1), es va quantificar aquesta variable en cervell, fetge, cor i múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de ratolins dels quatre genotips *Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}*, *Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}*, *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* als 12 dies d'edat (temps immediatament anterior a la mort esperada del grup amb menor supervivència, *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}*). L'estudi es va replicar als 5 dies d'edat per detectar si les diferències en supervivència s'associaven a canvis més precoços. En aquest darrer cas no es va estudiar el múscul esquelètic per dificultats en la seva obtenció en ratolins tan joves.

4.2. Metodologia

4.2.1. Cultiu cel·lular

4.2.1.1. Línies cel·lulars

Es va treballar amb fibroblasts primaris obtinguts a partir de biòpsies de pell de controls sans i de pacients infantils i adults amb variants patogèniques confirmades en gens associats amb MDDS (Taula 4.1).

4.2.1.2. Condicions generals de cultiu, plaques i medis de cultiu

Totes les línies cel·lulars es van cultivar en un incubador humidificat a 37°C i amb un 5% de CO₂. Quan es cultivaven les cèl·lules per ser expandides es feia en plaques P100 o P150, mentre que els experiments per avaluar l'eficàcia i seguretat gènica dels dNs es van fer sobre

cèl·lules sembrades en plaques de 6 pous. Els medis de cultiu utilitzats eren diferents segons la finalitat:

- Medi de congelació: Es va utilitzar per mantenir les cèl·lules congelades en nitrogen líquid a -195°C per poder continuar mantenint la línia cel·lular. La seva composició és 90% de FBS i 10% de l'agent crioprotector dimetilsulfòxid (DMSO).
- Medi complet: Es va utilitzar per descongelar, sembrar, expandir i cultivar en general les cèl·lules en els experiments d'eficàcia i seguretat del tractament amb dNs. La seva composició és *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *high glucose* (4,5 g/L) suplementat amb un 10% de FBS, glutamina 2 mM i els antibiòtics penicil·lina (100 unitats/mL) i estreptomicina (100 µg/mL).
- Medi de quiescència: Es va utilitzar per induir la quiescència i avaluar l'efecte del tractament amb dNs. La seva composició és DMEM *high glucose* (4,5 g/L) suplementat amb un 0,1% de FBS dialitzat, glutamina 2 mM i els antibiòtics penicil·lina (100 unitats/mL) i estreptomicina (100 µg/mL). Com que aquest medi només té traces de FBS (0,1%) no conté factors de creixement, cosa que indueix la quiescència de les cèl·lules. A més, el FBS quan és dialitzat no conté dNs, evitant que els dNs presents en el FBS no dialitzat modifiquin les concentracions experimentals dels dNs.

4.2.1.3. Recol·lecció de cèl·lules

La recol·lecció de cèl·lules per a diferents usos es va fer seguint els següents passos:

- Aspirar el medi de la placa de cultiu i rentar amb PBS per eliminar restes de medi i FBS que poden inhibir l'acció de la tripsina.
- Afegir un volum de tripsina que cobreixi la placa i incubar a 37°C durant uns 5 minuts fins que les cèl·lules es desenganxin de la placa.
- Inactivar la tripsina amb 4 volums de medi complet. A partir d'aquest punt la metodologia és diferent depenent de si es vol obtenir *pellet* cel·lular per anàlisis bioquímiques (Secció 4.2.1.4), congelar cèl·lules (Secció 4.2.1.5.1), diluir la densitat de cèl·lules en cultiu (Secció 4.2.1.6) o comptar cèl·lules (Secció 4.2.1.7).

4.2.1.4. Obtenció de *pellets* cel·lulars per anàlisis bioquímiques

Si es volia obtenir *pellet* cel·lular per tenir material biològic per posteriorment fer estudis bioquímics, com és l'obtenció d'ADN, es seguien els mateixos passos que en la recollida de cèl·lules (Secció 4.2.1.3). Posteriorment, es centrifugava a 400 x *g* durant 5 minuts a temperatura ambient, s'eliminava el sobrenedant, es rentava el *pellet* amb PBS, es centrifugava a 400 x *g* durant 5 minuts a temperatura ambient i s'eliminava el sobrenedant. Finalment, es congelava el *pellet* cel·lular a -20°C fins el seu ús.

4.2.1.5. Criopreservació de línies cel·lulars

4.2.1.5.1. Congelació de línies cel·lulars

Els passos que es van seguir eren els mateixos que per a la recollida de cèl·lules (Secció 4.2.1.3) afegint posteriorment els següents passos:

- Un cop es neutralitza la tripsina amb medi, centrifugar a 400 x *g* durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Eliminar el medi i resuspendre el *pellet* en el medi de congelació (tants mL de medi com vials es vulguin congelar).
- Posar els vials en un tanc que conté isopropanol a temperatura ambient i posar aquest a -80°C. Aquest pas assegura que les cèl·lules es congelin lentament evitant danys per congelació.
- 24 hores després de la congelació a -80°C es passen les cèl·lules al tanc de nitrogen a -195°C per assegurar una preservació de llarga durada.

4.2.1.5.2. Descongelació de línies cel·lulars

La descongelació es va dur a terme en totes les cèl·lules per tal de poder expandir-les i poder treballar amb elles. Els passos que es van seguir són els següents:

- Agafar el criotub congelat del tanc de nitrogen a -195°C o de -80°C i descongelar en el bany a 37°C. El procés de descongelació ha de ser ràpid, ja que l'exposició de les cèl·lules al DMSO present en el medi de congelació resulta tòxic.
- Resuspendre el contingut del criotub en 5 mL de medi complet i centrifugar 400 x *g* durant 5 minuts a temperatura ambient.

- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* cel·lular en el volum de medi complet que es necessita per sembrar les cèl·lules.
- Sembrar la suspensió de cèl·lules en les plaques on s'expandiran les cèl·lules.

4.2.1.6. Dilució de densitat en la placa de cultiu

Quan una línia cel·lular arribava a la confluència es diluïa el cultiu o es passava a més plaques, depenent si calia o no expandir encara més el cultiu. Per fer-ho es seguien els passos de recol·lecció de cèl·lules (Secció 4.2.1.3). Després de neutralitzar la tripsina amb el medi complet, si es volia expandir el cultiu es sembrava la suspensió de cèl·lules en el doble de plaques de les que s'havia partit. Si no es volia expandir el cultiu, es sembrava una part de la suspensió cel·lular en el mateix nombre de plaques de les quals s'havia partit i la resta es congelava (Secció 4.2.1.5.1) o llençava.

4.2.1.7. Comptatge i sembrat cel·lular

Per a sembrar les cèl·lules en els experiments en que s'avaluava l'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs es partia del mateix nombre de cèl·lules en cada condició. El procediment que es va seguir va ser el mateix que per a la recol·lecció de cèl·lules (Secció 4.2.1.3). Després de neutralitzar la tripsina amb medi complet es centrifugava a $400 \times g$ durant 5 minuts a temperatura ambient, s'eliminava el sobrenedant, es resuspensia el *pellet* en un volum conegut de medi complet i s'agafaven $10 \mu\text{L}$ de la suspensió per comptar en la cambra de Neubauer.

La cambra de Neubauer (Figura 4.8) fa $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ i a la vegada està dividida en 9 quadrats grans de $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$. Cadascun dels 4 quadrats grans, situats als 4 vèrtexs de la cambra, estan subdividits en 16 quadrats petits que faciliten el comptatge. A sobre de la cambra es posa un cobreobjectes que deixa un espai de $0,1 \text{ mm}$ de gruix on es carrega la suspensió cel·lular a mesurar. El comptatge cel·lular es fa amb la mitjana del nombre de cèl·lules per cada quadre gran (comptant cèl·lules al microscopi en diversos quadres petits dels quatre vèrtexs). El volum d'un quadre gran és de $0,1 \text{ mm}^3$ ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$). Així s'obté el nombre de cèl·lules / $0,1 \text{ mm}^3$, que és el mateix que nombre de cèl·lules / 10^{-4} mL . Per tant, el nombre de cèl·lules per mL s'obté multiplicant la mitjana del nombre de cèl·lules per cada quadre gran per 10.000, tal i com s'indica en la següent fórmula:

Cèl·lules en suspensió (cèl·lules/mL) = Mitjana de cèl·lules per quadre gran x 10.000

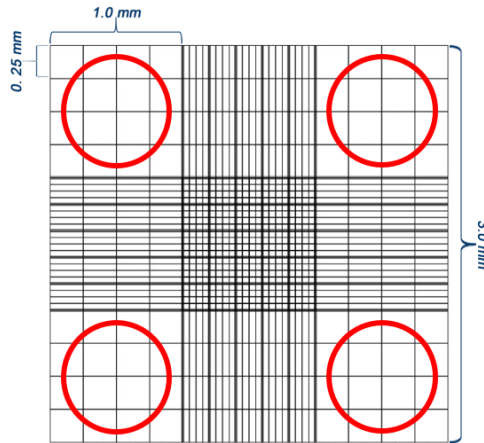


Figura 4.8. Cambra de Neubauer. En roig estan marcats els quatre quadres grans subdividits en 16 quadrats petits on es compten les cèl·lules.

4.2.2. Experimentació animal

4.2.2.1. Models de ratolins i condicions d'estabulació

Tots els procediments experimentals amb ratolins d'aquesta tesi es van portar a terme seguint protocols d'experimentació animal aprovats pel comitè d'experimentació animal de l'institut de recerca Vall d'Hebron amb els identificadors interns CEEA 40/20 per a la colònia *Ent1* i *Tk2* i CEEA 41/20 per a la colònia *Dguok*.

Es va treballar amb un model de ratolí *Tk2*^{-/-} i un model de ratolí *Ent1*^{-/-} generats i caracteritzats prèviament^{266,116}. Ambdós models tenien un fons genètic C57BL/6 i es van aparellar entre ells per generar el doble KO per *Ent1* i *Tk2*. A banda, també es va treballar amb un ratolí *Dguok*^{-/-} que també havia estat generat i caracteritzat prèviament²⁶⁷. Els ratolins van estar sempre estabulats en un ambient controlat amb cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor amb accés a aigua i menjar il·limitat. Els animals van ser marcats mitjançant incisió en les orelles per ser identificats i genotipats a partir del dia 21 d'edat.

Els models de ratolí *Tk2*^{-/-} i *Dguok*^{-/-} van ser cedits per la Dra. Anna Karlsson, de l'Institut Karolinska (Estocolm) i el model de ratolí *Ent1*^{-/-} va ser cedit pel professor Marçal Pastor Anglada, de la Universitat de Barcelona.

4.2.2.2. Genotipatge dels ratolins

Per al genotipatge de ratolins es va partir d'ADN extret de mostres d'orella o cua (Secció 4.2.3.2.1).

El ratolí *Tk2*^{-/-} s'ha generat substituint l'exó 4 i part del 5 per un casset de resistència a neomicina²⁶⁶. Per a genotipar els ratolins es va utilitzar un encebador contra una regió comú en els dos al·lels WT i KO (encebador 1), un encebador contra la regió de la resistència a neomicina que amplificava només en el cas dels KO un amplicó de 399 pb (encebador 3) i un encebador contra la regió eliminada en el KO que únicament amplifica en els ratolins WT un amplicó de 223 pb (encebador 2) (Figura 4.9 a).

En el ratolí *Ent1*^{-/-} s'ha eliminat la regió que va de l'exó 2 al 4 (que representen més de 650 pb de les quals 425 pb són dels exons 2, 3 i 4)¹¹⁶. Mitjançant una PCR amb un encebador contra una seqüència que està fora del lloc eliminat (comú en els ratolins WT i KO, encebador 1) i un encebador contra una seqüència present en la zona eliminada (només present en ratolins WT, encebador 2) s'amplificava un fragment de 506 pb només en l'al·lel WT. La introducció d'un tercer encebador fora de la regió eliminada (present en ratolins WT i KO, encebador 3) genera un amplicó de 950 pb només en l'al·lel KO (amb un fragment no amplificable en l'al·lel WT en les condicions de PCR utilitzades) (Figura 4.9 b).

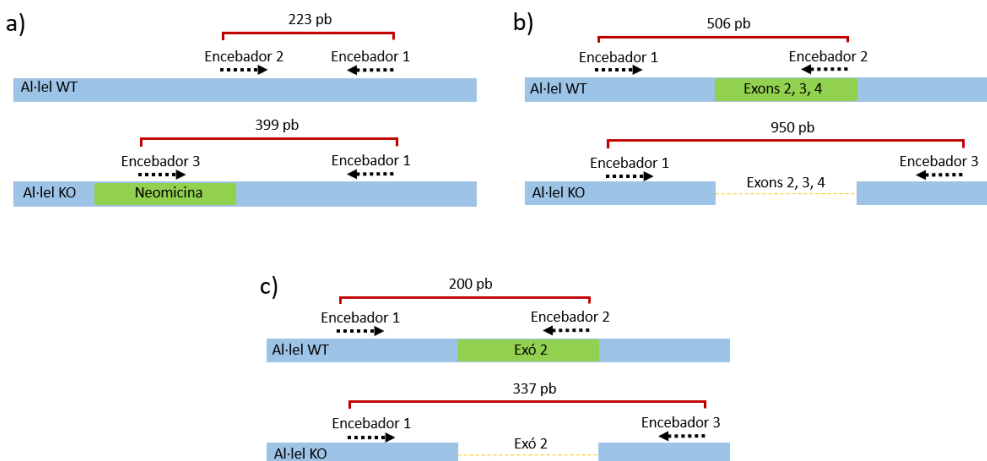


Figura 4.9. Estratègies per al genotipatge de ratolins. Estratègia per al genotipatge dels al·lels *Tk2* (a), *Ent1* (b) i *Dguok* (c). Les línies discontinües simbolitzen els exons absents en els al·lels KO.

El ratolí KO per *Dguok* es va generar eliminant l'exó 2²⁶⁷. Mitjançant una PCR amb un encebador contra una seqüència present en els dos al·lels (WT i KO, encebador 1) i un encebador contra la regió eliminada present només en animals WT (encebador 2) s'amplificava un fragment de 200 pb només en l'al·lel WT. La introducció d'un tercer encebador contra una seqüència present en els dos al·lels (encebador 3) dona un fragment de 337 pb només en l'al·lel KO (amb un fragment no amplificable en l'al·lel WT en les condicions de PCR utilitzades) (Figura 4.9 c).

En tots els genotipatges, independentment del gen, es va fer la mescla de reacció (Taula 4.3) utilitzant els reactius del kit comercial *TaKaRa Taq HS PCR kit UNG plus* (Takara Bio) i els tres encebadors propis de cada gen (Taula 4.4). El kit comercial d'amplificació conté dUTP en comptes de dTTP, de manera que en el procés d'amplificació s'incorpora uracil en comptes de timina a l'ADN. El kit també conté l'enzim uracil-ADN N-glicosilasa (UNG) que permet eliminar amplicons que contenen uracil en comptes de timina abans de començar l'amplificació. D'aquesta manera, utilitzant aquest kit s'eliminen possibles contaminacions que vinguin de PCR fetes anteriorment amb el mateix kit. Les condicions d'amplificació estan recollides a la Taula 4.5. Després de l'amplificació es va comprovar la mida dels productes de PCR en una electroforesi en gel d'agarosa (Secció 4.2.6).

Taula 4.3. Mescla de reacció per fer la PCR per genotipar ratolins.

Reactiu (concentració original)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
PCR buffer for UNG plus (10X)	2 µL	1X
dU plus dNTP Mixture (2,5 mM)	1,6 µL	200 µM
Encebador 1 (10 µM)	1 µL	0,5 µM
Encebador 2 (10 µM)	1 µL	0,5 µM
Encebador 3 (10 µM)	1 µL	0,5 µM
Takara Taq HS (5 U/µL)	0,1 µL	0,025 U/µL
UNG (2 U/µL)	0,2 µL	0,02 U/µL
ADN motlle (50 ng/µL)	2 µL	5 ng/µL
H ₂ O	11,1 µL (fins a 20 µL)	-
Volum final: 20 µL		

Taula 4.4. Seqüències dels encebadors per genotipar Tk2, Ent1 i Dguok en ratolins.

	Encebador	Seqüència
Genotipatge de Tk2	Encebador 1	5' – CCTGTGAGGACAGGAGACCT – 3'
	Encebador 2	5' – TACCATGATGCCAGCCGATG – 3'
	Encebador 3	5' – GCCAGCTCATTCTCCCACTC – 3'
Genotipatge d'Ent1	Encebador 1	5' – AAGTGTGGGTCATCACACTGCTTC – 3'
	Encebador 2	5' – GTCCAGGCGGTTTGTGAAAT – 3'
	Encebador 3	5' – ATGAGATCCAACCTGGTCTCCTG – 3'
Genotipatge de Dguok	Encebador 1	5' – CACGTCGACTCCCAGTCATC – 3'
	Encebador 2	5' – CCACAGGGACTCGCAGATTT – 3'
	Encebador 3	5' – GCCCATGTCAATCCTGGT – 3'

Taula 4.5. Condicions d'amplificació de la PCR per al genotipatge de Tk2, Ent1 i Dguok en ratolins.

Condicions per al genotipatge de Tk2 i Dguok			Condicions per al genotipatge d'Ent1		
Temperatura	Temps	Cicles	Temperatura	Temps	Cicles
25°C	10 minuts	1	25°C	10 minuts	1
95°C	2 minuts	1	95°C	2 minuts	1
95°C	30 segons	30	95°C	30 segons	30
60°C	30 segons		58°C	30 segons	
72°C	30 segons		72°C	45 segons	
72°C	10 minuts	1	72°C	10 minuts	1

4.2.2.3. Obtenció i processament de mostres de sang i òrgans

Els ratolins van ser morts per decapitació, excepte els ratolins de 29 dies d'edat dels estudis de seguretat gènica de la colònia *Tk2*^{-/-}, que van ser morts per dislocació cervical. Les mostres de sang es van recollir immediatament després de la decapitació, excepte en els experiments farmacocinètics, que es van obtenir punxant sobre la vena safena. En tots els casos la sang es va recollir en capil·lars de 100 µL recoberts de l'anticoagulant EDTA (*Microvette capillary tubes*, SARSTEDT) i es van mantenir en gel fins a ser processats. Per a l'obtenció de plasma es va diluir la sang total amb PBS fred amb un factor de dilució variable, depenent del volum de sang obtingut. Posteriorment, es va centrifugar la sang a 3.500 x g durant 5 minuts a 4°C, es va recollir el sobrenedant (plasma diluït) i es van guardar les mostres a -20°C fins a la seva anàlisi.

L'obtenció dels òrgans (cervell, fetge, cor i múscul gastrocnemi + soli) es feia extraient els òrgans immediatament després de la decapitació i congelant-los immediatament submergint-los en nitrogen líquid. Posteriorment, es guardaven a -80°C fins a ser processats.

4.2.3. Extracció d'ADN

4.2.3.1. A partir de cèl·lules en cultiu

L'extracció d'ADN de cèl·lules en cultiu es va fer a partir de *pellets* cel·lulars guardats a -20°C (Secció 4.2.1.4). L'extracció d'ADN sobre el *pellet* cel·lular es va fer amb el *kit* comercial *QiAmp DNA Mini Kit (QiAgen)* seguint el protocol proporcionat pel fabricant específic per cèl·lules en cultiu. L'ADN es va eluir en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, es va quantificar espectrofotomètricament (Secció 4.2.4) i guardar a -20°C fins a ser utilitzat. Aquests ADNs van ser utilitzats per a l'anàlisi de l'ADNmt: nombre de còpies d'ADNmt (Secció 4.2.7), presència de deleccions múltiples (Secció 4.2.8) i seqüenciació d'alta profunditat (Secció 4.2.9).

4.2.3.2. A partir de teixits de ratolí

4.2.3.2.1. Per genotipar

L'extracció d'ADN es feia a partir de mostres d'orella o de cua dels ratolins. Els procediment a seguir va ser el següent:

- Submergir la mostra de teixit en buffer de lisi (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2,5 mM, SDS 0,5% (p/v)) suplementat amb proteïnasa K 0,2 mg/mL.
- Incubar a 55°C durant 5 – 12 hores.
- Afegir 75 µL d'acetat potàssic 8 M i fer vòrtex.
- Afegir 500 µL de cloroform i fer vòrtex.
- Centrifugar a 13.000 x *g* durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Transferir la fase aquosa a un tub nou.
- Afegir 2 volums d'etanol absolut i fer vòrtex.
- Centrifugar a 13.000 x *g* durant 25 minuts a temperatura ambient.
- Eliminar el sobrenedant i afegir 1 mL d'etanol al 75% per rentar el *pellet*.
- Centrifugar a 13.000 x *g* durant 10 minuts a temperatura ambient.

- Eliminar el sobrenedant i deixar evaporar les restes d'etanol. Es posa el tub a 55°C per ajudar a l'evaporació.
- Un cop no hi ha restes d'etanol al tub i el *pellet* està sec es redissol en 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0.
- Es guarda la solució d'ADN a 4°C fins el seu ús per genotipar (Secció 4.2.2.2) o es conserva a -20°C a llarg termini si cal per a usos posteriors.

4.2.3.2.2. Per estudis bioquímics

L'extracció d'ADN es va fer a partir de mostres d'òrgan congelades (Secció 4.2.2.3) les quals es van polvoritzar amb un morter i en presència de nitrogen líquid per evitar la seva descongelació. Partint d'aproximadament 20 mg de teixit polvoritzat es va fer l'extracció de l'ADN amb el *kit* comercial *QiAmp DNA Mini Kit (QiAgen)* seguint el protocol específic per teixits proporcionat pel fabricant. L'ADN es va eluir en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, es va quantificar (Secció 4.2.4) i es va guardar a -20°C fins a ser utilitzat. Aquests ADNs van ser utilitzats per l'estudi d'ADNmt: quantificació del nombre de còpies per qPCR (Secció 4.2.7), anàlisi de la presència de delecions múltiples (Secció 4.2.8) i seqüenciació massiva (Secció 4.2.9).

4.2.3.3. A partir de sang de pacients amb mutacions en *TK2*

L'extracció d'ADN a partir de sang es va fer amb el *kit* comercial *QiAmp DNA Mini Kit (QiAgen)* seguint el protocol proporcionat pel fabricant partint de 400 µL de sang. L'ADN es va eluir en Tris-HCl 10 mM pH 8,0, es va quantificar (Secció 4.2.4) i guardar a -20°C fins a ser utilitzat. Aquests ADNs van ser utilitzats per a l'anàlisi de la presència de delecions múltiples (Secció 4.2.8), seqüenciació massiva de l'ADNmt i seqüenciació d'un panell de gens nuclears (Secció 4.2.9).

4.2.4. Quantificació d'ADN

La quantificació d'ADN es va fer amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific)*. Es van carregar 2 µL de mostra en el pedestal inferior, es va baixar el braç de mostreig i es va llegir l'absorbància a 260 nm. A partir de la llei de Lambert-Beer es va calcular la concentració d'ADN:

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

On c és la concentració d'ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$, A és l'absorbància a 260 nm, b és la longitud de la trajectòria de la llum en cm i ϵ és el coeficient d'extinció que en el cas d'ADN bicatenari és $0,02 \mu\text{L} \times \text{ng}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

La quantificació de mostres amb baixa concentració d'ADN, que correspon a les mostres que són producte de la PCR llarga (Secció 4.2.8) per posteriorment seqüenciar (Secció 4.2.9), es va fer amb el fluoròmetre *Qubit® 2.0* (ThermoFisher Scientific) amb els kits d'assajos d'ADN bicatenari *Qubit™ BR* (ThermoFisher Scientific) (gamma àmplia), que mesura en un rang de concentració de 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$ a 1.000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ o *Qubit™ HS* (ThermoFisher Scientific) (alta sensibilitat), que mesura en un rang de concentració de 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

4.2.5. Quantificació de proteïnes

La determinació de la concentració de proteïna es va fer en homogenats de teixit de ratolí per després mesurar nucleòsids (Secció 4.2.10) o nucleòtids (Secció 4.2.11) i normalitzar els seus valors per la quantitat de proteïna.

Per a la mesura de proteïna es va fer una corba estàndard amb diferents concentracions (1 mg/mL , 0,5 mg/mL , 0,25 mg/mL , 0,125 mg/mL i 0,0625 mg/mL) a partir d'una solució d'albúmina de sèrum boví a una concentració de 2 mg/mL , la qual es va diluir seriadament en la mateixa matriu en la qual estaven les mostres a mesurar.

En plaques de 96 pous es van posar per triplicat 5 μL de cada punt de la corba i 5 μL de cada mostra, posteriorment es van posar 200 μL del reactiu *Coomassie Protein Assay Reagent* (ThermoFisher Scientific) per pou. Aquest reactiu té color marró en medi aquós, però en un ambient hidrofòbic, que es dona a l'interior de la proteïna, presenta color blau. Al posar aquest reactiu amb la mostra i incubar 5 minuts a temperatura ambient s'obté un color blau amb tonalitat d'intensitat creixent amb la quantitat de proteïna. Posteriorment, utilitzant el lector de plaques *Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode microplate Reader* (ThermoFisher Scientific), es va determinar l'absorbància a 590 nm, que és proporcional a la quantitat de proteïna. Finalment, es calcula la concentració de proteïna de les mostres problema interpolant els seus valors d'absorbància amb els de la corba estàndard.

4.2.6. Electroforesi

Es va fer electroforesi en gel d'agarosa per tal de visualitzar les bandes d'ADN després d'haver fet la PCR per genotipar (Secció 4.2.2.2) i la PCR llarga (Secció 4.2.8). El percentatge d'agarosa va ser del 2% (p/v) per resoldre les bandes del genotipat i del 0,8% (p/v) per resoldre les bandes de la PCR llarga. L'agarosa es va afegir, en el percentatge corresponent, al tampó Tris – borat – EDTA (Tampó TBE: Tris 89 mM, àcid bòric 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3) i la barreja es va escalfar en un microones per a solubilitzar l'agarosa. Posteriorment, es va afegir l'agent intercalant BrEt (0,6 µg/mL) a la solució encara tèbia i líquida i es va deixar refredar en el motlle fins que la solució gelifiqués.

Per al genotipat, es carregaven al gel 10 µL de producte de PCR juntament amb 2 µL de tampó de càrrega (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, glicerol 50% (v/v), Orange G 0,3% (p/v), pH 8,0). Com a marcador de pes s'utilitzava *GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* (ThermoFisher Scientific) i es corria 60 – 120 minuts a 100 V. Per a la PCR llarga, es carregaven al gel 2 µL de producte de PCR juntament amb 2 µL de tampó de càrrega, s'utilitzava el marcador de pes λ *DNA/HindIII* (ThermoFisher Scientific) i es corria durant 3 hores a 100 V. Després de córrer els gels es visualitzaven les bandes en el trans-il·luminador *Gel Doc™ XR+ Molecular Imager* (BioRad).

La comprovació de la mida dels fragments d'ADN en els procediments de seqüenciació d'alta profunditat (Secció 4.2.9) es va fer amb electroforesi capil·lar amb l'aparell *QiAxcel* (QiAgen) diluint les mostres 1/5 amb el tampó *QX DNA dilution buffer* (QiAgen).

4.2.7. PCR quantitativa (qPCR)

La PCR quantitativa (qPCR) permet la quantificació del nombre de còpies d'ADNmt i relativitzar-lo al nombre de còpies d'ADNn. En aquesta tesi es va utilitzar la tecnologia *TaqMan™* de PCR a temps real. Aquesta tècnica es basa en l'ús d'un encebador directe i d'un revers que amplifiquen una regió d'ADN. Al mig de la zona d'ADN que s'amplifica s'uneix una sonda d'hidròlisi *TaqMan™* que té un marcador fluorescent en l'extrem 5' i un *quencher* o extintor de fluorescència en l'extrem 3'. En les condicions inicials, la sonda íntegra s'uneix a l'ADN motlle per complementarietat de seqüència, de manera que el *quencher* i el fluoròfor es troben a prop i el primer absorbeix la fluorescència del segon.

Durant l'elongació de la cadena d'ADN a partir de l'encebador gràcies a l'acció de la polimerasa, la seva activitat exonucleasa 5' – 3' hidrolitza la sonda de manera que el marcador fluorescent i el *quencher* queden allunyats espacialment i el *quencher* ja no té capacitat d'absorbir la fluorescència. En aquest moment el detector de fluorescència del termociclador detecta senyal fluorescent, que va augmentant de manera exponencial d'acord amb els cicles d'amplificació de l'ADN motlle. En cada cicle d'amplificació la fluorescència va augmentant fins arribar a un punt en que aquesta supera un llindar o *threshold*. El cicle d'amplificació en el qual la fluorescència arriba al llindar establert s'anomena *Cycle threshold* (Ct) i és inversament proporcional a la quantitat d'ADN motlle de la mostra inicial. D'aquesta manera, com més baixa sigui el Ct, més quantitat inicial d'ADN hi ha, ja que es triguen menys cicles d'amplificació per arribar al llindar de fluorescència.

Per a una amplificació de PCR totalment eficient (on en cada cicle es dupliquen les còpies del fragment d'ADN amplificat) la relació entre el nombre de còpies d'ADN inicial i el Ct ve donada per la següent fórmula:

$$Ct = -3,322 \times \log_{10}(N_0) + Ct_0$$

On Ct és el *Cycle threshold*, N_0 és el nombre de còpies inicial d'ADN i Ct_0 és el Ct teòric quan $N_0=1$. La representació de Ct a l'eix Y contra $\log_{10}(N_0)$ a l'eix X es pot utilitzar com a corba estàndard, ja que dona lloc a una funció lineal amb pendent -3,322 (si l'eficiència en l'amplificació és del 100%) i una ordenada a l'origen que pot variar en funció el valor llindar de la fluorescència escollida (*threshold*).

Per a la determinació del nombre de còpies d'ADNmt en mostres humanes es van utilitzar uns encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor FAM i el *quencher* MGB dissenyats per encàrrec contra el gen mitocondrial *MT-RNR1*, que codifica l'ARNr 12S (Taula 4.6). Les còpies d'ADNmt es van normalitzar pel nombre de còpies d'un gen nuclear de còpies única, el *RPPH1*, que codifica la fracció ARN de l'enzim ARNasa P, utilitzant el kit comercial *TaqMan™ RNase P Control Reagents Kit* (ThermoFisher Scientific) que conté els encebadors i la sonda marcada amb el fluoròfor VIC i el *quencher* TAMRA contra aquest gen nuclear.

Com que les dues sondes tenien un fluoròfor diferent que emet fluorescència a diferent longitud d'ona es va fer la determinació del nombre de còpies d'ADNmt en mode múltiplex,

és a dir, que les dues amplificacions (mitocondrial i nuclear) es van portar a terme simultàniament en un únic pou de reacció. Els detalls d'aquest mètode per quantificar ADNmt humà han estat descrits prèviament pel nostre grup ¹³⁰.

De forma similar, per a la determinació del nombre de còpies d'ADNmt en mostres de ratolí es van utilitzar uns encebadors i sonda marcada amb el fluoròfor FAM i *quencher* MGB dissenyats per encàrrec contra el gen mitocondrial *mt-rnr2*, que codifica l'ARNr 16S (Taula 4.6), que es va normalitzar pel nombre de còpies del gen nuclear de còpia única *Ang1*, que codifica l'angiogenina 1, utilitzant el *kit* comercial (*ANG1 Inventoried Assay ThermoFisher Scientific: Mm00833184_s1*) que conté els encebadors i la sonda marcada amb el fluoròfor FAM i el *quencher* MGB contra aquest gen nuclear. Donat que les dues sondes tenien el mateix fluoròfor, en aquest cas, a diferència de l'amplificació dels gens humans, l'amplificació no es va fer en mode múltiplex, sinó que es va fer en reaccions i pous separats.

Per tal de poder fer quantificacions absolutes del nombre de còpies, per a cada placa de determinació qPCR es van processar dues corbes estàndard amb quantitats conegudes dels fragments a amplificar (Secció 4.2.7.2).

Taula 4.6. Encebadors i sonda per a l'amplificació de l'ADNmt en mostres humanes i de ratolí. En la taula s'indiquen les seqüències i posicions sobre l'ADNmt. Les posicions dels encebadors i sonda estan indicades sobre la seqüència de referència de l'ADNmt amb nombre d'accés NC_012920.1 en el cas dels humans i NC_005089.1 en el cas dels ratolins.

Seqüència			Posició de l'encebador
Mostres humanes	Encebador <i>MT-RNR1</i> directe	5' – CCACGGGAAACAGCAGTGAT – 3'	805 – 824
	Encebador <i>MT-RNR1</i> revers	5' – CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA – 3'	903 – 927
	Sonda <i>MT-RNR1</i>	FAM – 5' – TGCCAGCCACCGCG – 3' – MGB	888 – 900
Mostres de ratolí	Encebador <i>mt-rnr2</i> directe	5' – AATGGTTCGTTTGTTCACGATT – 3'	2.470 – 2.492
	Encebador <i>mt-rnr2</i> revers	5' – AGAAACCGACCTGGATTGCTC – 3'	2.522 – 2.542
	Sonda <i>mt-rnr2</i>	FAM – 5' – AAGTCCTACGTGATCTGAGTT – 3' – MGB	2.494 – 2.514

4.2.7.1. Preparació de les mostres

Encara que les sondes i encebadors per a la determinació del nombre de còpies van ser diferents en mostres humanes i de ratolins, el procediment per a la preparació de la placa i de les mostres va ser el mateix amb la diferència que la quantificació de l'ADNmt i ADNn en mostres humanes es va fer en mode múltiplex, mentre que la determinació del nombre de còpies en ratolins es va determinar per separat en dues reaccions diferents.

En tots els casos es va partir d'ADN extret de cèl·lules (Secció 4.2.3.1) o teixits (Secció 4.2.3.2.2) i es feia una dilució 1/3 amb el mateix Tris 10 mM pH 8,0 amb el qual es va eluir l'ADN. Aquesta dilució serveix per veure que l'amplificació no està interferida, ja que la mostra diluïda 3 vegades hauria de tenir 3 vegades menys ADN que la no diluïda.

4.2.7.2. Preparació dels estàndards

Per a la determinació del nombre de còpies d'ADNmt i d'ADNn es van utilitzar una sèrie d'estàndards que contenien diferent nombre de còpies coneguts d'un plasmidi amb el fragment diana del gen d'interès mitocondrial (*MT-RNR1* per humans i *mt-rnr2* per ratolins) o nuclear (*RPPH1* per humans i *Ang1* per ratolins) clonat. A partir de l'ajust dels Ct obtinguts per als estàndards a la funció indicada més amunt es va obtenir una corba de calibratge i els Cts de les mostres es van interpolar en aquestes corbes per obtenir els resultats en nombre de còpies.

Els estàndards són diferents si el que es vol determinar és el nombre de còpies en mostres humanes o de ratolí. Com que en mostres humanes es fa qPCR múltiplex es parteix d'un estàndard que conté els dos plasmidis: un que conté clonat l'amplicó del gen mitocondrial *MT-RNR1* i un que conté clonat l'amplicó del gen nuclear *RPPH1*. A partir del primer estàndard (el més concentrat) es fan dilucions seriades amb Tris 10 mM pH 8,0 (Taula 4.7). Com que la qPCR en ratolí no es múltiplex es parteix de dos estàndards per separat: un conté clonat l'amplicó del gen mitocondrial *mt-rnr2* i l'altre conté clonat l'amplicó del gen nuclear *Ang1*. En tots dos casos, a partir de l'estàndard més concentrat es van fer dilucions seriades amb Tris 10 mM pH 8,0 (Taula 4.8).

Taula 4.7. Estàndards per a la mesura del nombre de còpies d'ADNmt en mostres humanes. Nombre de còpies del plasmidi que conté el gen MT-RNR1 i RPPH1 dels estàndards utilitzats per a la quantificació del nombre de còpies d'ADNmt (MT-RNR1) i ADNn (RPPH1) en mostres humanes.

	Nombre de còpies/ μ L del fragment del gen <i>MT-RNR1</i>	Nombre de còpies/ μ L del fragment del gen <i>RPPH1</i>
Estàndard 1	1.800.000	18.000
Estàndard 2	600.000	6.000
Estàndard 3	200.000	2.000
Estàndard 4	66.666	666
Estàndard 5	22.222	222

Taula 4.8. Estàndards per a la mesura del nombre de còpies d'ADNmt en mostres de ratolí. Nombre de còpies del plasmidi que conté el gen *mt-rnr2* i *Ang1* dels estàndards utilitzats per a la quantificació del nombre de còpies d'ADNmt (*mt-rnr2*) i ADNn (*Ang1*) en mostres de ratolí.

	Nombre de còpies/ μ L del fragment del gen <i>mt-rnr2</i>	Nombre de còpies/ μ L del fragment del gen <i>Ang1</i>
Estàndard 1	3.690.000	108.000
Estàndard 2	1.230.000	18.000
Estàndard 3	410.000	3.000
Estàndard 4	136.670	500
Estàndard 5	45.555	250

4.2.7.3. Preparació de la mescla de reacció i de la placa

En primer lloc es feia una mescla de reacció amb tots els components per a l'amplificació de l'ADN en mostres humanes (Taula 4.9) o en mostres de ratolí (Taula 4.10). La qPCR es muntava en plaques de 384 pous i s'afegien 7,5 μ L de mescla de reacció a cada pou i 2,5 μ L de la solució d'ADN (estàndards, mostres problema o control de qualitat). Les plaques es segellaven amb una làmina adhesiva i es feia un *spin* breu amb la centrífuga per baixar tot el volum. Després es posava la placa en un termociclador *QuantStudio 7 pro* (ThermoFisher Scientific) amb el programa de la Taula 4.11.

Taula 4.9. Mescla de reacció per amplificar l'ADNmt i ADNn en mostres humanes.

	Reactiu (concentració original)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
Amplificació múltiplex d'ADNmt i ADNn en mostres humanes	TaqMan® Universal PCR Master Mix II, with UNG (2X) (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	5 µL	1X
	Encebador <i>MT-RNR1</i> directe (4 µM)	0,25 µL	100 nM
	Encebador <i>MT-RNR1</i> revers (4 µM)	0,25 µL	100 nM
	Sonda <i>MT-RNR1</i> (5 µM)	0,25 µL	125 nM
	Assaig RNasa P (20x) (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	0,5 µL	1X
	H ₂ O	1,25 µL (fins a 7,5 µL)	-
	ADN (concentració variable)	2,5 µL	Variable
Volum final: 10 µL			

Taula 4.10. Mescla de reacció per amplificar l'ADNmt i ADNn en mostres de ratolí.

	Reactiu (concentració original)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
Amplificació d'ADNmt en mostres de ratolí	TaqMan® Universal PCR Master Mix II, with UNG (2X) (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	5 µL	1X
	Encebador mt-rnr2 directe (10 µM)	0,3 µL	300 nM
	Encebador mt-rnr2 revers (10 µM)	0,3 µL	300 nM
	Sonda mt-rnr2 (5 µM)	0,3 µL	150 nM
	H ₂ O	1,6 µL (fins a 7,5 µL)	-
	ADN (concentració variable)	2,5 µL	Variable
Volum final: 10 µL			
Amplificació d'ADNn en mostres de ratolí	TaqMan® Universal PCR Master Mix II, with UNG (2X) (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	5 µL	1X
	Assaig ANG1 (20X) (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	0,5 µL	1X
	H ₂ O	2 µL (fins a 7,5 µL)	-
	ADN (concentració variable)	2,5 µL	Variable
Volum final: 10 µL			

Taula 4.11. Condicions per a l'amplificació en la qPCR en mostres humanes i de ratolí. La lectura de la fluorescència es feia al final de cada cicle d'amplificació.

Temperatura	Temps	Cicles
50°C	2 minuts	1
95°C	10 segons	1
95°C	15 segons	40
60°C	1 minut	

4.2.7.4. Controls de qualitat i de precisió del mètode

Cada cop que es carregava una placa de qPCR es posaven unes mostres d'ADN amb valors coneguts del nombre de còpies d'ADNmt per poder validar els resultats de les mostres problema que es mesuraven. Aquestes mostres d'ADN es van obtenir en gran quantitat al nostre laboratori a partir d'extractes de diferents teixits humans i de ratolins i aquest ADN es va congelar en alíquotes per poder ser utilitzat cada cop que es muntava una placa de qPCR. La variabilitat dels resultats d'aquests controls al llarg de múltiples plaques de diferents dies va permetre determinar la precisió interserial del mètode durant el desenvolupament d'aquesta tesi, que va tenir un coeficient de variació d'entre el 23% i el 33% (Taula 4.12) (Figura Suplementària 2).

Taula 4.12. Controls de mètode de la qPCR i precisió interserial. La taula inclou el tipus de mostra origen de l'ADN, la mitjana de la ràtio ADNmt/ADNn, desviació estàndard, nombre de mostres analitzades (n) i coeficient de variació resultant (per a qPCR d'ADN humà i murí).

	Origen de l'ADN	Mitjana (ADNmt/ADNn)	Desviació estàndard	Coefficient de variació (%)	n
qPCR de mostres humanes	Múscul esquelètic	1.177	272	23	24
	Cèl·lules limfoblastoides	544	180	33	25
	Sang	48	14	28	23
qPCR de mostres de ratolins	Cor	6.813	2.249	33	12
	Fetge	1.789	477	27	13
	Intestí	258	81	31	13
	Múscul esquelètic	7.215	1.955	27	13

4.2.8. Anàlisi de presència de deleccions múltiples mitjançant PCR llarga

La presència de deleccions múltiples sobre l'ADNmt va ser analitzada en mostres d'ADN procedents de:

- Fibroblasts amb mutacions en gens associats a MDDS en els temps t0 i t20 amb i sense tractament amb dNs (Secció 4.2.3.1).
- Múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge de ratolins KO per *Tk2* tractats amb PBS o dCtd + dThd (Secció 4.2.3.2.2).
- Fetge i cervell de ratolins KO per *Dguok* tractats amb PBS o dAdo + dGuo (Secció 4.2.3.2.2).
- Sang de pacients amb mutacions en *TK2* no tractats i sotmesos a tractament de dCtd + dThd (Secció 4.2.3.3).

En la PCR llarga es va amplificar quasi tot l'ADNmt (16.267 pb en el cas de mostres humanes i 15.779 pb en el cas de mostres de ratolí) utilitzant els encebadors (Taula 4.13) i el *kit* comercial *Takara LA Taq* (*Takara Bio*)¹³². La mescla dels components de la PCR en mostres d'humans i de ratolins estan recollides a la Taula 4.14 i a la Taula 4.15. Les condicions d'amplificació estan recollides a la Taula 4.16. Després de la PCR es visualitzaven les bandes d'ADNmt en un gel d'agarosa (Secció 4.2.6).

Taula 4.13. Encebadors per a l'amplificació de l'ADNmt amb la seva seqüència i posició sobre l'ADNmt. Les posicions dels encebadors estan indicades sobre la seqüència de referència de l'ADNmt amb nombre d'accés NC_012920.1 en el cas dels humans i NC_005089.1 en el cas dels ratolins.

Seqüència			Posició de l'encebador
Mostres humanes	Encebador directe	5' – ACCGCCCCGTCACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG – 3'	1.482 – 1.516
	Encebador revers	5' – ACCGCCAGGTCCTTTGAGTTTAAAGCTGTGGCTCG – 3'	1.180 – 1.146
Mostres de ratolí	Encebador directe	5' – GGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCCTACGTG – 3'	2.473 – 2.505
	Encebador revers	5' – GAGGTGATGTTTTGGTAAACAGGCGGGGT – 3'	1.953 – 1.924

Taula 4.14. Mescla de reacció per amplificar l'ADNmt en mostres humanes.

Reactiu (concentració original)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
LA PCR buffer II (10X)	5 µL	1X
MgCl ₂ (25 mM)	5 µL	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM)	8 µL	400 µM
Encebador directe (2 µM)	5 µL	200 nM
Encebador revers (2 µM)	5 µL	200 nM
Taq LA (5U/µL)	0,5 µL	0,05 U/µL
ADN (50 ng/µL)	1 µL	1 ng/µL
H ₂ O	20,5 µL (fins a 50 µL)	-
Volum final: 50 µL		

Taula 4.15. Mescla de reacció per amplificar l'ADNmt en mostres de ratolí.

Reactiu (concentració original)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
LA PCR buffer II (10X)	5 µL	1X
MgCl ₂ (25 mM)	5 µL	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM)	8 µL	400 µM
Encebador directe (5 µM)	5 µL	500 nM
Encebador revers (5 µM)	5 µL	500 nM
Taq LA (5U/µL)	0,5 µL	0,05 U/µL
ADN (50 ng/µL)	1 µL	1 ng/µL
H ₂ O	20,5 µL (fins a 50 µL)	
Volum final: 50 µL		

Taula 4.16. Condicions d'amplificació de l'ADNmt en mostres humanes i de ratolí.

Condicions en mostres humanes			Condicions en mostres de ratolins		
Temperatura	Temps	Cicles	Temperatura	Temps	Cicles
94°C	1 minut	1	92°C	2 minuts	1
98°C	10 segons	30	92°C	10 segons	30
68°C	11 minuts		68°C	12 minuts	
72°C	10 minuts	1	68°C	15 minuts	1

4.2.9. Seqüenciació d'alta profunditat

La seqüenciació d'alta profunditat sobre l'ADNmt es va fer en mostres d'ADN obtingudes a partir de:

- Fibroblasts de pacients amb mutacions en gens associats a MDDS en els temps t0 i t20 amb i sense tractament amb dNs (Secció 4.2.3.1).
- Múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge de ratolins KO per *Tk2* tractats amb PBS o dCtd + dThd (Secció 4.2.3.2.2).
- Fetge i cervell de ratolins KO per *Dguok* tractats amb PBS o dAdo + dGuo (Secció 4.2.3.2.2).
- Sang de pacients amb mutacions en *TK2* no tractats i sotmesos a tractament de dCtd + dThd (Secció 4.2.3.3).

La seqüenciació d'alta profunditat sobre l'ADNn es va fer sobre ADN de sang (Secció 4.2.3.3) de pacients amb dèficit de TK2 abans d'iniciar el tractament i ADN de sang dels mateixos pacients diversos mesos o anys després d'haver iniciat el tractament diari amb dCtd + dThd

per via oral (Taula 4.2) utilitzant el panell *QIAseq Targeted DHS-3501Z Human Comprehensive Cancer Panel* (Qiagen). Aquest panell inclou la seqüenciació de 836.670 kb que contenen 275 gens (Taula 4.17) amb especial susceptibilitat de ser mutats i que estan associats a càncer.

Taula 4.17. Llistat de gens de codificació nuclear seqüenciats amb el Human Comprehensive Cancer Panel.

ABL1	CBLB	EPAS1	GNAS	MCL1	PIK3CA	SMC3
ACVR1B	CBLC	EPHA3	GREM1	MDM2	PIK3R1	SMO
AKT1	CCND1	EPHA5	GRIN2A	MDM4	PIK3R2	SOC51
AKT2	CCND3	ERBB2	H3F3A	MED12	PIM1	SOX2
AKT3	CCNE1	ERBB3	HGF	MEF2B	PLCG1	SOX9
ALK	CD274	ERBB4	HIST1H3B	MEN1	PMS1	SPOP
AMER1	CD79A	ERG	HNF1A	MET	PMS2	SRC
APC	CD79B	ESR1	HOXB13	MITF	POLD1	SRSF2
AR	CDC73	ETV6	HRAS	MLH1	POLE	STAG2
ARAF	CDH1	EXO1	HSP90AA1	MPL	PPM1D	STAT3
ARID1A	CDK12	EZH2	ID3	MRE11A	PPP2R1A	STK11
ARID1B	CDK4	FAM175A	IDH1	MSH2	PRDM1	SUFU
ARID2	CDK6	FAM46C	IDH2	MSH6	PRKAR1A	SUZ12
ASXL1	CDKN2A	FANCA	IGF1R	MTOR	PRKDC	TAL1
ATM	CDKN2B	FANCC	IKZF1	MUTYH	PRSS1	TCF3
ATR	CDKN2C	FANCD2	IKZF3	MYC	PTCH1	TERT
ATRX	CEBPA	FANCE	IL7R	MYCL	PTEN	TET2
AURKA	CHEK1	FANCF	INHBA	MYCN	PTPN11	TGFBR2
AURKB	CHEK2	FANCG	IRF4	MYD88	RAC1	TNFAIP3
AURKC	CIC	FAS	JAK1	NF1	RAD21	TNFRSF14
AXIN1	CREBBP	FBXW7	JAK2	NF2	RAD50	TP53
AXIN2	CRLF2	FGF4	JAK3	NFE2L2	RAD51	TRAF3
B2M	CSF1R	FGF6	KAT6A	NFKBIA	RAF1	TSC1
BAP1	CSF3R	FGFR1	KDM5C	NKX2-1	RB1	TSC2
BCL2	CTCF	FGFR2	KDM6A	NOTCH1	RET	TSHR
BCL2L1	CTNNA1	FGFR3	KDR	NOTCH2	RHEB	U2AF1
BCL6	CTNNB1	FGFR4	KEAP1	NOTCH3	RHOA	U2AF2
BCOR	CUX1	FH	KIT	NPM1	RIT1	VHL
BCORL1	CXCR4	FLCN	KMT2A	NRAS	RNF43	WHSC1
BCR	CYLD	FLT3	KMT2B	NSD1	ROS1	WT1
BIRC3	DAXX	FLT4	KMT2C	NTRK1	RUNX1	XPO1
BLM	DDR2	FOXL2	KMT2D	NTRK2	SDHB	XRCC2
BRAF	DICER1	FUBP1	KRAS	NTRK3	SETBP1	XRCC3
BRCA1	DNM2	GALNT12	LRP1B	PAK3	SETD2	ZNF217
BRCA2	DNMT3A	GATA1	MAP2K1	PALB2	SF3B1	ZRSR2
BRIP1	DOT1L	GATA2	MAP2K2	PAX5	SMAD2	
BTK	EED	GATA3	MAP2K4	PBRM1	SMAD4	
CALR	EGFR	GEN1	MAP3K1	PDGFRA	SMARCA4	
CARD11	EGLN1	GNA11	MAP3K14	PDGFRB	SMARCB1	
CBL	EP300	GNAQ	MAPK1	PHF6	SMC1A	

La seqüenciació d'*Illumina* inclou diferents passos que s'expliquen a continuació: preparació de les llibreries (diferent per la seqüenciació d'ADNmt (Secció 4.2.9.1) i ADNn (Secció 4.2.9.2)), generació de clústers (Secció 4.2.9.3), seqüenciació (Secció 4.2.9.4) i anàlisi de dades (Secció 4.2.9.5).

4.2.9.1. Preparació de les llibreries per a la seqüenciació de l'ADNmt

La seqüenciació de l'ADNmt es va fer de forma múltiplex, és a dir, seqüenciant a la vegada diferents llibreries que venien de diferents mostres. Per poder multiplexar llibreries i identificar quines seqüències pertanyen a cada mostra cal marcar aquesta amb una seqüència específica (índex), procés que es dona durant la preparació de llibreries. A més, en aquest procés també s'introdueixen adaptadors que són seqüències utilitzades posteriorment en el procés de formació de clústers (Secció 4.2.9.3) i seqüenciació (Secció 4.2.9.4). En tots els experiments de seqüenciació d'ADNmt es van multiplexar 45 llibreries, corresponents a 45 mostres diferents.

Es van fragmentar 1.000 ng de l'amplicó d'ADNmt obtingut en la PCR llarga (Secció 4.2.8) utilitzant el kit *NEBNext® dsDNA Fragmentase®* (NewEngland BioLabs) incubant l'ADN a 37°C durant 22 minuts aconseguint fragments d'aproximadament 250 pb. Posteriorment, es va parar la reacció de fragmentació afegint 8 µL d'EDTA 0,5 M dissolt en Tris 10 mM pH 7,4 i es van purificar els fragments que tenien la mida d'interès amb el kit de boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *Ampure XP magnetic beads* (Beckman Coulter) i l'ajuda d'un imant per a tires de PCR de 8 pous. D'aquesta manera per a cada mostra s'obté una llibreria amb diferents fragments de l'ADNmt (Figura 4.10).

Posteriorment, es van reparar els extrems dels fragments d'ADN afegint un fosfat a l'extrem 5' i una cua d'adenina a l'extrem 3', es va lligar un adaptador que circularitza els fragments a seqüenciar i es van tallar aquests fragments per obtenir una molècula d'ADN lineal gràcies a l'uracil present en l'adaptador. Després, mitjançant les boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *Ampure XP magnetic beads* (Beckman Coulter) i un imant per a tires de PCR de 8 pous es van purificar els fragments d'interès per posteriorment fer una PCR de cicles curts on s'afegeixen índexs als fragments d'ADN, gràcies a l'ús d'encebadors que tenen les seqüències dels índexs que es volen introduir a l'extrem 5'. Finalment, es van tornar a purificar els

fragments de la mida d'interès amb les boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *Ampure XP magnetic beads* (Beckman Coulter) i un imant per a tires de PCR de 8 pous (Figura 4.10).

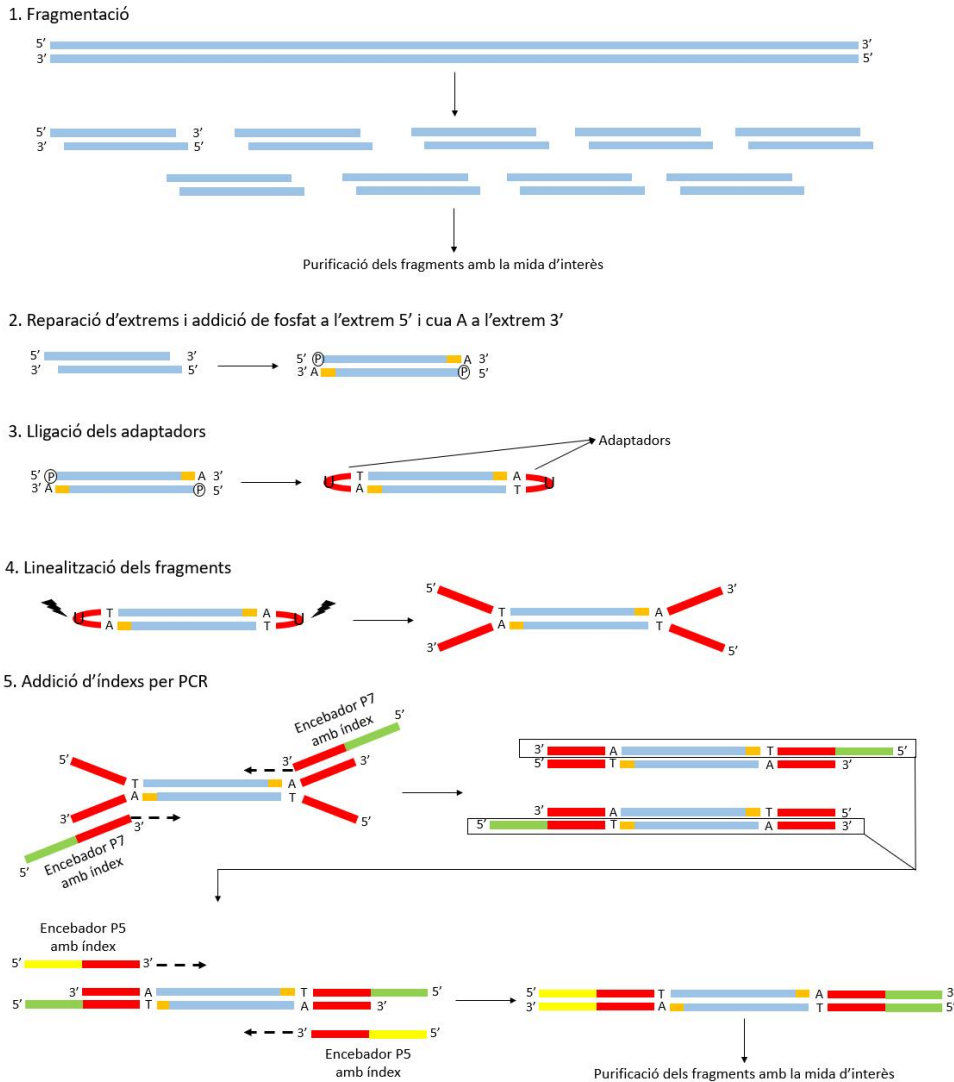


Figura 4.10. Esquema del procés de preparació de la llibreria per a seqüenciar l'ADNmt. Primer es fragmenta l'ADN aleatòriament i es purifiquen els fragments de la mida d'interès. Posteriorment, es reparen els extrems dels fragments, es lliquen adaptadors i es linealitzen les molècules per fer una PCR curta que introdueix índex que són seqüències que identifiquen la mostra amb les molècules d'ADN i que són útils per al procés de generació de clústers i seqüenciació. Finalment es purifiquen els fragments de la mida d'interès.

El procés de preparació de les llibreries resulta en l'addició d'adaptadors i índexs als fragments d'ADN a seqüenciar que serviran per identificar cada mostra o llibreria, per poder unir la molècula d'ADN a la cel·la de flux on es fa la reacció de seqüenciació i per poder anellar els encebadors utilitzats per començar la reacció de polimerització i seqüenciació. La preparació de les llibreries amb índexs i adaptadors es va fer amb els kits *NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®* i *NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual Index Primers Set 1)* (New England BioLabs) seguint les instruccions del fabricant.

Posteriorment a la preparació de les llibreries es determinava la mida dels fragments que la formen amb electroforesi capil·lar utilitzant l'aparell *QiAxcel (QiAgen)* (Secció 4.2.6) i es mesurava la seva concentració amb el fluorímetre *Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific)* amb el kit d'assajos d'ADN bicatenari *Qubit™ BR (ThermoFisher Scientific)* (gamma àmplia). Després, s'ajuntaven totes les llibreries que venien de diferents mostres de forma equimolar, de manera que totes les llibreries estaven a concentració final de 10 nM, es diluïa fins a 4 nM i es tornava a mesurar la concentració de la mescla de llibreries amb el fluorímetre *Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific)* amb el kit d'assajos d'ADN bicatenari *Qubit™ HS (ThermoFisher Scientific)* (alta sensibilitat). Un cop es tenia la mescla de llibreries preparada a concentració 4 nM es desnaturalitzava l'ADN incubant-lo 5 minuts a temperatura ambient amb NaOH a concentració final 0,1 M i es neutralitzava amb el tampó HT1 inclòs al kit *MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina)*. En aquest moment la mescla de llibreries estava a 20 pM. En aquest punt es tornava a diluir amb tampó HT1 fins a tenir una concentració de 9 pM, que és la concentració que es va utilitzar per carregar la mescla de llibreries al cartutx de seqüenciació *MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina)*. D'aquesta manera, es van multiplexar 45 mostres en una mateixa carrera amb una profunditat teòrica mitjana de 10.000 lectures per base. Totes les carreres de seqüenciació d'ADNmt es van fer en l'equip *MiSeq System (Illumina)*.

4.2.9.2. Preparació de les llibreries per a la seqüenciació de l'ADNn

La seqüenciació de l'ADNn amb el *Human Comprehensive Cancer Panel* també es va fer de forma múltiplex seqüenciant 10 mostres diferents a la vegada. La generació de llibreries en aquestes mostres té el mateix objectiu que en la seqüenciació de mostres d'ADNmt: afegir

índexs per identificar cada seqüència amb la seva mostra i afegir adaptadors utilitzats en el procés de generació de clústers (Secció 4.2.9.3) i seqüenciació (Secció 4.2.9.4).

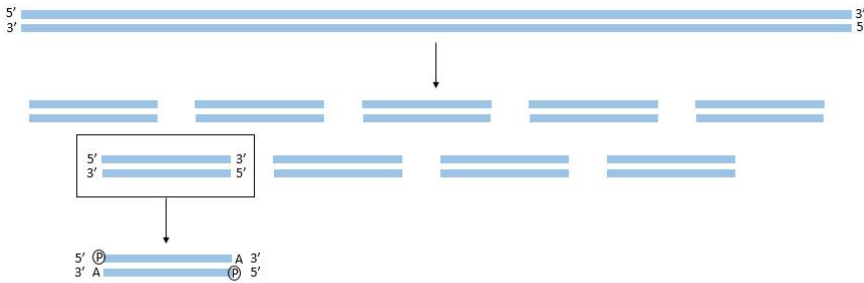
El procés de generació de les llibreries de l'ADNn (Figura 4.11) es va fer amb els kits *QIAseq Targeted DNA Panel HC (12)* (ref. 333512) (Qiagen) i *QIAseq 12-Index I (48)* (ref. 333714) (Qiagen) seguint el protocol del fabricant. La generació de llibreries es va fer partint de 30 ng d'ADN de cada mostra i en una mateixa reacció es va fragmentar l'ADN, es van reparar els extrems afegint fosfat als extrems 5' i es va lligar una adenina en els extrems 3' de tots els fragments. Posteriorment, aprofitant l'adenina introduïda en el pas anterior i el fosfat de l'extrem 5', es va fer una lligació dels fragments d'ADN amb els adaptadors que contenen, entre altres seqüències, dos tipus de seqüències d'interès: els *Unique Molecular Indexes* (UMIs) i els *Unique Dual Indexes* (UDIs). Els UMIs són seqüències de 12 nucleòtids aleatoris, de manera que hi ha 4¹² possibles seqüències. Aquestes seqüències úniques s'uneixen a cada fragment d'ADN abans de fer cap amplificació, de manera que cada un dels fragments queda marcat amb un UMI diferent. Els UMIs serveixen per validar que les variants que es reporten són variants reals de la mostra i que no es deuen a errors en el procés d'amplificació de l'ADN, ja que com s'han introduït en tots els fragments d'ADN abans de cap amplificació, totes les molècules que s'han amplificat a partir d'una mateixa molècula original i tenen el mateix UMI han de ser idèntiques. Per tant, si hi ha una variant, per poc freqüent que sigui, apareixerà en tots els fragments que tenen un mateix UMI. L'avantatge de treballar amb UMIs és que es poden donar per vàlides variants que tenen una freqüència molt baixa (propera a l'1%). Els UDI són els índexs, que permeten marcar tots els fragments d'ADN que venen d'una mostra amb la mateixa seqüència per poder fer la multiplexació de mostres. El procés de lligació dels adaptadors i índexs acaba amb la purificació dels fragments amb la mida d'interès utilitzant les boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *QIAseq Beads* incloses en el kit *QIAseq Targeted DNA Panel HC (12)* (ref. 333512) (Qiagen) i un imant per a tires de PCR de 8 pous (Figura 4.11).

Després de la lligació dels adaptadors es va fer la captura, també anomenada *target enrichment* o enriquiment de les zones de l'ADN que es volen seqüenciar. Aquest procés es fa mitjançant una PCR utilitzant un encebador (anomenat IL-FW) contra una regió present introduïda en els adaptadors i un còctel de 11.311 encebadors contra les seqüències dels

275 gens que es seqüenciaren amb el *Human Comprehensive Cancer Panel* (Taula 4.17). Això resulta en l'amplificació de les regions d'ADN que es volen seqüenciar. Posteriorment, es van purificar els fragments amb la mida d'interès mitjançant les boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *QIAseq Beads* incloses en el kit *QIAseq Targeted DNA Panel HC (12)* (ref. 333512) (*Qiagen*) i un imant per a tires de PCR de 8 pous. Finalment, es va fer una PCR universal utilitzant encebadors que s'uneixen a regions incloses en els adaptadors per introduir seqüències d'unió als oligonucleòtids de la cel·la de flux (Figura 4.11). La preparació de les llibreries finalitzava amb la purificació dels fragments d'ADN de la mida d'interès amb les boles magnètiques amb afinitat a l'ADN *QIAseq Beads* incloses en el kit *QIAseq Targeted DNA Panel HC (12)* (ref. 333512) (*Qiagen*) i un imant per a tires de PCR de 8 pous. Finalment, s'avaluava la qualitat de les llibreries mitjançant la determinació de la mida dels seus fragments amb electroforesi capil·lar amb l'aparell *QIAxcel* (*Qiagen*) (Secció 4.2.6). També es quantificaven les llibreries amb el fluorímetre *Qubit® 2.0* (*ThermoFisher Scientific*) i el kit d'assajos d'ADN bicatenari *Qubit™ HS* (*ThermoFisher Scientific*) (alta sensibilitat).

Un cop es tenien preparades totes les llibreries que es s'analitzarien en la mateixa carrera de seqüenciació s'ajuntaven totes de forma equimolar a concentració final de 10 nM, es diluïa a 4 nM i es tornava a mesurar la concentració d'ADN de la barreja amb el fluorímetre *Qubit® 2.0* (*ThermoFisher Scientific*) i el kit d'assajos d'ADN bicatenari *Qubit™ HS* (*ThermoFisher Scientific*) (alta sensibilitat). Posteriorment, es desnaturalitzaven 5 µL de llibreria 4 nM amb 5 µL de NaOH 0,2 M, de manera que el NaOH quedava a concentració en la reacció de 0,1 M. Passats 5 minuts a temperatura ambient es neutralitzava amb 5 µL Tris-HCl 200 mM pH 7,0. Després s'afegien 985 µL de buffer HT1 (inclòs en el kit *NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles)* (*Illumina*)) de manera que la llibreria quedava a una concentració de 20 pM. Finalment, es diluïa la mostra a 1,2 pM i es carregaven 1,3 mL d'aquesta mostra en el cartutx de seqüenciació *NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles)* (*Illumina*) utilitzant l'equip *NovaSeq* (*Illumina*). Utilitzant aquest cartutx es van poder carregar 10 mostres per carrera amb una profunditat mitjana de 6.000 lectures per base i 4,26 fragments llegits per UMI.

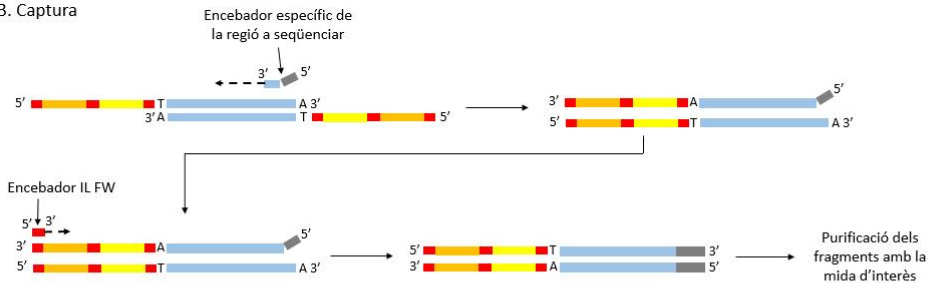
1. Fragmentació, reparació d'extrem i addició de fosfat a l'extrem 5' i cua A en l'extrem 3' en un sol pas



2. Lligació dels adaptadors que contenen UMIs i UDIs



3. Captura



4. PCR universal

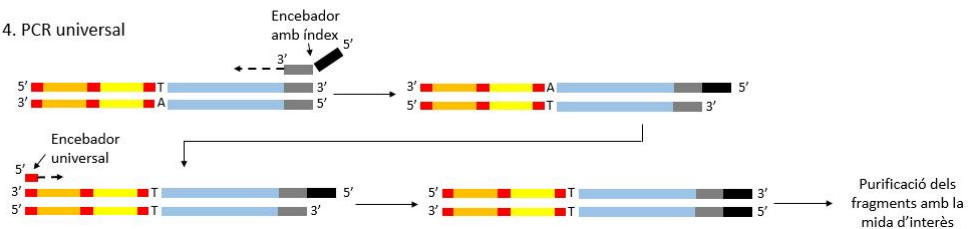


Figura 4.11. Esquema del procés de preparació de la llibreria per a seqüenciar ADNn utilitzant el panell Human Comprehensive Cancer Panel. Primer es fragmenta l'ADN i es reparen els extrems en una mateixa reacció, després es lliguen els adaptadors que contenen els UMIs i UDIs i es purifiquen els fragments de la mida d'interès. Finalment es fa la captura que consisteix en l'enriquiment per PCR de les regions de l'ADN que es volen seqüenciar i en l'addició de seqüències utilitzades en el procés de generació de clústers i seqüenciació.

4.2.9.3. Generació de clústers

Aquest procés es dona en la cel·la de flux i és el mateix per a la seqüenciació de mostres d'ADNmt i ADNn. Quan es carrega la mostra (que conté diversos fragments corresponents a diverses llibreries o mostres) en el cartutx de seqüenciació aquesta passa a la cel·la de flux.

La cel·la té uns oligonucleòtids units que són complementaris a la seqüència dels adaptadors introduïts en la mostra en el procés de creació de les llibreries. D'aquesta manera, tots els fragments d'ADN que venen de totes les mostres s'uneixen per complementarietat a aquests oligonucleòtids fixats en la cel·la de flux i es fa una amplificació utilitzant l'ADN a seqüenciar com a motlle (Figura 4.12).

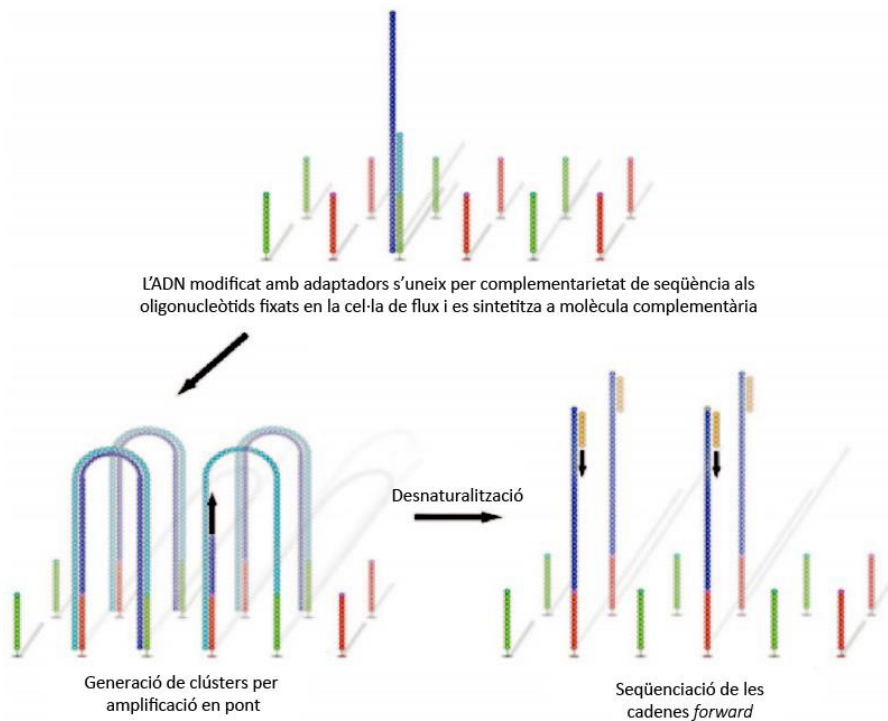


Figura 4.12. Esquema de la generació de clústers en la cel·la de flux. Les molècules a seqüenciar s'uneixen per complementarietat a oligonucleòtids fixats en la cel·la de flux i es sintetitza la cadena complementària, que és utilitzada per fer una amplificació en pont amb un segon tipus d'oligonucleòtid fixat a la cel·la de flux. Aquest procés es repeteix diverses vegades fins obtenir una expansió clonal d'aquella seqüència en els oligonucleòtids contigus donant lloc als clústers. Imatge modificada a partir de ³²³.

Una vegada sintetitzada la nova cadena, que queda unida a la cel·la de flux per l'extrem de l'oligonucleòtid, s'elimina l'ADN motlle i aquesta nova molècula sintetitzada crea un pont amb un segon tipus d'oligonucleòtid fixat en la cel·la de flux perquè l'extrem de l'ADN sintetitzat de nou, que no està fixat en la cel·la de flux, té una seqüència complementària a aquest segon oligonucleòtid de la cel·la de flux. Això dona lloc a una amplificació en pont.

Aquest pont de doble cadena és desnaturalitzat, de manera que s'obtenen dues cadenes d'ADN unides a la cel·la de flux. Aquest procés es repeteix diverses vegades i resulta en una amplifació (fins a 1.000 còpies) de la mateixa seqüència d'ADN en una zona de la cel·la de flux. Finalment, s'eliminen totes les molècules unides al primer tipus d'oligonucleòtid unit a la cel·la de flux (que correspondrien a la seqüència reversa a seqüenciar) (Figura 4.12). Aquest procés es dona en paral·lel amb tots els fragments d'ADN de totes les llibreries que es seqüencien a la vegada i dona lloc als clústers que són les unitats de seqüenciació. D'aquesta forma en la cel·la de flux s'han creat diversos clústers, tots a partir d'una única molècula d'ADN que havia estat processada en la preparació de les llibreries.

4.2.9.4. Seqüenciació

Un cop s'han creat els clústers es passa al procés de seqüenciació. En aquest procés, s'utilitzen uns encebadors universals complementaris als adaptadors introduïts en els fragments d'ADN a seqüenciar durant la preparació de la llibreria. Aquests encebadors s'uneixen en totes les molècules de tots els clústers i comencen la seqüenciació d'ADN.

La seqüenciació del sistema de *Illumina* utilitza la seqüenciació per síntesi, la qual es basa en l'ús dels quatre nucleòtids marcats amb diferent fluorescència (Figura 4.13). En cada cicle de polimerització un únic nucleòtid marcat s'uneix a la molècula d'ADN que s'està sintetitzant (el nucleòtid complementari al de la cadena motlle) i aquest serveix com a terminator de la síntesi, així en cada cicle de polimerització s'enregistra la fluorescència que correspon al nucleòtid incorporat. Després, hi ha una modificació química sobre la base que permet la incorporació del següent nucleòtid. El nombre d'aquests cicles determina el nombre de nucleòtids que es seqüencien. Finalment, es seqüencia la regió que conté els índexs que permeten identificar de quina mostra ve aquella seqüència. Tot aquest procés es dona en totes les molècules idèntiques d'un mateix clúster, fet que possibilita l'amplificació i lectura del senyal fluorescent per part de l'aparell. El resultat final és la lectura de fluorescència de milers de clústers corresponents a tots els fragments d'ADN que s'estan seqüenciant.

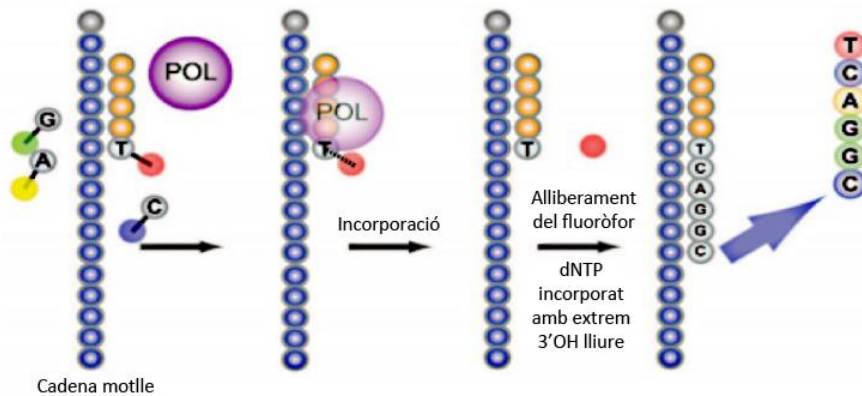


Figura 4.13. Esquema de la seqüenciació per síntesi utilitzat per Illumina. En el procés de seqüenciació s'incorpora el nucleòtid complementari a la cadena motlle que actua com a terminator de la síntesi, s'enregistra la fluorescència del nucleòtid i es modifica químicament per a que es pugui incorporar el següent nucleòtid complementari a la cadena motlle. Imatge modificada a partir de ³²³.

Un cop finalitzats aquests cicles de seqüenciació es desnaturalitza i s'elimina la cadena nova que s'ha sintetitzat, de manera que només queda la cadena motlle unida a la cel·la de flux per un extrem. Aquesta cadena, en l'extrem no unit a la cel·la de flux, conté la seqüència complementària a l'altre oligonucleòtid present en la cel·la de flux, de manera que es crea un pont. En aquest punt, es torna a fer amplificació en pont, s'elimina la cadena que ha servit de motlle per a seqüenciar la cadena *forward* i utilitzant uns encebadors universals es procedeix a la seqüenciació de la cadena reversa d'igual forma que s'havia fet amb la cadena *forward*.

4.2.9.5. Anàlisi de dades

Un cop finalitzat el procés de seqüenciació comença l'anàlisi dels resultats. Primer de tot, totes les dades crues obtingudes passen uns processos de control de qualitat que filtren lectures no vàlides, on entre altres criteris, es consideren com a lectures vàlides aquelles en que s'ha seqüenciat la cadena *forward* i reversa. Posteriorment, gràcies a la seqüenciació dels índexs presents en cada fragment d'ADN i per tant en cada clúster, s'identifica cada seqüència amb cada mostra i l'alineament de les seqüències obtingudes amb la seqüència de referència permet fer la crida de variants i identificar canvis de nucleòtids de la mostra respecte a la seqüència de referència. La seqüència de referència de l'ADNmt per a mostres humanes va ser NC_012920.1, mentre que per a mostres de ratolí va ser NC_005089.1.

L'anàlisi de les dades de la seqüenciació de l'ADNn es va fer amb la plataforma *GeneGlobe* (*Qiagen*) que va permetre identificar les variants en els gens seqüenciats respecte a la seqüència de referència GCA_000001405.1 (hg19).

4.2.10. Determinació de nucleòsids i dels seus catabòlits per HPLC-MS/MS

Els nucleòsids i alguns dels seus productes de degradació van ser quantificats per cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a detecció per espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS). Aquesta anàlisi es va aplicar a medis de cultiu cel·lular, plasma i homogenats de teixits de ratolins utilitzant l'equip *Acquity UPLC – Xevo TQ Mass Spectrometer* (*Waters*).

En la HPLC-MS/MS es fa una separació dels analits de la mostra per cromatografia i la seva identificació i quantificació posterior per espectrometria de masses. La cromatografia consisteix en l'aplicació d'una alta pressió per moure a través del sistema un líquid (fase mòbil) que recull la mostra a analitzar i la passa per una columna (fase estacionària) que conté un material adsorbent per a la mostra. Cada component de la mostra interacciona de manera diferencial entre les fases mòbil i estacionària en funció de la seva afinitat amb elles: els compostos de la mostra que tenen més afinitat per la columna es queden retinguts més temps i s'elueixen més tard, mentre que els compostos que tenen menys afinitat per la columna i més afinitat per la fase mòbil interaccionen poc amb la columna i s'elueixen abans. El temps en el qual els compostos són eluïts és el temps de retenció.

Posteriorment, els productes eluïts en la cromatografia passen a l'espectròmetre de masses, que en aquest cas es tracta d'un espectròmetre amb triple quadrupol. En l'espectrometria de masses en tàndem primer s'ionitzen les molècules amb *electrospray* (*Electrospray Ionisation*, ESI) cap a ions positius o negatius aplicant un voltatge en el con. Després, el primer quadrupol identifica i separa les molècules ionitzades en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z). Posteriorment, les molècules ionitzades són fragmentades en el segon quadrupol amb una determinada energia de col·lisió obtenint-se fragments més petits (anomenades filles) a partir de la molècula original (anomenada mare). Això introdueix el concepte de transició que és el canvi de massa que hi ha de la molècula mare quan es

fragmenta en les molècules filles. Les molècules filles d'interès són també separades en funció de la seva relació massa/càrrega i detectades en el tercer quadrupol de l'espectròmetre (Figura 4.14).

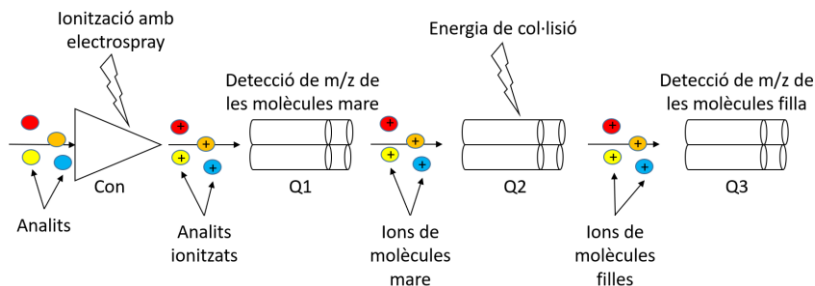


Figura 4.14. Esquema del funcionament de l'espectròmetre de triple quadrupol. En el primer quadrupol (Q1) es detecta la relació m/z de les molècules mare, en el segon quadrupol (Q2) es fragmenten les molècules mare en molècules filles i en el tercer quadrupol (Q3) es detecta la relació m/z de les molècules filles.

El resultat que reporta l'aparell és un cromatograma on es veuen, en el seu temps de retenció, tots els pics que corresponen amb les transicions dels compostos que es volen identificar. Mitjançant el *software TargetLynx (Waters)* es van integrar els pics per obtenir la seva àrea que es correspon amb la quantitat d'aquell compost en la mostra. Per tal de poder quantificar de forma absoluta els compostos de les mostres es va fer servir un multi-estàndard amb concentracions conegudes (en aquest cas de 0,05 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM) dels diferents compostos que es volien analitzar. D'aquesta forma, integrant els pics dels estàndards s'obté una corba estàndard que permet interpolar les àrees dels pics de les mostres i calcular la quantitat de l'analit que hi ha en la mostra.

Durant el processament de les corbes estàndard i de les mostres es va afegir un estàndard intern (SI) que consisteix en dThd amb isòtops de carboni i nitrogen pesants i estables ($^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_2\text{-dThd}$) (*Cambridge Isotope Laboratories*) a una concentració final en la mostra de 1 μM . Com que l'estàndard intern és dThd (encara que amb composició isotòpica diferent a la forma més abundant en la natura), es comporta químicament igual que la dThd de composició isotòpica normal de la mostra en la separació cromatogràfica. Per tant, totes dues tenen el mateix temps de retenció. D'altra banda, com el estàndard intern té una composició isotòpica diferent, la seva relació m/z és diferent de la dThd de la mostra i es poden distingir per la transició. L'estàndard intern s'afegeix amb la mateixa concentració en

totes les mostres a l'inici del processament d'aquestes de manera que permet corregir si hi ha hagut alguna interferència com pot ser el rendiment d'extracció dels analits en el processament de la mostra, variacions en el volum de mostra injectat en l'aparell, variacions en l'eficiència de ionització, fragmentació i detecció de l'analit per MS/MS que poden ser degudes a causes internes de l'aparell o a possibles interferents en la matriu de la mostra.

4.2.10.1. Processament de mostres de medi de cultiu

Es va partir de 1 mL de medi de cultiu i se li va afegir l'estàndard intern. Posteriorment, es van eliminar les proteïnes presents en la mostra per ultrafiltració utilitzant filtres amb porus per molècules de 10 kDa (*Amicon Ultra Filters, Millipore*). En aquest procés, primer s'equilibrava el filtre posant-li aigua i centrifugant $14.000 \times g$ 5 minuts, després s'eliminaven les restes d'aigua donant la volta al filtre i centrifugant a $1.000 \times g$ durant 1 minut. A continuació, es posava la mostra al filtre i es centrifugava a $14.000 \times g$ 30 minuts a 4°C . Finalment, es congelaven les mostres eluïdes a -20°C fins a ser analitzades per HPLC-MS/MS.

4.2.10.2. Processament de mostres de plasma

Es va partir de plasma de ratolí (Secció 4.2.2.3) al qual es mesurava el seu volum i es feia una dilució amb PBS fred si es tenia poc volum per ser injectat en la cromatografia. Posteriorment, es va afegir l'estàndard intern i es van eliminar les proteïnes de la mostra per ultrafiltració de la mateixa manera que es va fer en mostres de medi de cultiu (Secció 4.2.10.1). Finalment, es congelaven les mostres a -20°C fins a ser analitzades per HPLC-MS/MS.

4.2.10.3. Processament de mostres d'òrgans

Es va partir de fetge, múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) o cervell prèviament polvoritzats amb un morter en presència de nitrogen líquid (Secció 4.2.2.3). Posteriorment, es van agafar dues culleradetes (aproximadament uns 100 mg) de teixit polvoritzat, se'ls va afegir 500 μL de tampó de lisi (Taula 4.18) i es va homogeneïtzar amb un homogenitzador d'èmbol motoritzat adaptat a tubs d'1,5 mL (*pellet pestle*). Aquests homogenats crus es van centrifugar a $20.000 \times g$ durant 30 minuts a 4°C per precipitar les restes no disgregades de teixit i es va recuperar el sobrenedant. Posteriorment, es va agafar una alíquota de sobrenedant i es va fer una dilució 1/20 per mesurar la concentració de proteïna (Secció

4.2.5) i la resta de l'homogenat va ser desproteïnit per ultrafiltració de la mateixa manera que es va fer per la determinació de dNs en medi de cultiu (Secció 4.2.10.1). Finalment, es congelaven les mostres a -20°C fins a ser analitzades per HPLC-MS/MS.

Taula 4.18. Composició del tampó de lisi per al processament de mostres d'òrgans de ratolins. El tampó de lisi conté detergent (Tritó X-100), un agent reductor (2-mercaptoetanol), un inhibidor de proteases (fluorur de fenilmetilsulfonil, PMSF) i un inhibidor de la degradació de la dCtd per l'enzim CDA (tetrahidrouridina, THU), un inhibidor de la degradació de la dThd per l'enzim TP (6-amino-5-bromouracil), inhibidors de la degradació de la dAdo per l'enzim ADA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina, EHNA) i inhibidors de la degradació de la dGuo per l'enzim PNP (immucilina H) a més de l'estàndard intern (SI).

Reactiu	Concentració en la solució
Tritó X-100	1% (v/v)
2-mercaptoetanol	0,02% (v/v)
Tris HCl pH 7,2	50 mM
Fluorur de penilmetilsulfonil (PMSF)	2 mM
¹³ C ₁₀ ¹⁵ N ₂ -dThd (SI)	1 µM
THU	100 µM
6-amino-5-bromouracil	100 µM
EHNA	5 µM
Immucilina H	0,5 µM

4.2.10.4. Injecció de les mostres per l'anàlisi mitjançant HPLC-MS/MS

Totes les mostres i estàndards es van carregar en un vial de 1 mL (*Waters*) per a poder ser injectats en el sistema HPLC-MS/MS en l'equip *Acquity UPLC – Xevo TQ Mass Spectrometer* (*Waters*). Per a totes les determinacions de dNs i els seus metabòlits es van injectar 7,5 µL de mostra en una columna (*Acquity UPLC BEH C18* (100 x 2,1 mm, 130 Å de mida de porus, 1,7 µm de mida de partícula, *Waters*) que es va sotmetre a una elució amb una fase mòbil en gradient, constituïda per un solvent aquós A (acetat amònic 20 mM pH 5,6), amb el següent patró d'elució durant 7,2 minuts:

- Flux constant 0,5 mL/min, columna mantinguda a 50°C.
- De 0 a 1,1 minuts: Fase isocràtica 100% de solvent A.
- De 1,1 a 5 minuts: Solvent A modificat en gradient lineal des del 0% al 13,6% d'acetonitril.
- De 5 a 5,1 minuts: Transició a 100% d'acetonitril.

- De 5,1 a 6,1 minuts: 100% d'acetonitril per al rentat de compostos hidrofòbics retinguts en la columna.
- De 6,1 a 7,2 minuts: Fase isocràtica 100% de solvent A per a reequilibrar la columna per a la injecció de la següent mostra.

L'elut procedent de la columna cromatogràfica es va dirigir cap a l'espectròmetre de masses que mitjançant *electrospray* i aplicant un determinat voltatge en el con va ionitzar les molècules i analitzar per espectrometria de masses la seva relació massa/càrrega. Posteriorment, aplicant una energia de col·lisió es van fragmentar les molècules i es va identificar la massa de la molècula mare i de les filles (transició) (Taula 4.19).

Taula 4.19. Condicions per la identificació i quantificació dels compostos analitzats per HPLC-MS/MS. La taula inclou el temps de retenció (en minuts) en la cromatografia, transició de masses (en daltons) amb el tipus d'electrospray (ESI) positiu o negatiu i voltatge de con aplicats per a la ionització i energia de col·lisió (electronvolts) aplicada per a la fragmentació dels compostos analitzats. Els temps de retenció són aproximats i poden variar lleument entre sèries analítiques o entre el tipus de teixit analitzat.

Compost	Temps de retenció (min)	Transició (Da)	ESI	Voltatge de con (V)	Energia de col·lisió (eV)
Citosina	0,65	111,80 > 95,00	+	36	22
Uracil	0,74	112,70 > 43,07	+	28	18
Guanina	0,90	151,70 > 110,08	+	34	22
Ctd	0,93	243,80 > 112,06	+	12	10
Hipoxantina	0,93	136,75 > 110,11	+	32	18
Xantina	1,00	150,62 > 42,03	-	30	18
Urd	1,23	244,80 > 113,02	+	12	10
dCtd	1,28	227,90 > 112,07	+	30	10
Xantosina	1,54	284,86 > 153,08	+	30	12
Adenina	1,56	135,80 > 94,02	+	32	18
Thy	1,64	126,69 > 110,00	+	26	20
dUrd	1,77	228,80 > 113,08	+	8	12
Guo	2,10	283,85 > 152,02	+	14	18
Inosina	2,10	268,79 > 137,08	+	12	12
dIno	2,64	252,86 > 137,08	+	10	8
dGuo	2,69	267,91 > 152,08	+	12	12
dThd	2,92	242,80 > 127,08	+	10	12
¹³ C ₁₀ ¹⁵ N ₂ -dThd (SI)	2,92	255,01 > 133,82	+	10	12
Ado	3,00	267,80 > 136,09	+	22	16
dAdo	3,20	251,80 > 136,09	+	10	14

4.2.11. Determinació de dNTPs en extractes enriquits en mitocondris

4.2.11.1. Obtenció de mitocondris aïllats d'òrgans

Per a l'obtenció d'una fracció enriquida en mitocondris de fetge i cervell de ratolins es va seguir el següent protocol:

1. Obtenir el fetge i cervell dels ratolins i posar-los en 20 mL de tampó A (fetge) (Taula 4.20) o tampó AT (cervell) (Taula 4.20).
2. Tallar el teixit en trossos petits amb l'ajuda d'unes estisores, eliminar el tampó i afegir tampó A nou al fetge i tampó AT al cervell per rentar els trossos de teixit i tornar a eliminar-lo.
3. Afegir 5 mL de tampó A (fetge) o AT (cervell).
4. Homogeneïtzar el teixit en 5 mL de tampó amb l'ajuda d'un homogeneïtzador Dounce de vidre fent 15 embolades (o fins que no es veuen fragments de teixit) i passar l'homogenat a un tub nou.
5. Rentar l'homogeneïtzador amb 2 mL de tampó A (fetge) o AT (cervell) i ajuntar aquest volum amb el del pas anterior.
6. Centrifugar el teixit homogenat a $1.000 \times g$ durant 10 minuts a 4°C per precipitar nuclis i restes no disgregades.
7. Recollir el sobrenedant en un tub nou.
8. En el cas del cervell, resuspendre el *pellet* en 5 mL de tampó AT, tornar a homogeneïtzar 15 vegades amb el homogenitzador Dounce i passar l'homogenat a un tub nou.
9. En el cas del cervell, rentar amb 2 mL de tampó AT les restes de l'homogeneïtzador.
10. En el cas del cervell, centrifugar a $1.000 \times g$ durant 10 minuts a 4°C .
11. Ajuntar el sobrenedant de les dues centrifugacions en el cas del cervell i centrifugar aquest i el sobrenedant del fetge obtingut en el pas 7 a $9.000 \times g$ durant 10 minuts a 4°C per precipitar la fracció rica en mitocondris.
12. Resuspendre el *pellet* que conté els mitocondris en 8 mL de tampó A (fetge) o 4 mL de tampó AT (cervell).
13. Centrifugar a $13.000 \times g$ durant 3 minuts a 4°C .
14. Resuspendre i combinar els *pellets* que contenen els mitocondris en 4 mL de tampó A (fetge) o 2 mL de tampó AT (cervell).

15. Centrifugar a 13.000 x *g* durant 3 minuts a 4°C.
 16. Resuspendre i combinar els *pellets* que contenen els mitocondris en 2 mL de tampó A (fetge).
 17. Centrifugar a 13.000 x *g* durant 3 minuts a 4°C.
 18. Resuspendre i combinar els *pellets* de fetge del pas 17 i cervell del pas 15 en 1 mL de tampó (A per al fetge i AT per al cervell).
 19. Centrifugar a 13.000 x *g* durant 2 minuts a 4°C.
 20. Resuspendre els *pellets* de fetge i cervell en 1 mL (fetge) o 0,5 mL (cervell) de tampó MAITE (Taula 4.20).
 21. Agafar una alíquota i diluir-la 1/20 en tampó MAITE per a mesurar proteïna (Secció 4.2.5).
- La resta de suspensió mitocondrial es deixa a 4°C en un rotor durant la mesura de proteïna, ja que s'utilitzen mitocondris frescs per extreure els dNTPs.

Taula 4.20. Composició dels tampons utilitzats en el procés d'enriquiment de mitocondris.

	Reactiu	Concentració
Tampó A	Tris pH 7,4	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sacarosa	320 mM
Tampó AT	Tris pH 7,4	10 mM
	EGTA	1 mM
	Sacarosa	75 mM
	Sorbitol	225 mM
	BSA lliure d'àcids grassos	0,1% (p/v)
Tampó MAITE	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	EDTA	0,05 mM
	Sacarosa	25 mM
	Sorbitol	75 mM
	KCl	100 mM
	H ₃ PO ₄	10 mM
	MgCl ₂	5 mM

4.2.11.2. Extracció de dNTPs amb desproteïnització àcida amb àcid tricloroacètic

Aquest mètode serveix per a extreure els 4 dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). La precipitació àcida permet extreure el total de dGTP contingut al mitocondri (lliure i unit a proteïna)³²⁴.

Els passos que es van seguir van ser:

1. Preparar alíquotes de la suspensió mitocondrial (Pas 21, Secció 4.2.11.1) que continguin 1.000 µg de proteïna cadascuna.
2. Precipitar els mitocondris centrifugant a 13.000 x *g* durant 3 minuts a 4°C.
3. Eliminat el sobrenedant, tractar el *pellet* amb 300 µL d'àcid tricloroacètic (TCA) 0,5 M i fer vòrtex durant 15 segons.
4. Precipitar la proteïna centrifugant a 20.000 x *g* durant 5 minuts a 4°C.
5. Recuperar el sobrenedant i neutralitzar el pH àcid amb 1,5 volums (450 µL) de tri-n-octilamina (TOA) 0,5 M dissolta en freó (1,1,2-triclorotrifluoroetà).
6. Fer vòrtex durant 30 segons perquè es neutralitzi bé el pH.
7. Centrifugar a 10.000 x *g* durant 10 minuts a 4°C i recollir 150 µL (la meitat del volum) de la fase aquosa que conté els dNTPs.
8. Assecar el sobrenedant obtingut en el pas anterior a l'aparell *SpeedVac (FisherScientific)*, que utilitza el buit per assecar les mostres.
9. Guardar les mostres assecades a -80°C fins que es mesurin les quantitats dels dNTPs.

4.2.11.3. Extracció de dNTPs amb desproteïnització orgànica amb metanol

Aquests mètode d'extracció es va utilitzar per determinar el dGTP lliure, que és una petita proporció del dGTP total, ja que la majoria del dGTP està unit a proteïna. Treballs duts a terme en els nostre laboratori van mostrar que amb l'extracció àcida es recupera el dGTP total (lliure + unit a proteïna), mentre que amb l'extracció amb metanol només es recupera el dGTP lliure³²⁴. Els passos dels protocol van ser:

1. Preparar alíquotes de la suspensió mitocondrial (Pas 21, Secció 4.2.11.1) que continguin 1.000 µg de proteïna cadascuna.
2. Precipitar els mitocondris centrifugant a 13.000 x *g* durant 3 minuts a 4°C.
3. Eliminar el sobrenedant, tractar el *pellet* amb 300 µL de metanol al 60% fred i fer vòrtex.
4. Incubar 2 hores a -20°C.

5. Precipitar la proteïna centrifugant a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
6. Recuperar el sobrenedant i afegir 60 µL de TCA 3 M (concentració final de 0,5 M).
7. Centrifugar a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
8. A partir d'aquí es van repetir els passos 5 a 9 del protocol de desproteïnitació àcida (Secció 4.2.11.2).

4.2.11.4. Determinació enzimàtica de dNTPs

La determinació de dNTPs es basa en l'extensió a partir d'un encebador comú per a la determinació dels 4 dNTPs conjugat amb biotina i un oligonucleòtid específic per a determinar cada dNTP per separat gràcies a l'acció d'una polimerasa que incorpora nucleòtids endògens de la mostra i nucleòtids marcats amb radioactivitat. Mesurant la radioactivitat incorporada es pot saber la concentració dels dNTPs en la mostra³²⁵ (Figura 4.15).

4.2.11.4.1. Preparació de les mostres i estàndards

Els extractes assecats que havien estat obtinguts prèviament (Secció 4.2.11.2 i Secció 4.2.11.3) es van redissoldre en 75 µL de Tris-HCl 40 mM pH 7,4, excepte les mostres destinades a la determinació del dGTP lliure, que es van redissoldre en 25 µL, per a tenir el contingut de dGTP lliure més concentrat i poder-lo detectar, ja que el contingut d'aquest és molt baix. A més, cada mostra es diluïa 1/3 per detectar possibles interferències en la reacció de determinació de dNTPs. Cada mostra i les seves dilucions s'analitzaven per duplicat.

Per tal de poder quantificar les concentracions de dNTPs en les mostres es van preparar estàndards. Els estàndards contenien una mescla dels 4 dNTPs en Tris-HCl 40 mM pH 7,4 a concentracions 400, 200, 100, 20, 10, i 5 nM en el cas del dATP, dGTP i dCTP o 100, 70, 35, 20, 10 i 5 nM en el cas del dTTP. Cada estàndard es va analitzar per triplicat. Com a blanc (estàndard zero) es va utilitzar el mateix Tris 40 mM pH 7,4 emprat per redissoldre els *pellets* assecats de les mostres a analitzar.

4.2.11.4.2. Anellament dels oligonucleòtids i immobilització en la placa

Cada oligonucleòtid per a la determinació de cada un dels 4 nucleòtids s'anella en el seu extrem 3' amb l'encebador comú conjugat amb biotina al seu extrem 5'. Per fer-ho, es posen quantitats equimolars d'oligonucleòtid (100 µM) i encebador (100 µM) (Taula 4.21) i

s'incuben en un bany amb l'aigua inicialment a 70°C que es deixa refredar gradualment fins que arribi a temperatura ambient. D'aquesta manera, la concentració final d'oligonucleòtid anellada amb l'encebador és de 50 µM.

Posteriorment, es posen 25 µL de l'oligonucleòtid anellat amb l'encebador a una concentració final de 0,25 µM (diluït amb PBS 0,1% Tween-20) en cada pou d'una placa de 96 pous recoberts amb una capa d'estreptavidina (*Pierce™ Streptavidin Coated High Capacity Plates, ThermoFisher Scientific*). Es tapa la placa amb una pel·lícula de plàstic i es fa una centrifugació breu per a que el volum es reparteixi per tot el pou. A continuació, s'incuba la placa a 37°C amb una agitació de 180 rpm durant 90 minuts per a que l'oligonucleòtid unit a l'encebador que conté la biotina s'uneixi a l'estreptavidina de la placa. D'aquesta manera, el híbrid d'oligonucleòtid – encebador queda immobilitzat en la placa (Figura 4.15).

Després de la immobilització es fan 5 rentats de la placa amb tampó TENT (Tris-HCl 40 mM pH 8,4; EDTA 1 mM; NaCl 50 mM; Tween-20 0,1%) per eliminar l'oligonucleòtid sense unir a la placa, deixant el pou sec.

Taula 4.21. Seqüències dels encebadors utilitzats per a la determinació de dNTPs. La taula inclou la seqüència de l'encebador comú per a la determinació dels 4 dNTPs i la seqüència dels 4 oligonucleòtids específics per a la determinació de cada un dels 4 dNTPs. El nom del oligonucleòtid (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) indica el nucleòtid que permet determinar.

Encebador comú/ oligonucleòtid	Seqüència	Marca radioactiva
Encebador comú	3' – CCGCCACCTCCGCC – 5' – (Biotina)	
dATP	5' – AAATAAATAAATAAATAATGGCGGTGGAGGCGG – 3'	³ H-dTTP
dTTP	5' – TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG – 3'	³ H-dATP
dGTP	5' – TTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCGCGGTGGAGGCGG – 3'	³ H-dATP
dCTP	5' – TTTGTTTGTGTTGTTGTTGGGCGGTGGAGGCGG – 3'	³ H-dATP

4.2.11.4.3. Reacció d'extensió

Primer de tot es preparen els nucleòtids radioactius marcats amb triti (³H-dATP per determinar dTTP, dGTP i dCTP i ³H-dTTP per determinar dATP). Els nucleòtids radioactius estan en solvent aigua – etanol al 50% i aquest solvent orgànic interfereix en la reacció d'extensió de la polimerasa en la qual es basa la determinació de dNTPs. Per aquest motiu, s'agafa el volum de nucleòtid radioactiu que cal segons el nombre de mostres a determinar,

s'evapora en l'aparell *SpeedVac (FisherScientific)*, i posteriorment es redisol el residu sòlid en aigua per a que quedi a concentració de 15 μM .

Un cop es tenen els nucleòtids radioactius en aigua es prepara una mescla de reacció (Taula 4.22) que conté, entre d'altres, la polimerasa que catalitza l'extensió a partir de l'encebador immobilitzat a la placa i ^3H -dATP (quan es determinen dTTP, dGTP i dCTP) o ^3H -dTTP (quan es determina dATP). Es posen 18,75 μL de mescla de reacció a cada pou de la placa que conté el híbrid de l'oligonucleòtid – encebador immobilitzat (Secció 4.2.11.4.2) i a continuació es posen 6,25 μL de mostra, tot aquest procés en fred (sobre gel). Finalment, es tapa la placa amb una pel·lícula de plàstic, es centrifuga breument perquè el volum quedi homogeni a cada pou i s'incuba a 55°C durant 1 hora per a fer la reacció d'extensió o *primer extension* (Figura 4.15).

Taula 4.22. Mescla de reacció per a la determinació enzimàtica de dNTPs.

Reactiu (concentració inicial)	Volum per 1 reacció	Concentració en la reacció
Tampó Klenow (Tris 1 M pH 7,4)	0,75 μL	40 mM
MgCl_2 (0,1 M)	2,5 μL	10 mM
DTT (0,5 M)	0,25 μL	5 mM
H_2O	14,03 μL	-
^3H -dATP o ^3H -dTTP (15 μM)	1,2 μL	0,75 μM
ADN polimerasa Termoseqüenasa™ (<i>Cytiva</i>)	0,02 μL	0,025 U/ μL
Mostra	6,25 μL	-
Volum final: 25 μL		

En el procés d'extensió dels oligonucleòtids, gràcies a la polimerasa i a l'encebador i d'acord amb la seqüència de l'oligonucleòtid (Taula 4.21), s'incorpora un nucleòtid de guanina o citosina endògen de la mostra per cada 3 adenines radioactives, un nucleòtid de timina de la mostra per cada 2 adenines radioactives i un nucleòtid d'adenina de la mostra per cada 3 nucleòtids de timina radioactius (Figura 4.15).

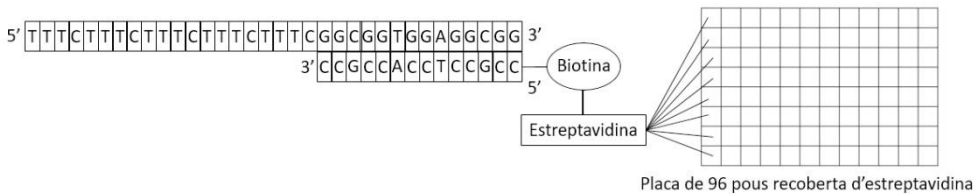
Després de la reacció enzimàtica d'extensió, es renta la placa 5 vegades amb tampó TENT i s'eliminen les restes de líquid per decantació. Posteriorment, s'afegeixen 250 μL de líquid de centelleig *UltimaGold (Perkin Elmer)* a cada pou i es llegeix la radioactivitat en el comptador de centelleig *MicroBeta 2 (Perkin Elmer)* que dona valors de cpm per a cada pou de la placa

i s'obté la concentració de cada dNTP de les mostres interpolant els seus cpms amb la corba obtinguda amb els estàndards amb concentració coneguda. Finalment, es corregeixen els valors per la seva dilució i els resultats s'expressen en pmols de dNTP per mg de proteïna.

- Pas 1: Anellament de l'oligonucleòtid específic per a la detecció d'un dNTP amb l'encebador comú unit a biotina



- Pas 2: Immobilització de l'híbrid oligonucleòtid – encebador biotinilat a la placa d'estreptavidina



- Pas 3: Reacció d'extensió de l'encebador incorporant dNTPs de la mostra i dNTPs marcats

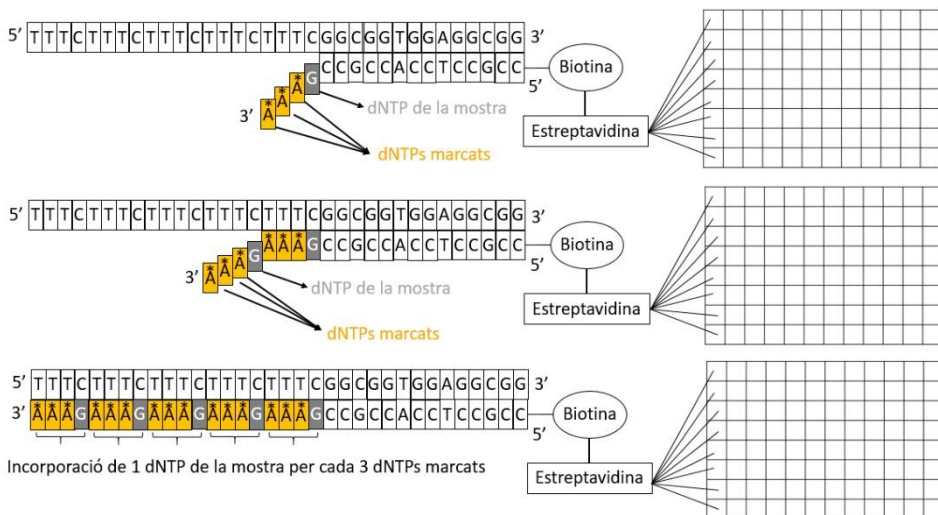


Figura 4.15. Esquema de la determinació enzimàtica de dNTPs. L'esquema recull la determinació del dGTP. La determinació dels altres 3 dNTPs seria igual, canviant la seqüència de l'oligonucleòtid específic del dNTP a determinar i el nombre de ^3H -dATPs que s'incorporen en la reacció d'extensió de l'oligonucleòtid que serien 3 per a la determinació del dCTP i 2 per a la determinació del dTTP. La determinació del dATP es fa amb la incorporació de tres ^3H -dTTPs per cada dATP de la mostra.

4.2.11.4.4. Controls de qualitat i de precisió del mètode

Cada cop que es carregava una placa on es determinaven dNTPs s'incloïa una mostra de fetge de ratolí amb valors coneguts de dNTPs per validar els resultats de les mostres problema que es mesuraven. Aquesta mostra control va ser obtinguda fent l'extracció de fetges de diversos ratolins (Secció 4.2.11.2) i es va distribuir en alíquotes per poder ser utilitzat cada cop que es mesuraven dNTPs. La variabilitat dels resultats d'aquest control al llarg de les determinacions que s'han fet en aquesta tesi va permetre determinar la precisió interserial del mètode, que va tenir un coeficient de variació d'entre el 26% i el 45%, depenent del nucleòtid que es mesurava (Taula 4.23) (Figura Suplementària 3).

Taula 4.23. Controls de mètode de la determinació de dNTPs. La taula inclou la mitjana, desviació estàndard, nombre de mostres analitzades (n) i coeficient de variació de la quantitat de cada dNTP (nmols/mg proteïna) en el control que es va utilitzar per validar els resultats de determinació de dNTPs.

dNTP	Mitjana (nmol/mg proteïna)	Desviació estàndard	Coeficient de variació (%)	n
dATP	0,83	0,38	45%	6
dGTP	28,1	7,46	26%	7
dTTP	0,83	0,36	44%	7
dCTP	3,83	1,74	45%	7

4.2.12. Anàlisis estadístiques

Totes les anàlisis estadístiques s'han fet amb el programa *GraphPad Prism 9* (*GraphPad software*). Els tests estadístics que s'han fet servir en cada cas estan indicats en la gràfica corresponent. Donat que les n van resultar baixes en la majoria dels experiments i no es podia assegurar una distribució normal dels resultats es va optar, com a norma general, per utilitzar tests no paramètrics, amb algunes excepcions indicades quan s'escau.

Com que en molts casos es van fer comparacions planejades on es coneixia amb antelació quines preguntes volien ser respostes i es volia testar una sola hipòtesi per cada test es va utilitzar el test de Mann-Whitney³²⁶. A més, en els casos on s'estudiava la seguretat gènica del tractament amb dNs es va fer el test de comparacions simples sense correccions per comparacions múltiples. Les correccions per comparacions múltiples són molt restrictives de cara a donar com a significatives diferències entre grups, la qual cosa afavoriria la nostra hipòtesi (manca de genotoxicitat del tractament) en forma de falsos negatius. Per tant, vam

ometre aquesta restricció, per posar a prova la nostra hipòtesi amb uns tests més laxos que afavorissin la detecció de falsos positius.

En aquells experiments on hi havia dades aparellades es va realitzar el test de Wilcoxon. En els casos en que totes les comparacions eren importants i es volia veure si hi havia algun grup diferent de la resta es va optar per fer un test de comparacions múltiples (Kruskal-Wallis)³²⁷. En aquells casos que aquest test era significatiu es va portar a terme el test de comparacions múltiples de Dunn. Per a les anàlisis estadístiques, els valors indetectables es van considerar zero.

5. RESULTATS

5.1. Eficàcia del tractament amb dNs

5.1.1. Eficàcia del tractament amb dNs en models *in vitro*

5.1.1.1. Determinació de les concentracions de dNs en medi de cultiu

Tal i com s'indica en l'apartat de material i mètodes (Secció 4.1.1.3), en tots els tractaments que inclouen addició de dAdo al medi de cultiu, aquesta es va suplementar amb EHNA 5 μ M (inhibidor de l'adenosina desaminasa), per a prevenir la ràpida degradació d'aquest nucleòsid⁸⁵. Per tal d'evitar informació redundat, l'addició d'aquest compost no s'indicarà de manera explícita a partir d'aquest moment.

Amb l'objectiu d'assegurar que el medi de quiescència no contenia dNs que podrien interferir amb les concentracions que es suplementaven com a tractament i que el medi de quiescència amb el tractament (50 μ M cada dN) contenia els 4 dNs i no es degradaven es van analitzar les concentracions dels 4 dNs i dels seus primers productes de degradació en l'estoc de medi de quiescència i en l'estoc de medi de quiescència suplementat amb els 4 dNs a concentració final de 50 μ M (Taula 5.1) (per veure els intermediaris en la degradació de dNs, consultar la Figura 2.4). El medi de quiescència, en tenir només el medi *DMEM High Glucose* suplementat amb 0,1% de FBS dialitzat, no contenia concentracions detectables de dNs. Per contra, en el medi de quiescència suplementat amb el tractament es van poder detectar els 4 dNs a una concentració propera als 50 μ M (Taula 5.1). A més, quan es van analitzar els productes de degradació dels dNs no es va detectar cap d'ells (Taula 5.1), excepte la hipoxantina, que estava present el medi de quiescència amb i sense tractament, la qual cosa suggereix que aquest compost està present en el FBS dialitzat, ja que la composició del medi *DMEM High Glucose* no especifica que contingui aquest compost. Aquests resultats confirmen que l'estoc de medi utilitzat en la condició de no tractament no conté dNs i que l'estoc de medi utilitzat en la condició de tractament conté els 4 dNs.

Posteriorment, es va analitzar la concentració dels 4 dNs i els seus primers productes de degradació en el medi de quiescència i en el medi de quiescència suplementat amb el tractament que havia estat incubat durant 4 dies en absència de cèl·lules, ja que 4 dies és el màxim de temps que les cèl·lules dels experiments d'eficàcia i seguretat gènica havien estat incubades amb el mateix medi. En aquestes condicions, de nou, no es van poder detectar

dNs en el medi de quiescència però sí que es van poder detectar en el medi suplementat amb els 4 dNs (Taula 5.1). Les concentracions dels dNs en el medi suplementat amb el tractament i incubat durant 4 dies sense cèl·lules van ser superiors que en l'estoc de medi, possiblement per l'evaporació parcial de l'aigua del medi en l'incubador. Donat que aquests medis no havien estat incubats amb cèl·lules no hi havia cap activitat enzimàtica que pogués degradar els dNs i no es van detectar productes de la seva degradació, excepte la hipoxantina, tal com s'havia vist en l'estoc de medi i la dIno, que es va detectar només en el medi de quiescència addicionat amb el tractament, encara que a una concentració baixa.

Finalment, com que en els experiments d'eficàcia i seguretat del tractament amb dNs en els models *in vivo* es canviava el medi com a màxim cada 4 dies, es va determinar la concentració dels 4 dNs i els seus primers productes de degradació en medi de quiescència i en medi de quiescència addicionat amb els 4 dNs que havia estat incubat durant 4 dies amb fibroblasts de controls sans i amb fibroblasts d'un pacient amb dèficit de TK2 (Taula 5.1). De la mateixa forma que s'havia vist anteriorment, el medi de quiescència incubat amb les cèl·lules no contenia dNs mentre que el medi que havia estat suplementat amb el tractament tenia concentracions detectables de dNs en les 3 línies cel·lulars en les que es va testar. En aquest cas, a diferència que quan es va incubar el medi 4 dies sense cèl·lules, es va veure un descens desigual en la concentració dels 4 dNs respecte a la del medi estoc degut al consum dels dNs per part de les cèl·lules. El descens en la concentració de dAdo, dGuo, dCtd i dThd respecte al medi estoc amb tractament va ser d'un 20%, 44%, 56% i 55%, respectivament en les cèl·lules de controls sans, mentre que la reducció en la concentració de dAdo, dGuo, dCtd i dThd respecte al medi estoc amb tractament va ser d'un 16%, 37%, 28% i 57%, respectivament, en cèl·lules amb dèficit de TK2. El descens de la concentració de dAdo va ser inferior en comparació amb la resta de dNs en totes les línies cel·lulars, segurament degut a que l'EHNA inhibeix la seva degradació. En consonància amb la baixada de la concentració de dNs es va apreciar un augment en la concentració dels productes de degradació (dIno, hipoxantina, xantina, dUrd, Thy i guanina) en els medis que van ser incubats amb cèl·lules. Això indica que els dNs addicionats al medi de cultiu són utilitzats i metabolitzats per les cèl·lules i després de 4 dies les concentracions dels dNs encara són suficientment altes com per a que puguin ser utilitzades per les cèl·lules.

Taula 5.1. Concentracions dels 4 dNs i dels seus primers productes de degradació en els medis de cultiu. Concentracions (μM) en els estocs de medi de cultiu i en els medis de cultiu incubats durant 4 dies en absència (No) i presència de diferents línies de fibroblasts (C6, C9, P12) i en absència (No) o presència (Sí) de dNs. Els valors són la mitjana dels valors de dues rèpliques del medi incubat en les mateixes condicions, amb dues determinacions del mateix medi per HPLC-MS/MS. Els valors Ind. indiquen concentracions que estan per sota del límit de detecció de la tècnica ($0,05 \mu\text{M}$). L'adenina va ser indetectable en totes les condicions estudiades i no s'ha inclòs a la taula. El tractament amb dNs ($50 \mu\text{M}$ de cadascun) sempre es va suplementar amb EHNA a una concentració final de $5 \mu\text{M}$ per tal de preservar la dAdo en el medi.

Condicció		dNs					Producte de degradació dels dNs					
Medi	Cèl·lules?	dNs?	dAdo	dGuo	dCtd	dThd	dIno	Hipoxantina	Xantina	dUrd	Thy	Guanina
Estoc de medi de quiescència	No	No	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	0,5	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.
	No	Sí	39,4	38,7	68,0	45,9	Ind.	1,5	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.
Medi de quiescència incubat 4 dies a 37°C	No	No	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	1,0	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.
	No	Sí	50,0	47,0	85,4	54,7	0,4	1,7	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.
Medi de quiescència incubat 4 dies a 37°C	C6	No	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	1,6	0,1	0,1	Ind.	0,2
	C6	Sí	33,6	17,9	32,0	17,2	8,2	5,6	3,4	22,9	30,4	18,5
	C9	No	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	1,9	Ind.	0,1	Ind.	0,2
	C9	Sí	29,8	25,7	27,7	23,7	19,6	8,9	0,9	30,4	26,4	18,4
	P12	No	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	2,3	Ind.	Ind.	Ind.	0,5
	P12	Sí	33,1	24,6	48,8	19,9	11,1	7,1	0,6	13,0	31,6	17,1

5.1.1.2. Model de depleció induïda de l'ADNmt amb BrEt

El model d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt es va fer per a totes les línies cel·lulars, excepte per a les línies amb mutacions en *DGUOK*, ja que es tenien dades prèvies sobre la presència de depleció espontània en aquestes línies⁸⁵. Per a la resta de línies es va fer en paral·lel l'experiment d'inducció de depleció amb BrEt i també es va estudiar si mostraven depleció espontània incubant les cèl·lules 10 dies sense BrEt (Secció 4.1.1.1).

Tal i com s'indica en la Secció 4.1.1, es va establir un valor a partir del qual vam considerar que hi havia depleció de l'ADNmt calculant el nombre mitjà de còpies d'ADNmt en les 10 línies cel·lulars de controls sans a t0 (445 còpies d'ADNmt/cèl·lula). Com que els 10 valors de nombre de còpies d'ADNmt en controls tenien una distribució normal (D'Agostino & Pearson test: $p=0,1102$; Shapiro-Wilk test: $p=0,4257$; Kolmogorov-Smirnov test: $p>0,1$) es va calcular la seva desviació estàndard (98) i es va establir depleció de l'ADNmt quan el nombre de còpies d'una línia cel·lular era dues desviacions estàndard menor que els valors mitjans dels controls, és a dir, menor a 249 còpies d'ADNmt per cèl·lula (Figura Suplementària 4).

Posteriorment, en aquelles línies on es va veure que desenvolupaven depleció de l'ADNmt sense BrEt es va tornar a avaluar l'eficàcia i seguretat utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt (Secció 5.1.1.3). En el model d'inducció de depleció amb BrEt es va considerar que una línia cel·lular mantenia el fenotip de depleció de l'ADNmt a t20 i t30 quan, en retirar el BrEt, el nombre de còpies d'ADNmt no mostrava cap tendència a superar els valors de depleció induïda a t10.

5.1.1.2.1. Cèl·lules de controls sans

Tal com s'esperava, els fibroblasts que provenien de controls sans no presentaven depleció espontània de l'ADNmt als 10 dies d'incubació en condicions de quiescència sense BrEt (Figura 5.1 i Figura Suplementària 5). De fet, els valors de nombre de còpies d'ADNmt a t10 van resultar iguals o superiors als del t0. Per contra, quan les mateixes cèl·lules s'incubaven durant 10 dies amb BrEt s'indueix una clara depleció de l'ADNmt. Quan es va retirar el BrEt, després dels 10 dies d'inducció de depleció de l'ADNmt, tots els controls van ser capaços de recuperar el nombre inicial de còpies d'ADNmt tant si havien estat tractats amb dNs com si no, ja que no tenen cap defecte molecular que impedeixi la replicació i repoblació de

l'ADNmt quan es retira l'agent estressant que provoca depleció (Figura 5.1 i Figura Suplementària 5).

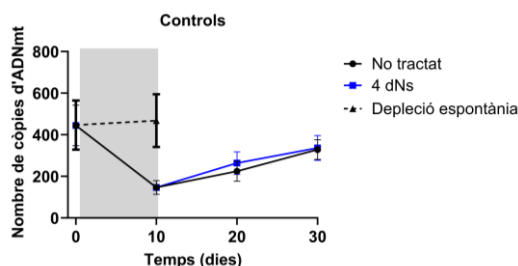


Figura 5.1. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans (C1 – C10) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i la desviació estàndard dels valors de les diferents línies cel·lulars de controls sans (C1 – C10). Les cèl·lules del C5 es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat (tot i estar representades com a dia 30).

5.1.1.2.2. Cèl·lules amb mutacions en *TWNK*

Cap de les 3 línies amb mutacions en *TWNK* presentava depleció espontània de l'ADNmt, per la qual cosa era necessari induir depleció amb BrEt per testar l'efecte dels dNs en la recuperació de l'ADNmt (Figura 5.2). En l'experiment amb inducció de depleció amb BrEt cap de les 3 línies mantenia el fenotip de depleció quan es retirava el BrEt (després del dia 10). A més, les cèl·lules recuperaven totalment o parcial el nombre inicial de còpies d'ADNmt, tant en presència com en absència de tractament. Aquest fet impedeix veure si els dNs tenen un paper en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt i per extensió en la repoblació d'aquest en la cèl·lula.

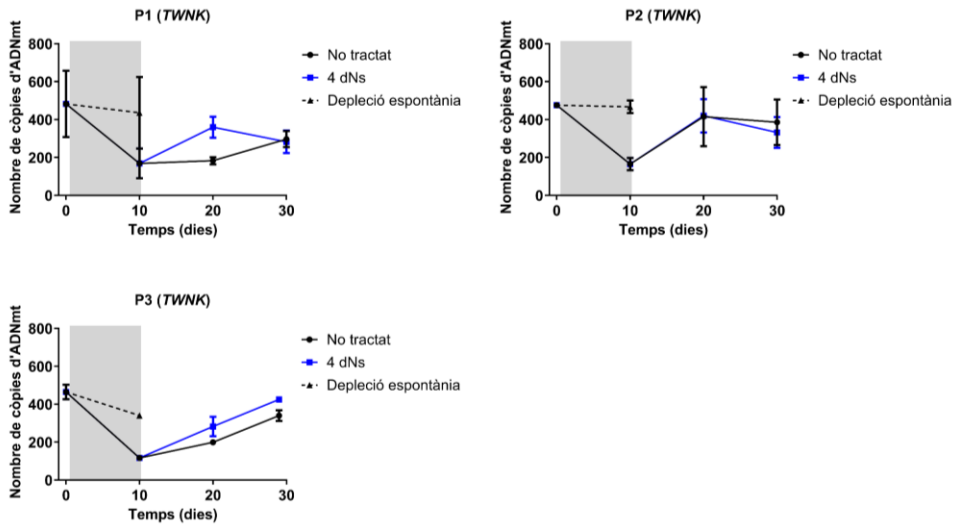


Figura 5.2. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen TWNK (P1 – P3) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.2.3. Cèl·lules amb mutacions en DNA2

Tot i que les cèl·lules amb mutacions en DNA2 tenien depleció espontània als 10 dies d'acord amb el criteri establert com a depleció espontània (Secció 5.1.1.2), aquesta no era tan gran com quan aquests fibroblasts s'incubaven amb BrEt, per la qual cosa es va optar per testar l'efecte del tractament amb dNs només en condicions de depleció induïda (Figura 5.3). En aquestes condicions, els fibroblasts no mostraven fenotip de depleció de l'ADNmt mantingut en el temps quan es va retirar el BrEt, la qual cosa no permet veure l'efecte dels dNs si és que el tenen. Tot i així, els valors d'ADNmt eren superiors a t20 i t30 en les cèl·lules tractades amb dNs, cosa que suggereix cert efecte dels dNs en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt.

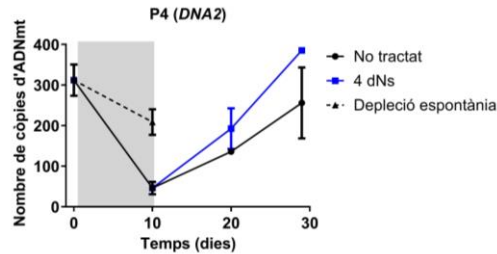


Figura 5.3. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen DNA2 (P4) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 29 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

5.1.1.2.4. Cèl·lules amb mutacions en RNASEH1

Les cèl·lules amb mutacions en *RNASEH1* no tenien depleció espontània i quan es va eliminar el BrEt del medi de cultiu aquestes mantenien el fenotip de depleció de l'ADNmt al llarg de l'experiment (Figura 5.4). Aquest fenotip no es va aconseguir revertir amb el tractament amb dNs, la qual cosa indica que els dNs no són eficaços per repoblar l'ADNmt, almenys en condicions de quiescència i per a les mutacions que tenen aquestes cèl·lules en el gen *RNASEH1*.

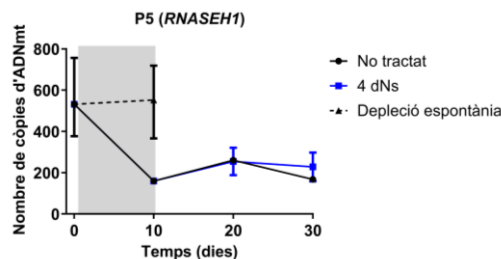


Figura 5.4. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen RNASEH1 (P5) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.2.5. Cèl·lules amb mutacions en *RRM2B*

Les cèl·lules amb mutacions en *RRM2B* no mostraven depleció espontània de l'ADNmt, per la qual cosa es va utilitzar el model de depleció induïda per testar l'efecte dels dNs (Figura 5.5). Les dues línies testades van ser capaces de revertir la depleció en absència del tractament, encara que la recuperació va ser més ràpida amb els dNs, ja que a t20 les cèl·lules tractades ja havien recuperat el nombre inicial de còpies d'ADNmt mentre que les cèl·lules no tractades encara no ho havien fet. A t30 les cèl·lules no tractades ja havien recuperat el nombre inicial de còpies d'ADNmt però les cèl·lules tractades amb dNs tenien moltes més còpies que a l'inici. Les dues línies cel·lulars testades, tot i que no tenen un fenotip de depleció mantingut en el temps en retirar el BrEt, mostren un cert efecte estimulador dels dNs en la recuperació de l'ADNmt.

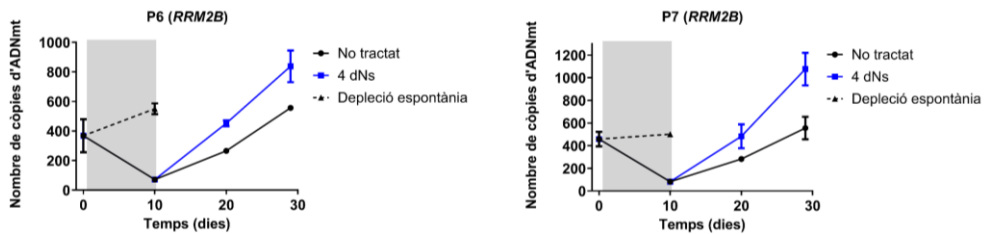


Figura 5.5. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *RRM2B* (P6 – P7) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinúta representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 29 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

5.1.1.2.6. Cèl·lules amb mutacions en *OPA1*

Les cèl·lules amb mutacions en *OPA1* no presentaven depleció espontània de l'ADNmt, per aquest motiu es va testar l'efecte dels dNs en presència de BrEt (Figura 5.6). En aquestes condicions, les cèl·lules dels P18 i P19 van mantenir el fenotip de depleció després de retirar el BrEt, tot i que van mostrar una tendència a la recuperació a t30. El tractament amb dNs va afavorir lleugerament aquesta recuperació. El P20 i P21 no mantenien el fenotip de depleció en retirar el BrEt, cosa que no ens permet veure l'efecte dels dNs (Figura 5.6).

Les cèl·lules del P22, per contra, mantien clarament el fenotip de depleció de l'ADNmt quan es va retirar el BrEt i els dNs estimulaven la replicació de l'ADNmt, tot i que no aconseguen recuperar les quantitats que hi havia a l'inici de l'experiment (Figura 5.6). Aquests resultats mostren que els dNs poden estimular la replicació de l'ADNmt en certes mutacions en el gen *OPA1*, encara que el seu possible efecte positiu no està clar en altres línies amb diferents mutacions.

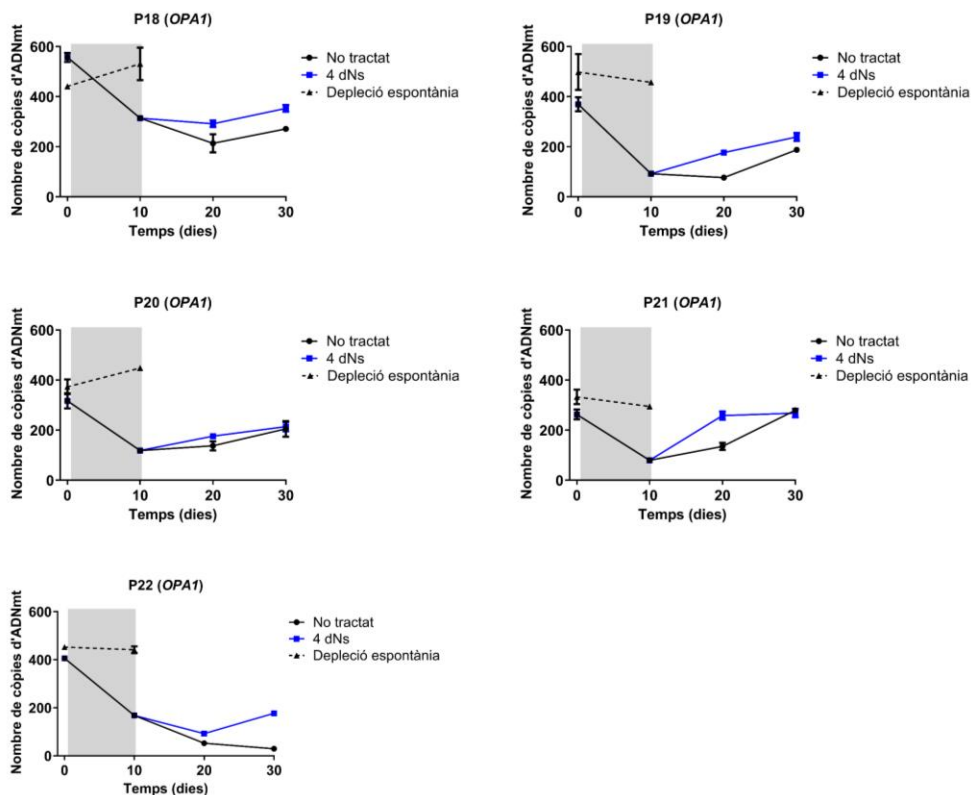


Figura 5.6. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *OPA1* (P18 – P22) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. El nombre de còpies dels experiments de depleció espontània i induïda són diferents a t0 perquè els experiments es van fer de manera independent.

5.1.1.2.7. Cèl·lules amb mutacions en *SPG7*

Les quatre línies amb diferents mutacions en el gen que codifica la paraplegina tenien un comportament igual: els fibroblasts no tenien depleció espontània i quan es retirava el BrEt el fenotip de depleció es revertia de la mateixa manera amb i sense tractament (Figura 5.7), la qual cosa no va permetre veure si els dNs tenien un efecte positiu en la replicació de l'ADNmt en cèl·lules amb diferents mutacions en *SPG7*.

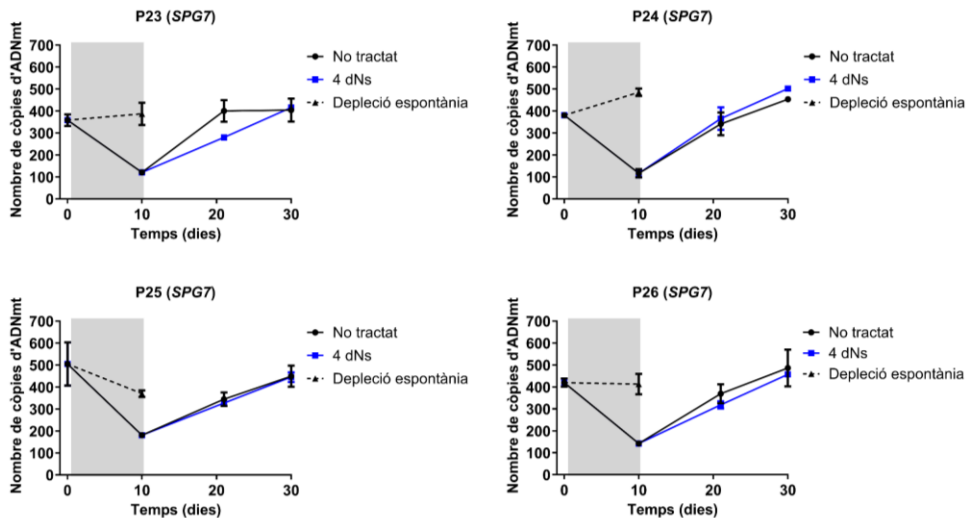


Figura 5.7. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *SPG7* (P23 – P26) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinuïda representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.2.8. Cèl·lules amb mutacions en *MPV17*

Les cèl·lules dels P27 i P28 amb mutacions en *MPV17* manifestaven una clara depleció de l'ADNmt a t10 sense presència de BrEt (Figura 5.8). A més, els valors a t10 sense BrEt eren molt similars als de les cèl·lules a t10 tractades amb BrEt, és a dir, aquestes cèl·lules mostraven el mateix grau de depleció amb i sense BrEt a t10. A t0, en canvi el seu nombre de còpies era normal. El P29, per contra, ja presentava depleció de l'ADNmt a l'inici de l'experiment (t0) (Figura 5.8).

Tot i així, es va fer l'experiment de repoblació de l'ADNmt amb l'addició de dNs en condicions d'inducció de depleció amb BrEt (Figura 5.8) i també en condicions de depleció espontània (Secció 5.1.1.3.3). En condicions de depleció induïda, el P27 i P28 mostraven fenotip de depleció en retirar el BrEt i aquest era revertit amb els dNs. En el cas del P29, que ja presentava depleció des de l'inici, es va aconseguir revertir parcialment la depleció al final de l'experiment (t30) (Figura 5.8). Aquests resultats indiquen que els dNs són eficaços per a la repoblació de l'ADNmt en cèl·lules amb mutacions en *MPV17*.

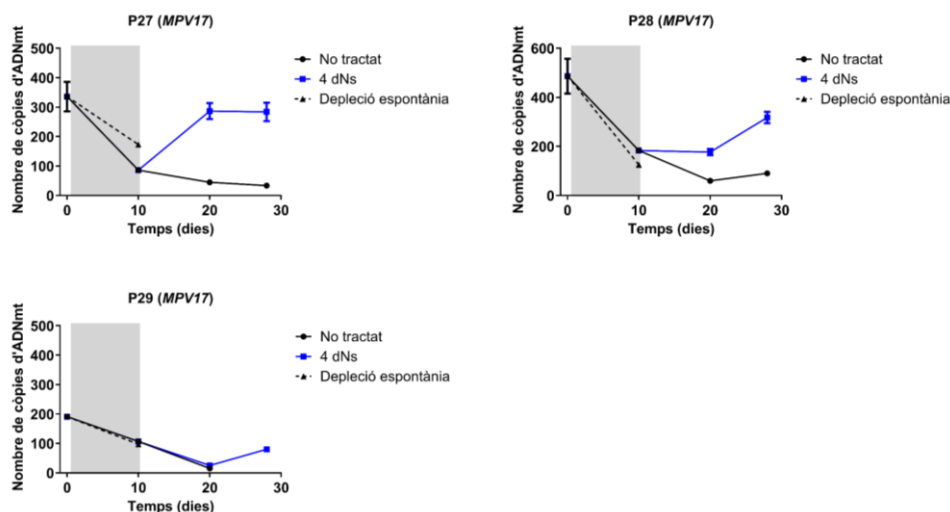


Figura 5.8. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *MPV17* (P27 – P29) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

5.1.1.2.9. Cèl·lules amb mutacions en *SUCLA2*

Les cèl·lules amb mutacions en *SUCLA2* no van mostrar depleció espontània de l'ADNmt (Figura 5.9). Per aquest motiu, es va testar l'efecte dels dNs en condicions de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. En aquestes condicions, en retirar el BrEt les cèl·lules no mantenien la depleció induïda al llarg del temps i l'ADNmt era repoblat d'igual manera tant

si hi havia dNs com si no, la qual cosa no permet veure el possible efecte dels dNs sobre la replicació de l'ADNmt (Figura 5.9).

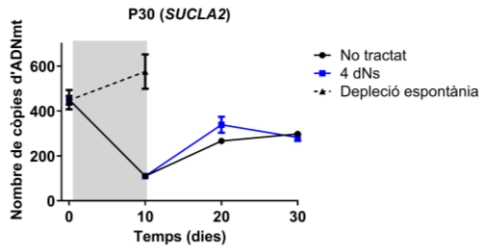


Figura 5.9. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen SUCLA2 (P30) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.2.10. Cèl·lules amb mutacions en SUCLG1

Les cèl·lules del P31 presentaven depleció espontània des de l'inici de l'experiment. A més, el nombre de còpies d'ADNmt de les cèl·lules a t10 no tractades amb BrEt era similar al de les cèl·lules a t10 tractades amb BrEt, cosa que indica un mateix grau de depleció quan s'indueix artificialment la depleció de l'ADNmt, com quan la depleció hi és de forma espontània (Figura 5.10). Encara que aquestes cèl·lules mostressin depleció espontània es va fer l'experiment sense BrEt (Secció 5.1.1.3.4) i també en condicions d'inducció amb BrEt (Figura 5.10). En aquest segon cas, les cèl·lules del P31 mostraven fenotip de depleció mantingut en el temps en eliminar el BrEt. La presència de dNs va recuperar parcialment el nombre inicial de còpies d'ADNmt, tot i que aquest no era superior al llindar establert com a depleció. Aquestes dades indiquen un efecte estimulador de la replicació de l'ADNmt per part dels dNs.

En el cas del P32, les cèl·lules no mostraven depleció espontània de l'ADNmt ni depleció mantinguda en el temps quan s'eliminava el BrEt, la qual cosa impedia veure el possible efecte dels dNs en la replicació de l'ADNmt (Figura 5.10). El P33 tenia depleció a t0 i t10. Tot i així, la presència de BrEt induïa una depleció encara més marcada, tal com passava en les

cèl·lules amb mutacions en *DNA2* (Secció 5.1.1.2.3). Aquest comportament és diferent al de les cèl·lules amb una depleció espontània que presentaven quantitats similars d'ADNmt en les condicions amb presència i absència de BrEt, com són les cèl·lules amb mutacions en *MPV17* (Secció 5.1.1.2.8) i el P31 amb mutacions en *SUCLG1*. Per aquest motiu, per al P33, només es va testar l'efecte dels dNs en el model d'inducció de depleció amb BrEt. En aquestes condicions, les cèl·lules no van mostrar una depleció sostinguda en el temps en retirar el BrEt i, de fet, van assolir un nombre de còpies dins el rang de la normalitat, tant en presència com en absència de dNs, cosa que impedeix veure l'efecte dels dNs en la replicació de l'ADNmt (Figura 5.10).

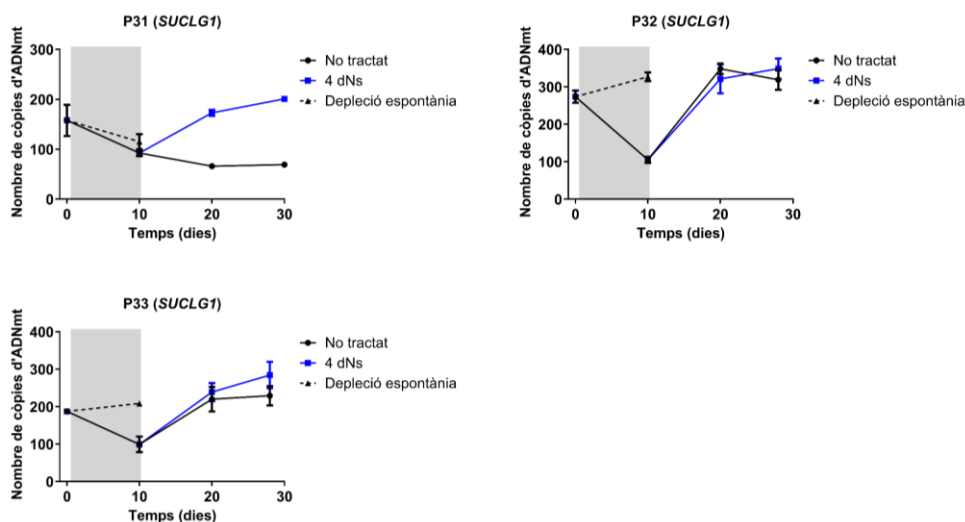


Figura 5.10. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *SUCLG1* (P31 – P33) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules del P32 i P33 es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

Aquests resultats indiquen que els dNs són capaços de revertir la depleció de l'ADNmt en alguns casos de deficiència de *SUCLG1* (la del P31), però no descarta que puguin tenir eficàcia també en els casos que aquí no presentaven fenotip de depleció en retirar el BrEt, ja que aquesta manca de fenotip no permet valorar un possible efecte estimulador dels dNs.

5.1.1.3. Model de depleció espontània de l'ADNmt

5.1.1.3.1. Cèl·lules de controls sans

Els fibroblasts que provenien de controls sans, com que no tenen cap defecte molecular que indueixi depleció de l'ADNmt, mantenen el nombre de còpies d'ADNmt al llarg del temps, tot i haver petites fluctuacions en el seu nombre durant l'experiment, tant si no eren tractats com si es tractaven amb dGuo (Figura Suplementària 6)(Figura 5.11) o amb els 4 dNs (Figura Suplementària 7)(Figura 5.11).

Cal indicar que els valors de nombre de còpies d'ADNmt al t0 van ser inferiors en aquests experiments en comparació amb els valors obtinguts en els experiments utilitzant el model d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt (Secció 5.1.1.2.1). Com que les condicions experimentals a t0 eren idèntiques en ambdós dissenys, podem atribuir aquesta diferència al fet que són sèries d'experiments diferents.

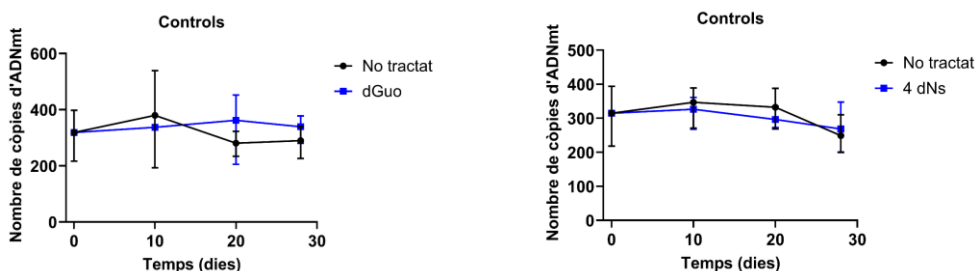


Figura 5.11. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans (C1, C3, C6) tractats amb dGuo o amb els 4 dNs (C1, C3, C4, C9) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb dGuo 50 μ M (C1, C3, C6) o amb els 4 dNs 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M (C1, C3, C4, C9). Els valors són la mitjana i la desviació estàndard dels valors de les diferents línies cel·lulars de controls sans. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

5.1.1.3.2. Cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*

El model de depleció espontània de l'ADNmt es va utilitzar per testar l'eficàcia i seguretat gènica dels dNs en cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*, ja que es tenien dades prèvies que aquests fibroblasts mostraven depleció espontània⁸⁵. De fet, les dues línies amb mutacions en *DGUOK* testades van corroborar la presència de depleció espontània (Figura 5.12), ja que a t10 i en absència de tractament mostraven una quantitat d'ADNmt inferior al llindar

establert com a depleció (249 còpies d'ADNmt/cèl·lula) (Secció 5.1.1.2). En aquest cas, es van tractar les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK* amb dGuo, perquè aquest havia mostrat eficàcia en un estudi previ⁸⁵ evitant la depleció de l'ADNmt.

El P16 mostrava inicialment quantitats d'ADNmt que no es considerarien depleció, però el nombre de còpies d'aquest queia al llarg del temps en les cèl·lules no tractades. Aquesta depleció era evitada amb el tractament amb dGuo que permetia, al final de l'experiment, assolir els valors d'ADNmt que hi havia a l'inici (Figura 5.12). El P17, per contra, ja presentava depleció a l'inici de l'experiment i es mantenia al llarg de tots els temps estudiats en les condicions de no tractament. El tractament amb dGuo va aconseguir evitar parcialment la depleció, ja que les cèl·lules tractades tenien un nombre de còpies més alt que a l'inici de l'experiment i que les cèl·lules no tractades (Figura 5.12), encara que el nombre de còpies d'ADNmt no superava els valors a partir dels quals es considera que no hi ha depleció. Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts prèviament en el nostre laboratori⁸⁵.

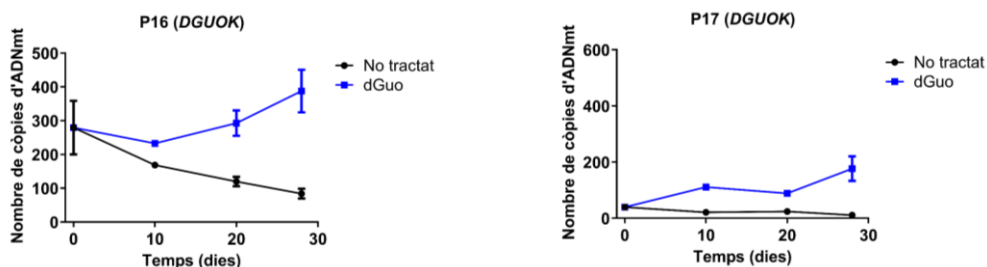


Figura 5.12. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen DGUOK (P16 – P17) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb dGuo 50 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.3.3. Cèl·lules amb mutacions en *MPV17*

Un cop es va veure que les cèl·lules amb mutacions en *MPV17* tenien depleció espontània (Secció 5.1.1.2.8) es va testar l'efecte del tractament amb dNs en aquest model. Les tres línies amb mutacions diferents en el gen *MPV17* van mostrar un comportament semblant: a l'inici de l'experiment les cèl·lules no mostraven depleció, però aquesta es desenvolupava en el grup de cèl·lules no tractades. Aquesta depleció era evitada (parcialment en el cas del P29) quan les cèl·lules estaven sota el tractament dels 4 dNs (Figura 5.13).

Aquests experiments estan en línia amb els resultats obtinguts en el model d'inducció de depleció amb BrEt (Secció 5.1.1.2.8) i amb una publicació prèvia²¹⁷ i demostren que els dNs eviten totalment (P27 i P28) o parcialment (P29) la depleció de l'ADNmt en cèl·lules amb mutacions en *MPV17*. Cal indicar que, tal com passava amb els controls (Secció 5.1.1.2.1 i Secció 5.1.1.3.1), els valors del t0 d'aquest experiment són més baixos que els valors del t0 de les mateixes línies cel·lulars en l'experiment d'inducció de la depleció amb BrEt (excepte el P29, que són més alts), cosa que indica la variabilitat del nombre de còpies d'ADNmt en una mateixa línia cel·lular, tot i tenir-les en les mateixes condicions experimentals.

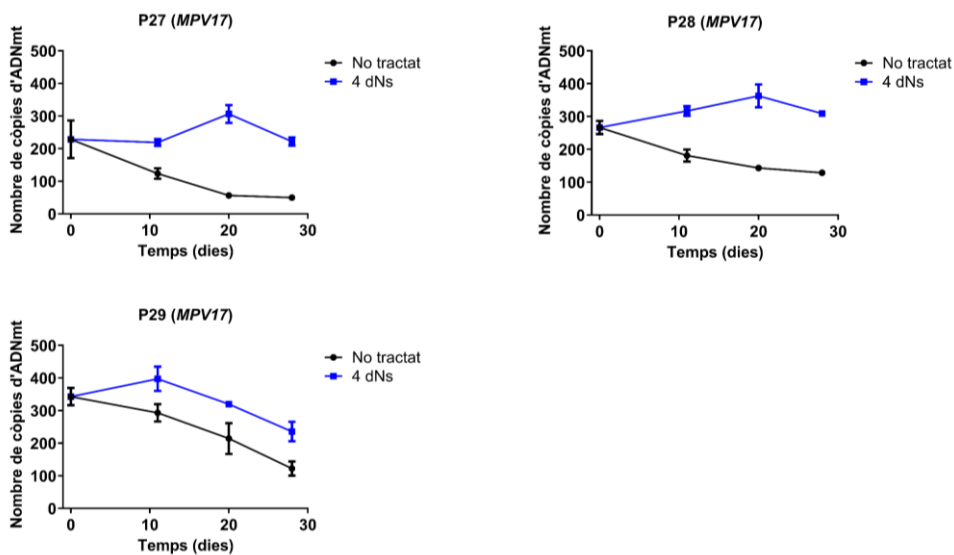


Figura 5.13. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *MPV17* (P27 – P29) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb els 4 dNs 50 μ M i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

5.1.1.3.4. Cèl·lules amb mutacions en *SUCLG1*

Un cop es va veure que els fibroblasts d'un dels pacients amb mutacions en *SUCLG1* tenien depleció espontània (P31) (Secció 5.1.1.2.10) es va testar l'eficàcia i seguretat del tractament amb dNs en el model de depleció sense BrEt (Figura 5.14). Tal com s'havia vist anteriorment (Secció 5.1.1.2.10), les cèl·lules amb mutacions en *SUCLG1* mostraven depleció a l'inici de l'experiment (Figura 5.14). A més, la depleció s'acusava a mesura que passava el temps en les cèl·lules no tractades i en les cèl·lules tractades amb els 4 dNs es veia la recuperació

parcial (amb alguna oscil·lació) de les quantitats d'ADNmt, tot i que aquestes eren molts més baixes que el llindar establert com a depleció. Aquest experiment corrobora els resultats obtinguts en el model de depleció induïda (Secció 5.1.1.2.10) i demostren que els dNs eviten parcialment la depleció de l'ADNmt en les cèl·lules amb les mutacions estudiades en *SUCLG1*.

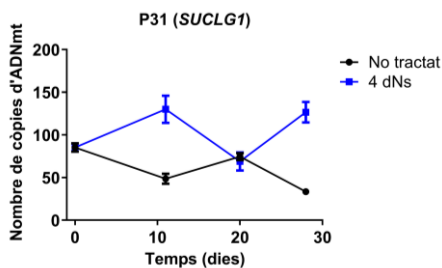


Figura 5.14. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts amb mutacions en el gen *SUCLG1* (P31) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb els 4 dNs 50 μ M i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.

Taula 5.2. Resum de resultats d'eficàcia in vitro. La taula inclou el pacient, el gen afectat, el model de depleció de l'ADNmt utilitzat (induïda amb BrEt o espontània), si hi ha fenotip de depleció en retirar el BrEt (només en els casos en que s'ha induït artificialment la depleció de l'ADNmt) i si les cèl·lules responen al tractament amb dNs.

Pacient	Gen	Model de depleció de l'ADNmt	Fenotip de depleció en retirar el BrEt?	Resposta a dNs?
P1	<i>TWNK</i>	Induïda	No	No concloent
P2	<i>TWNK</i>	Induïda	No	No concloent
P3	<i>TWNK</i>	Induïda	No	No concloent
P4	<i>DNA2</i>	Induïda	No	Sí (parcial)
P5	<i>RNASEH1</i>	Induïda	Sí	No
P6	<i>RRM2B</i>	Induïda	No	Sí (parcial)
P7	<i>RRM2B</i>	Induïda	No	Sí (parcial)
P16	<i>DGUOK</i>	Espontània	No estudiat	Sí
P17	<i>DGUOK</i>	Espontània	No estudiat	Sí
P18	<i>OPA1</i>	Induïda	Parcial	No concloent
P19	<i>OPA1</i>	Induïda	Parcial	No concloent
P20	<i>OPA1</i>	Induïda	No	No concloent
P21	<i>OPA1</i>	Induïda	No	No concloent
P22	<i>OPA1</i>	Induïda	Sí	Sí
P23	<i>SPG7</i>	Induïda	No	No concloent
P24	<i>SPG7</i>	Induïda	No	No concloent
P25	<i>SPG7</i>	Induïda	No	No concloent
P26	<i>SPG7</i>	Induïda	No	No concloent
P27	<i>MPV17</i>	Induïda i espontània	Sí	Sí, en els dos models
P28	<i>MPV17</i>	Induïda i espontània	Sí	Sí, en els dos models
P29	<i>MPV17</i>	Induïda i espontània	Sí	Sí, en els dos models
P30	<i>SUCLA2</i>	Induïda	No	No concloent
P31	<i>SUCLG1</i>	Induïda i espontània	Sí	Sí, en els dos models
P32	<i>SUCLG1</i>	Induïda	No	No concloent
P33	<i>SUCLG1</i>	Induïda	No	No concloent

5.1.2. Eficàcia del tractament amb dNs en el model de ratolí *Dguok*^{-/-}

5.1.2.1. Nombre de còpies d'ADNmt

L'efecte del tractament amb dAdo + dGuo sobre el nombre de còpies d'ADNmt es va estudiar en diferents òrgans (fetge, múscul esquelètic, cervell i cor) en els ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats diàriament des dels 8 dies d'edat fins les 6 setmanes d'edat amb vehicle (PBS) o amb una combinació de dAdo + dGuo (Secció 4.1.3).

Els ratolins *Dguok*^{-/-} (KO) tractats amb vehicle mostraven depleció en tots els teixits estudiats excepte en el cor (Figura 5.15), encara que el grau de depleció era diferent segons l'òrgan: el fetge era l'òrgan amb més depleció (amb la presència de només el 2,5% de còpies respecte als animals *Dguok*^{+/+} (WT)), seguit pel múscul esquelètic (amb la presència del 23,4% de còpies d'ADNmt) i seguit pel cervell (amb la presència del 45,8% de còpies d'ADNmt). El cor, tot i tenir tendència a mostrar depleció, aquesta no era estadísticament significativa (75,9% de còpies d'ADNmt respecte als animals *Dguok*^{+/+}).

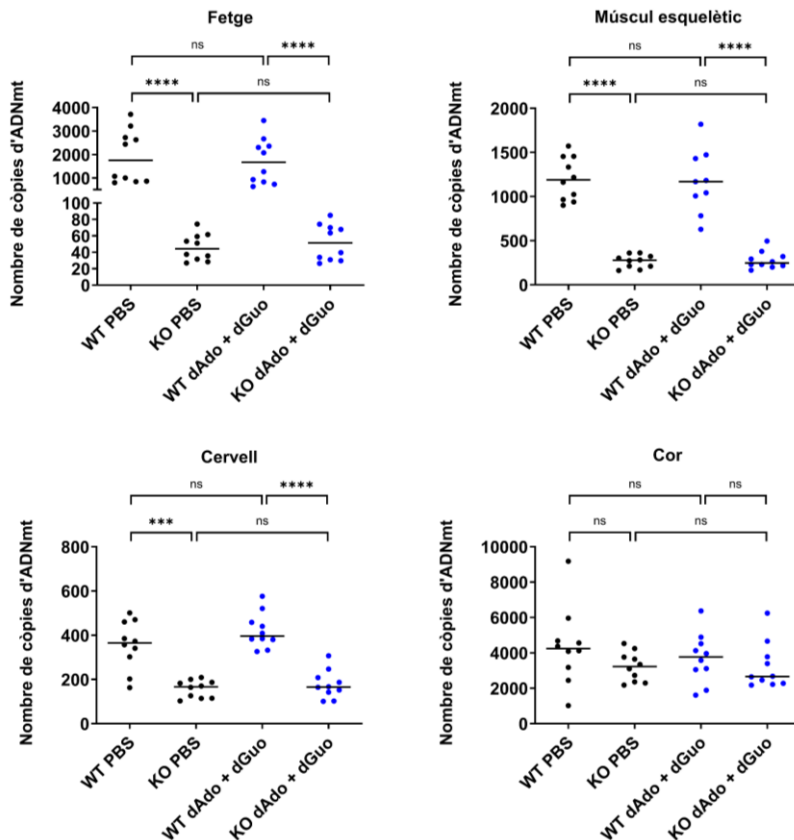


Figura 5.15. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula en ratolins WT i KO per Dguok. Nombre de còpies d'ADNmt en mostres de fetge (eix d'ordenades truncat), múscul esquelètic (gastrocnemi + soli), cervell i cor de ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) tractats diàriament, excepte caps de setmana, per sonda oral de PBS (en negre) o dAdo + dGuo 200 mg/kg/dia (en blau) a partir del dia 8 fins a tenir 6 setmanes d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. ****p* < 0,0005, *****p* < 0,0001, ns: no significatiu.

El tractament amb dAdo + dGuo no va mostrar un efecte estimulador de la replicació de l'ADNmt independentment del genotip dels animals, ja que el nombre de còpies d'ADNmt es mantenia constant tant en els ratolins *Dguok*^{+/+} tractats amb PBS i dAdo + dGuo com en els ratolins *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS i dAdo + dGuo (Figura 5.15).

5.1.2.2. Concentracions dels dNs en plasma

Veient que el tractament amb dAdo + dGuo no tenia efecte en el nombre de còpies d'ADNmt (Secció 5.1.2.1) es van mesurar les concentracions en plasma dels dNs administrats (dAdo + dGuo) i els seus primers productes de degradació 1 hora després d'administrar el tractament per sonda oral per comprovar si la dAdo i la dGuo eren absorbits i metabolitzats. Per veure els intermediaris en la degradació de dNs, consultar la Figura 2.4.

Els dos dNs administrats (dAdo + dGuo) no tenien concentracions detectables en plasma de ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS ni tampoc en els ratolins tractats amb dAdo + dGuo (Figura 5.16), cosa que indica que aquests dos dNs són molt poc biodisponibles.

Quan es van analitzar els productes de degradació de la dAdo (dIno, hipoxantina, xantina i adenina) i de la dGuo (xantina i guanina) (Figura 5.16) es va veure que les concentracions plasmàtiques de dIno augmentaven significativament en els dos genotips estudiats quan els ratolins eren tractats amb dAdo + dGuo. Les concentracions d'hipoxantina i xantina augmentaven també quan els ratolins eren tractats amb dAdo + dGuo, encara que només de forma estadísticament significativa en els ratolins *Dguok*^{-/-}. Les concentracions d'adenina i guanina van resultar indetectables o molt a prop del límit de detecció (0,05 µM) en la majoria de ratolins i en els dos genotips estudiats, tant si havien estat tractats amb PBS o amb dAdo + dGuo.

El fet que no es detectin els dos compostos administrats (dAdo i dGuo) i aparegui un increment en els seus productes de degradació en els ratolins tractats amb aquests dos dNs recolza la idea de que els dNs de purina es degraden ràpidament després de la seva administració oral abans de poder ser detectats en la sang.

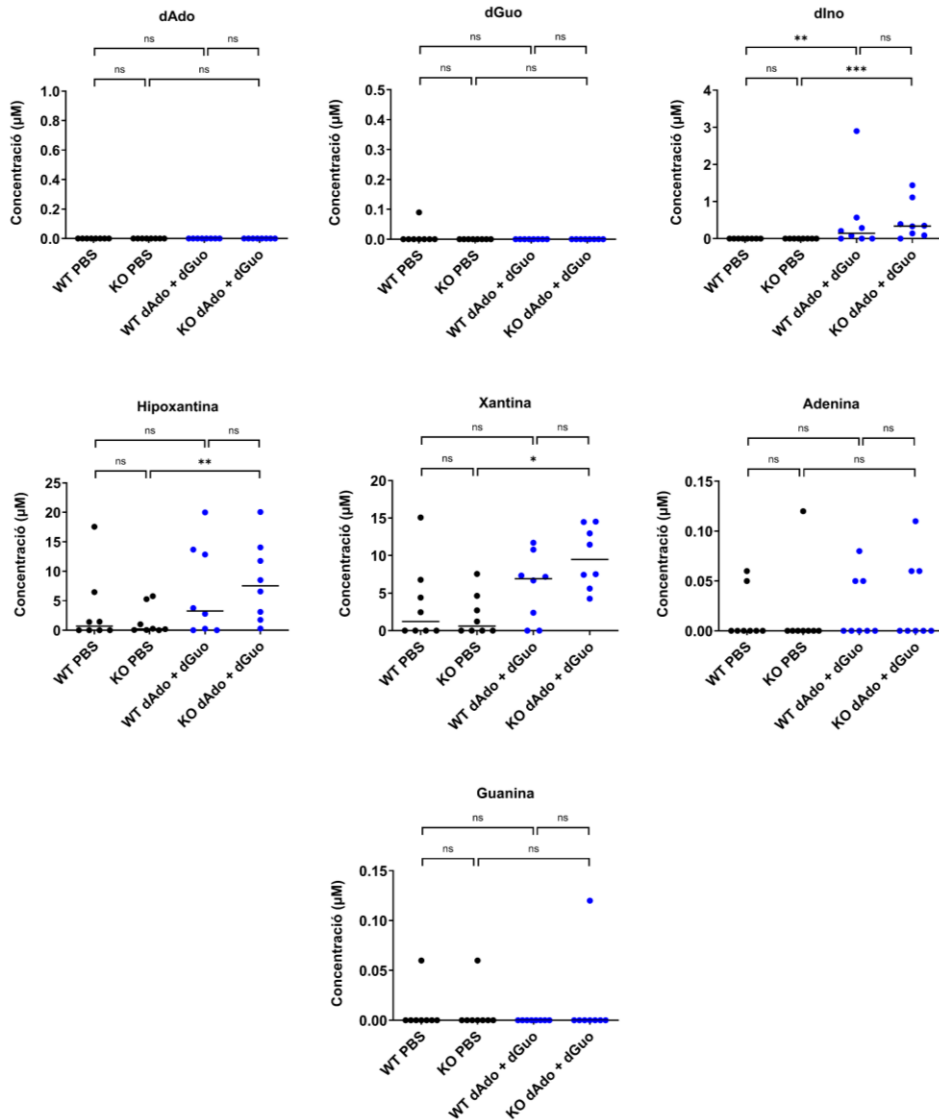


Figura 5.16. Concentracions dels dNs administrats i dels seus productes de degradació en plasma de ratolins WT i KO per Dguok. Concentracions plasmàtiques (µM) dels productes administrats (dAdo i dGuo) i dels seus primers productes de degradació: dIno, hipoxantina, xantina, adenina i guanina en plasma de ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) de 6 setmanes d'edat després de 1 hora de l'administració per sonda oral de vehicle (PBS) (en negre) o dAdo + dGuo 200 mg/kg (en blau). Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Tots els valors 0 són valors indetectables (<0,05 µM). Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu.

5.1.2.3. Contingut dels dNs en fetge

En el fetge, a diferència del que passava en el plasma (Secció 5.1.2.2), es va poder detectar la dAdo i la dGuo (Figura 5.17), tot i que les concentracions d'aquesta última estaven al voltant del límit de detecció (0,05 μM). A més, els ratolins *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS tenien quantitats més altes de dAdo en comparació amb els *Dguok*^{+/+} tractats amb PBS, cosa que també s'observa en la condició de tractament amb dAdo + dGuo.

Per altra banda, el tractament amb dAdo + dGuo no va aconseguir augmentar el contingut hepàtic d'aquests dos dNs en cap dels genotips estudiats 1 hora després de ser administrats i tampoc van augmentar els seus productes de degradació, possiblement, perquè els continguts endògens són molt alts i emmascaren l'augment de degradació dels dNs aportats exògenament (Figura 5.17).

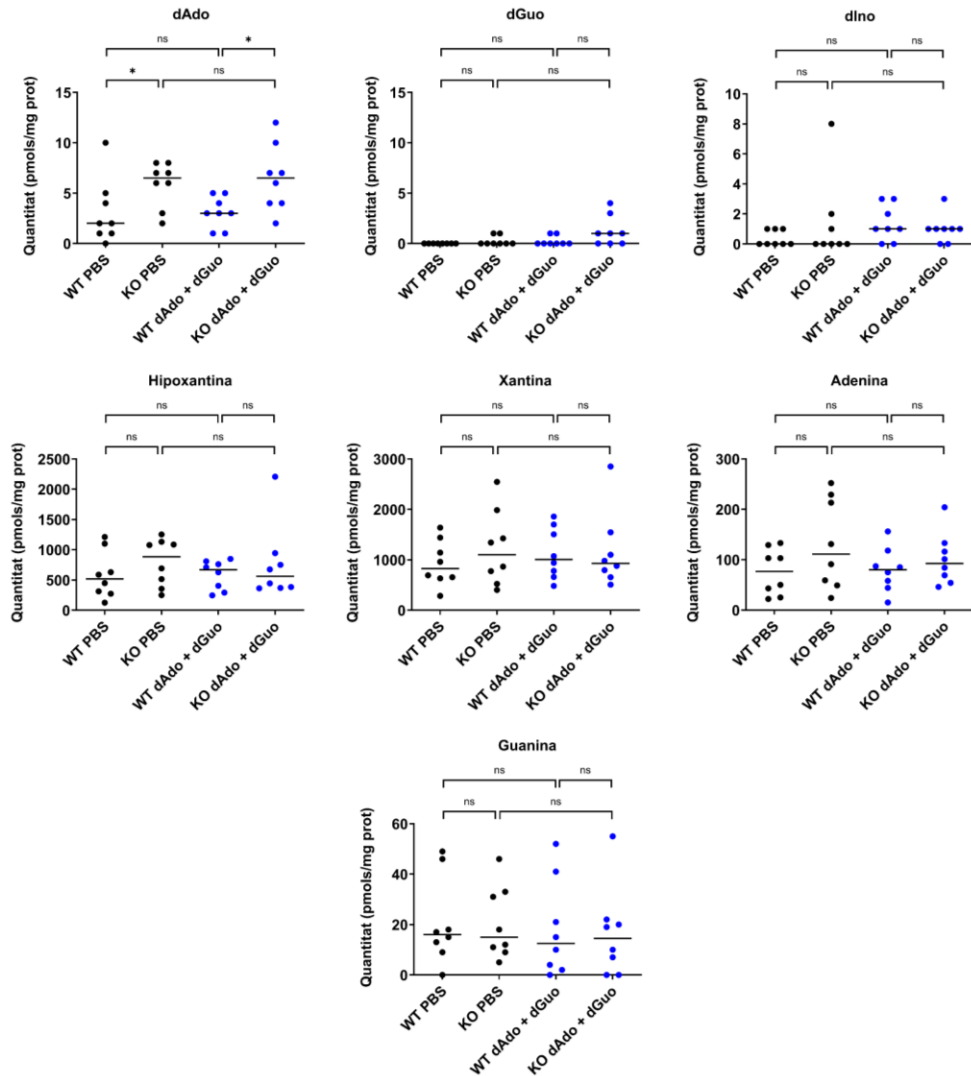


Figura 5.17. Quantitat dels dNs administrats i dels seus productes de degradació en fetge de ratolins WT i KO per Dguok. Quantitat (pmol/mg proteïna) dels dNs administrats (dAdo i dGuo) i dels seus productes de degradació: dIno, hipoxantina, xantina, adenina i guanina en fetge de ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) de 6 setmanes d'edat després de 1 hora de l'administració per sonda oral de vehicle (PBS) (en negre) o dAdo + dGuo 200 mg/kg (en blau). Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Tots els valors 0 són valors indetectables. Test estadístic: Mann-Whitney. *p<0,005, ns: no significatiu.

5.1.2.4. Contingut mitocondrial dels dNTPs en fetge

Tot i que en el fetge no es va detectar un augment de dAdo i dGuo en ratolins tractats amb aquests compostos (Secció 5.1.2.3) es va mesurar la quantitat de dNTPs mitocondrials en el fetge 1 hora després d'administrar aquests dos dNs per veure si el tractament hi tenia algun impacte.

En absència de tractament (ratolins tractats amb PBS) els ratolins *Dguok*^{-/-} mostraven una clara reducció de la quantitat de dGTP i, paradoxalment, un augment no tan marcat del dATP en comparació amb els ratolins *Dguok*^{+/+}. A més, el contingut de dCTP era més baix en els ratolins *Dguok*^{-/-} no tractats, però el dTTP no es va veure alterat pel genotip ni pel tractament (Figura 5.18).

Adicionalment, la determinació del dGTP mitocondrial es va fer sobre la fracció lliure. S'ha descrit que la majoria del dGTP (90%) en el mitocondri de fetge de ratolí està unit a la proteïna NDUFA10, mentre que una petita fracció (10%) es troba lliure, no unit a la proteïna³²⁴. Quan es mesuren els dNTPs es quantifica el dGTP total, és a dir, el dGTP unit a proteïna (que és gran la majoria) i el dGTP lliure (minoritari). Per tant, aquesta mesura equivaldria quasi a íntegrament el dGTP unit a proteïna. Com que el dGTP lliure és una petita fracció cal mesurar-lo específicament. Els valors d'aquest també tenien una tendència a ser més baixos en ratolins *Dguok*^{-/-}, tot i tenir valors que es troben molt a prop del límit de detecció de la tècnica, fet que causa la variabilitat observada (Figura 5.18).

Per altra banda, el tractament amb dAdo + dGuo no va aconseguir elevar la quantitat de dATP ni de dGTP lliure en cap dels dos genotips estudiats, però sí que va augmentar la quantitat de dGTP total, però només en els animals *Dguok*^{+/+}. A més, el tractament tampoc va causar alteracions en el contingut de dCTP ni dTTP en cap dels grups estudiats (Figura 5.18).

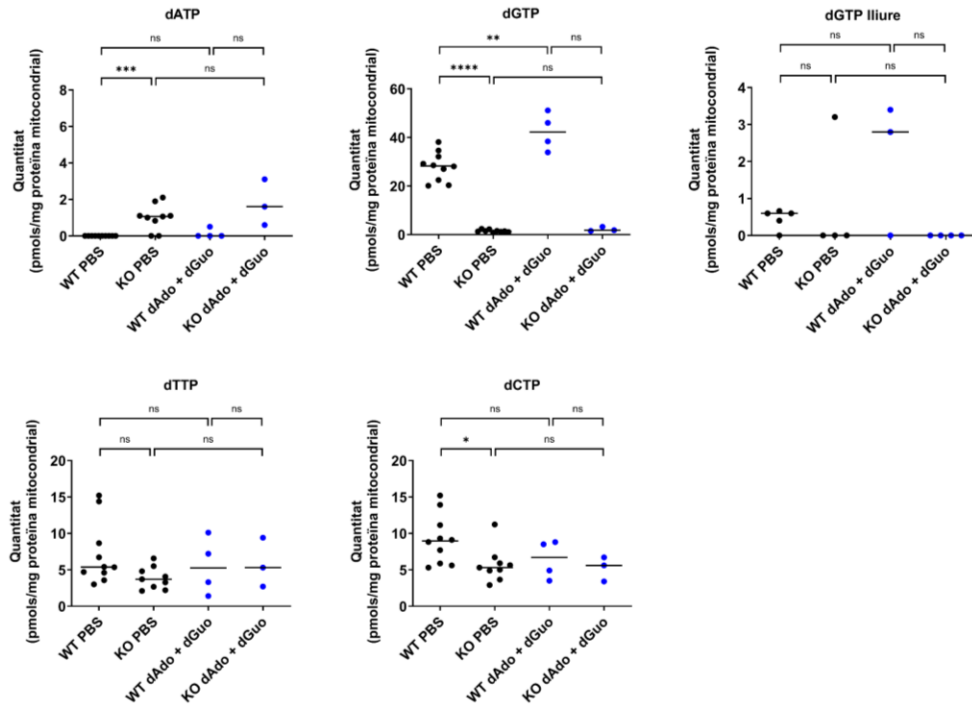


Figura 5.18. Quantitat dels 4 nucleòtids (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) en extractes mitocondrials de fetge de ratolins WT i KO per Dguok. La quantificació dels dNTPs es va fer sobre extractes enriquits en mitocondris de fetge en ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) de 8 setmanes d'edat després de 1 hora de l'administració per sonda oral de vehicle (PBS) (en negre) o dAdo + dGuo 200 mg/kg (en blau). Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Tots els valors 0 són valors indetectables. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu.

5.1.2.5. Contingut mitocondrial dels dNTPs en cervell

En el cervell, en absència del tractament, no es van veure alteracions en la quantitat dels dNTPs degudes al genotip (Figura 5.19), excepte pel dGTP. Aquest nucleòtid mostrava una quantitat més baixa en els ratolins *Dguok*^{-/-}, tal com passava en fetge (Secció 5.1.2.4), encara que en cervell la davallada de la quantitat d'aquest dNTP no era tan marcada. El tractament amb dAdo + dGuo no va augmentar la quantitat de cap dels 4 dNTPs, ni tan sols del dGTP (Figura 5.19), a diferència del que s'havia vist en fetge (Secció 5.1.2.4).

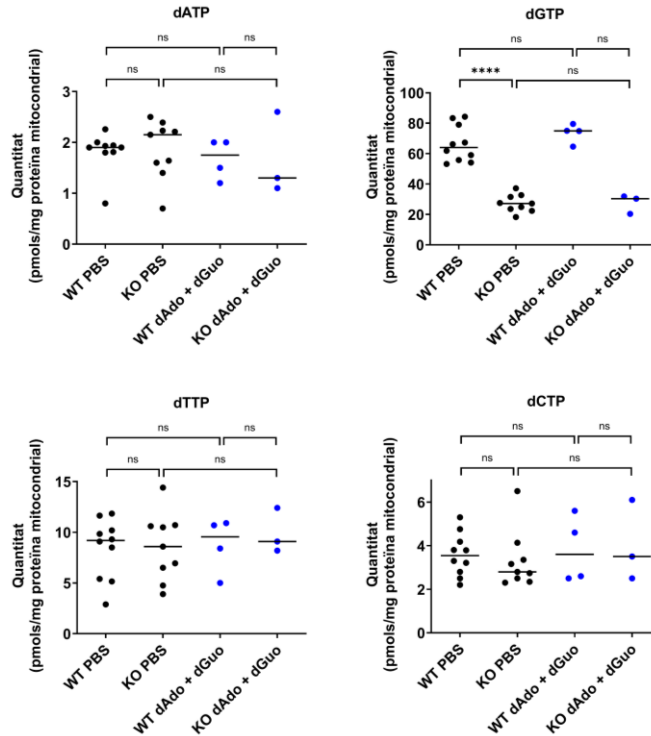


Figura 5.19. Quantitat dels 4 nucleòtids (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) en extractes mitocondrials de cervell de ratolins WT i KO per *Dguok*. La quantificació dels dNTPs es va fer sobre extractes enriquits en mitocondris de cervell en ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) de 8 setmanes d'edat després de 1 hora de l'administració per sonda oral de vehicle (PBS) (en negre) o dAdo + dGuo 200 mg/kg (en blau). Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. *****p*<0,0001, ns: no significatiu.

Les mesures de dNTPs en cervell, juntament amb les de fetge (Secció 5.1.2.4) estan d'acord amb la baixa biodisponibilitat de la dAdo i de la dGuo (Secció 5.1.2.2 i Secció 5.1.2.3), ja que aquests dos compostos són majoritàriament degradats en comptes de ser metabolitzats cap a dNTPs. Tot i això, l'increment de dGTP observat en fetge de ratolins *Dguok*^{+/+} tractats suggereix que la biodisponibilitat hepàtica de dGuo, tot i que reduïda, podria ser suficient per a estimular la via anabòlica d'aquest nucleòtid. Aquesta via anabòlica sembla produir-se mitjançant l'enzim dGK, ja que l'augment de dGTP no es va observar en el grup de ratolins *Dguok*^{-/-}.

5.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs

5.2.1. Seguretat gènica del tractament amb dNs en els models *in vitro*

Utilitzant els experiments on es va assajar l'eficàcia del tractament *in vitro*, es va estudiar també la seva seguretat gènica sobre l'ADNmt. En primer lloc, es va comparar el nombre de mutacions no homoplàsmiques (amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99%) sobre l'ADNmt (transicions, transversions, petites insercions o delecions) en els fibroblasts a t0, que correspon a l'estat basal de les cèl·lules en els experiments de recuperació de l'ADNmt amb dNs (Secció 4.1.1). També es van incloure dues línies de fibroblasts amb mutacions en *TYMP*, un altre gen associat a MDDS la disfunció del qual indueix mutacions puntuals somàtiques sobre l'ADNmt¹³³.

Com que els valors del nombre de mutacions sobre l'ADNmt dels fibroblasts de controls sans seguien una distribució normal (D'Agostino & Pearson test: $p=0,7023$; Shapiro-Wilk test: $p=0,3493$; Kolmogorov-Smirnov test: $p>0,1$), es va calcular la seva mitjana (7,2) i la seva desviació estàndard (4,0) i es va establir que una línia cel·lular presentaria un increment en el nombre de mutacions sobre l'ADNmt si el valor era superior a dues desviacions estàndard de la mitjana dels controls, és a dir, superior a 15,2 variants. Les cèl·lules amb mutacions en *TYMP* van mostrar uns valors molt superiors a aquest llinar (85 i 109 variants), indicant la presència de mutacions puntuals en l'ADNmt dels fibroblasts, tal com s'havia descrit prèviament¹³³. Les cèl·lules amb mutacions en *DNA2* i una línia cel·lular d'un total de 15 estudiades amb mutacions en *TK2* van mostrar un lleu increment del nombre de canvis sobre l'ADNmt respecte al llinar establert (19 i 18 variants, respectivament). Cap de les altres línies va mostrar un valor superior a aquest llinar (Figura 5.20).

Com s'acaba de comentar, un dels pacients amb dèficit de *TK2* presentava un nombre de mutacions per sobre del llinar (15,2). Com que aquest grup inclou 15 línies, es va poder comparar estadísticament amb els controls sans. Es va aplicar el test de Mann-Whitney (test no paramètric) perquè la distribució del nombre de mutacions sobre l'ADNmt dels pacients amb mutacions en *TK2* no s'ajustava a una distribució normal (D'Agostino & Pearson test: $p<0,0001$; Shapiro-Wilk test: $p=0,001$; Kolmogorov-Smirnov test: $p=0,0388$). Aquesta anàlisi va revelar que no hi havia diferències en el nombre de mutacions en l'ADNmt en els dos

grups ($p=0,2665$), tot indicant que mutacions en *TK2* no tenen un efecte mutagènic sobre l'ADNmt en aquest tipus cel·lular. Aquest test, però, no es va poder aplicar en el cas de les cèl·lules amb variants patogèniques en *DNA2*, ja que només hi havia un pacient.

En conjunt, aquestes dades indiquen que mutacions en els gens estudiats no causen un increment en el nombre de variants sobre l'ADNmt en fibroblasts de pell. L'única excepció correspon a única línia cel·lular (cèl·lules amb mutacions en *DNA2*) que presenta un nombre de variants lleugerament superior al dels controls però molt inferior al dels pacients que mostren mutacions sobre l'ADNmt causades per les mutacions en *TYMP*.

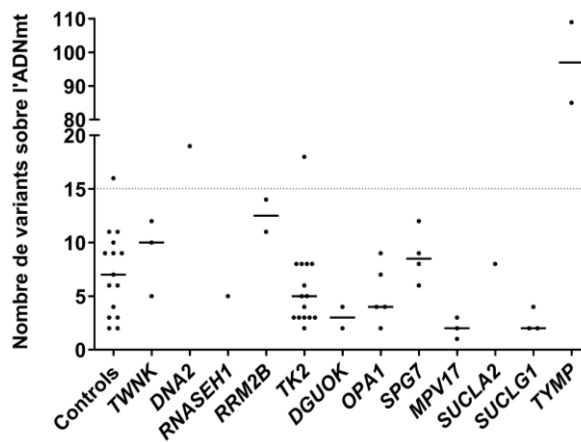


Figura 5.20. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt a t0. Representació dels valors individuals (punts) i de les medianes (línies horitzontals) del nombre de canvis sobre l'ADNmt respecte a la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% presents en el temps 0 (t0) en els fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS. La línia discontinua mostra la mitjana més dues desviacions estàndard del nombre de mutacions en els controls, que és el llindar a partir del qual s'ha considerat que unes cèl·lules tenen un increment en el nombre de variants en l'ADNmt.

Adicionalment, la distribució del grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt era similar en totes les línies cel·lulars estudiades (controls sans i pacients). La majoria de mutacions trobades (un percentatge que oscil·la entre el 40% i el 92% del total de mutacions) presentaven un grau d'heteroplàsmia baix (entre el 1% i el 20%). El segon grau d'heteroplàsmia més abundant va ser el grau d'heteroplàsmia més alt (entre el 81% i 99%) amb un percentatge del total de mutacions que oscil·la entre el 4% i el 60% (Figura 5.21).

La suma dels canvis amb una heteroplàsmia entre el 1% i el 20% i entre el 81% i el 99% representaven almenys el 80% de totes les mutacions trobades en totes les línies estudiades, mentre que els canvis amb un grau d'heteroplàsmia comprés entre el 21% i el 80% representaven, com a màxim el 20% del total de mutacions trobades en tots els grups estudiats. En conjunt, aquestes dades indiquen que els fibroblasts tant de controls sans com de pacients mantenen mutacions sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia polaritzat cap a molt baix (entre el 1% i el 20%) o molt alt (entre el 81% i 99%).

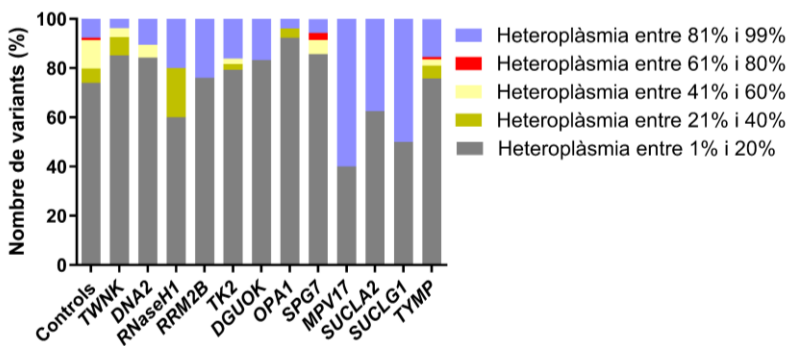


Figura 5.21. Percentatge de variants associades amb el seu grau d'heteroplàsmia en el t0. El nombre de variants en percentatge s'ha calculat quantificant el nombre de variants trobades en totes les línies cel·lulars dins de cada grup de cèl·lules de controls sans o de pacients i s'ha dividit pel total de mutacions trobades dins del mateix grup.

El fet que es trobin mutacions amb un alt grau d'heteroplàsmia en algunes cèl·lules es deu, segurament, a que la variant heretada de la mare en aquesta posició i, per tant, majoritària i present en un alt grau d'heteroplàsmia és diferent a la seqüència de referència, per la qual cosa es reporta com a variant amb un alt grau d'heteroplàsmia, mentre que la mutació puntual apareguda *de novo*, que es correspon amb la seqüència de referència, no es reporta com a variant i es troba amb un grau d'heteroplàsmia més baix. Per aquest motiu les mutacions amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1 i 20 % i el 80 i 99% correspondrien a mutacions amb el mateix grau d'heteroplàsmia.

5.2.1.1. Model de depleció amb BrEt

Utilitzant els ADNs obtinguts en els experiments on s'avaluava l'eficàcia dels dNs utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt es va estudiar també el nombre de mutacions no homoplàsmiques sobre l'ADNmt (variants amb una freqüència entre el 1% i el

99%) en el t0 i t20 sense i amb tractament amb els 4 dNs o amb la combinació de dCtd i dThd (Secció 4.1.1.1) (Figura 4.2).

La comparació entre el nombre de mutacions en l'ADNmt entre el t0 i el t20 sense tractament indica l'efecte del temps de cultiu sobre la inducció de mutacions sobre l'ADNmt. Tant en el cas dels fibroblasts dels controls sans, com en el dels fibroblasts amb mutacions en *TWINK*, *DNA2*, *RNASEH1*, *RRM2B*, *TK2*, *OPA1*, *SPG7*, *MPV17*, *SUCLA2* i *SUCLG1* el nombre de variants trobats a l'ADNmt a t20 no va ser significativament diferent dels observats a t0, indicant que ni el temps de cultiu ni el BrEt utilitzat en aquests estudis no induïa l'aparició de noves mutacions sobre l'ADNmt (Figura 5.22 i Figura 5.23).

Complementàriament, la comparació entre els ADNs obtinguts a t20 sense i amb tractament amb dNs indica la possible mutagenicitat dels dNs sobre l'ADNmt. Quan es va analitzar el possible efecte mutagènic dels dos dNs pirimidínics (dCtd i dThd), que és el tractament aplicat pel dèficit de TK2, es va observar que no s'indueix un increment significatiu en el nombre de mutacions sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans ni en fibroblasts amb mutacions en *TK2* (Figura 5.22). A més, tots els fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en *TWINK*, *DNA2*, *RNASEH1*, *RRM2B*, *OPA1*, *SPG7*, *MPV17*, *SUCLA2* i *SUCLG1* tractats amb els 4 dNs no presentaven un canvi significatiu en el nombre de mutacions sobre l'ADNmt (Figura 5.23).

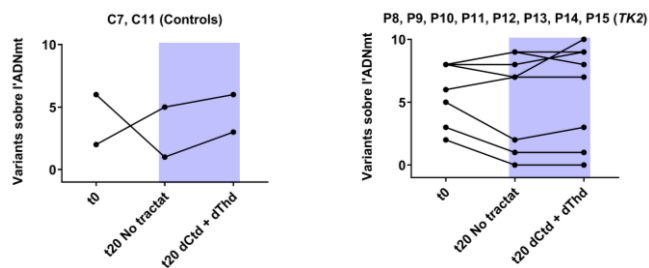


Figura 5.22. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en TK2 tractats amb dCtd + dThd utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt.

Nombre de mutacions sobre l'ADNmt respecte a la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% presents a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb dCtd i dThd 50 μ M cada un (t20 dCtd + dThd) en els fibroblasts de controls sans (C7, C11) i de pacients amb mutacions en TK2 (P8 – P15) utilitzant com a disseny experimental el sistema d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre les mutacions a l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.

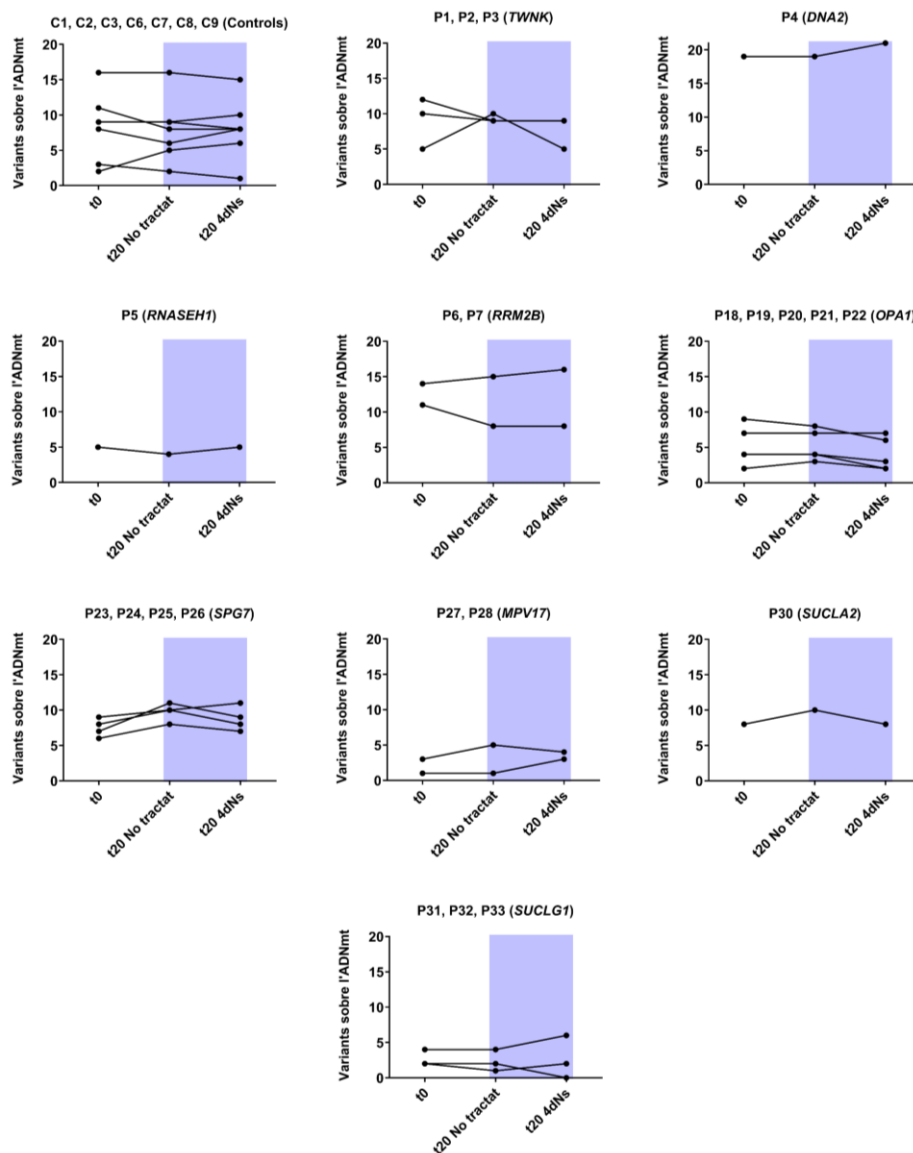


Figura 5.23. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt respecte a la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% presents a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb els 4 dNs 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M (t20 4dNs) en els fibroblasts de controls sans (C1 – C3, C6 – C9) i de pacients amb mutacions en els gens indicats associats a MDDS (P1 – P7, P18 – P28, P30 – P33) utilitzant com a disseny experimental el sistema d'inducció de depleció de l'ADNmt amb BrEt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre les mutacions a l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.

Adicionalment, mitjançant PCR llarga es va estudiar la integritat de l'ADNmt en totes les línies cel·lulars en les que es va seqüenciar l'ADNmt incloent les tres condicions estudiades (t0, t20 sense tractament i t20 amb tractament, ja sigui amb els 4 dNs o amb dCtd + dThd) i en cap mostra es va constatar la presència de deleccions múltiples sobre l'ADNmt.

Una anàlisi paral·lela enfocada a detectar la possible influència del cultiu i del tractament amb dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades va mostrar que cap d'aquestes variables modificava de manera significativa els percentatges d'heteroplàsmia en les línies cel·lulars estudiades, excepte en dues línies amb mutacions en *TK2*, on es va veure un canvi significatiu en els graus d'heteroplàsmia en les cèl·lules del P11 i P13, tot i ser canvis molt lleus i anar en direccions oposades (Figura Suplementària 8). A més, unes cèl·lules de controls sans (C1) van mostrar canvis significatius en els graus d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 amb tractament i entre el t20 sense i amb tractament, però no entre el t0 i el t20 sense tractament (Figura Suplementària 9). Finalment, unes cèl·lules amb mutacions en *TWINK* (P2) van mostrar diferències en el grau d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 amb i sense tractament (Figura Suplementària 10), mentre que la resta de fibroblasts de pacients no van mostrar diferències (Figura Suplementària 10 i Figura Suplementària 11). En conjunt, la gran majoria de cèl·lules no van presentar diferències en el percentatge d'heteroplàsmia de les variants trobades degudes al temps de cultiu o al tractament, tot i haver alguns casos particulars amb diferències molt lleus en els graus d'aquesta.

Cal puntualitzar que dins d'una mateixa línia cel·lular hi ha mutacions que es troben en alguna de les condicions estudiades mentre que en alguna altra condició no. Aquestes mutacions, solen tenir un grau d'heteroplàsmia al voltant del 1% o 99%, que són el llindar inferior i superior que s'ha establert per tenir en compte una mutació per a la seva anàlisi. El fet que algunes d'aquestes variants tinguin un grau d'heteroplàsmia tan proper al llindar fa que en algunes condicions el superin i es reportin per l'estudi del nombre de variants (Figura 5.22 i Figura 5.23), mentre que en altres casos no el superin i no es tinguin en compte. En els estudis d'evolució del grau d'heteroplàsmia (Figura Suplementària 8, Figura Suplementària 9, Figura Suplementària 10 i Figura Suplementària 11) quan una variant desapareixia en alguna condició, se li va atribuir un grau d'heteroplàsmia del 0% o del 100%,

segons la situació (mirant la presència o absència de la variant sobre el nombre total de lectures per comprovar que aquesta assumpció era real).

En conjunt, l'estudi de mutacions sobre l'ADNmt *in vitro* utilitzant el model de depleció de l'ADNmt amb BrEt indica que el tractament ja sigui amb els 4 dNs 50 μ M i EHNA 5 μ M o només amb dCtd i dThd a una concentració de 50 μ M no està induint mutacions noves sobre l'ADNmt ni tampoc seleccionant positivament mutacions preexistents tant en fibroblasts de controls sans com de pacients amb mutacions en gens associats a MDDS.

5.2.1.2. Model de depleció espontània

Utilitzant els ADNs obtinguts en els experiments on s'avaluava l'eficàcia dels dNs en cèl·lules que mostraven depleció espontània de l'ADNmt es va estudiar l'ADNmt a dia 0 i dia 20 sense i amb tractament amb els 4 dNs a una concentració de 50 μ M cada un o solament amb dGuo 50 μ M (Secció 4.1.1.2) (Figura 4.3). De forma similar al que passava en el model d'inducció de depleció amb BrEt (Secció 5.2.1.1), el nombre de mutacions heteroplàsmiques (amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99%) sobre l'ADNmt va resultar similar entre el t0, t20 sense tractament i t20 amb els 4 dNs (Figura 5.24) o t20 amb dGuo sola (Figura 5.25), fet que indica que el nombre de mutacions sobre l'ADNmt no es veu incrementat ni pel temps de cultiu ni pel tractament amb els 4 dNs o dGuo sola a les concentracions utilitzades en els fibroblasts utilitzant aquest model de depleció.

De nou, mitjançant PCR llarga es va estudiar la integritat de l'ADNmt en totes les condicions (t0, t20 sense tractament i t20 amb tractament, ja sigui amb els 4 dNs o amb dGuo) i en totes les línies cel·lulars en les que es va seqüenciar l'ADNmt i, de la mateixa forma que passava en el model d'inducció de depleció amb BrEt (Secció 5.2.1.1), cap mostra va presentar deleccions múltiples sobre l'ADNmt.

L'anàlisi del grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades va mostrar que les cèl·lules mantenien els nivells d'heteroplàsmia al llarg del temps i que aquests no es veien alterats pel tractament amb els 4 dNs (Figura Suplementària 12) o de dGuo sola (Figura Suplementària 13). Només una línia cel·lular (C1) va mostrar diferències estadísticament significatives en els nivells d'heteroplàsmia de les variants trobades entre el t0 i t20 sense o amb tractament amb dGuo (Figura Suplementària 12) o amb els 4 dNs (Figura Suplementària

13), però no entre el t20 amb i sense tractament indicant que aquesta diferència es deuria al temps de cultiu i no al tractament, tot i ser unes variacions del percentatge d'heteroplàsmia lleus.

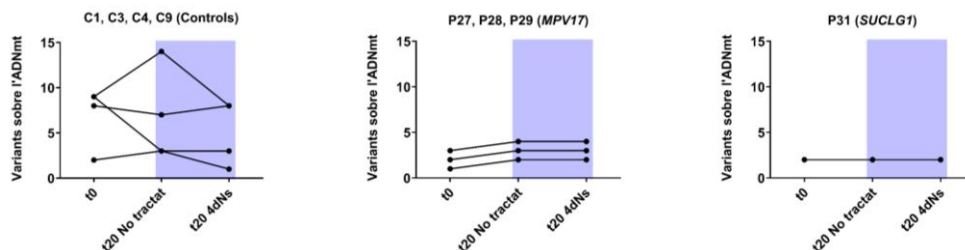


Figura 5.24. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt respecte a la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% presents a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb els 4 dNs 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M (t20 4dNs) en els fibroblasts de controls sans (C1, C3, C4, C9) i de pacients amb mutacions en MPV17 (P27, P28, P29) i SUCLG1 (P31) utilitzant com a disseny experimental el sistema de depleció espontània de l'ADNmt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.

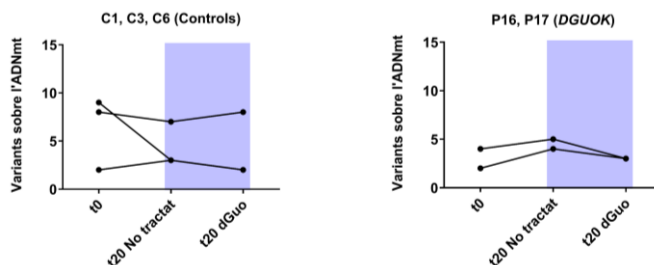


Figura 5.25. Nombre de mutacions sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en DGUOK tractats amb dGuo utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. Representació del nombre de mutacions sobre l'ADNmt respecte a la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% presents a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament de dGuo 50 μ M (t20 dGuo) en els fibroblasts de controls sans (C1, C3, C6) i de pacients amb mutacions en DGUOK (P16, P17) utilitzant com a disseny experimental el sistema de depleció espontània de l'ADNmt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.

Aquestes dades, juntament amb els resultats observats en el model de depleció induïda amb BrEt (Secció 5.2.1.1), recolzen la seguretat gènica sobre l'ADNmt dels 4 dNs o d'una combinació d'ells (dCtd + dThd) o l'administració d'un sol d'ells (dGuo) a una concentració de 50 μ M en tots els models *in vitro* estudiats.

5.2.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs *in vivo* estudiada en models de ratolí

5.2.2.1. Model de ratolí KO per *Tk2*

Els estudis de seguretat gènica del tractament amb dCtd + dThd sobre l'ADNmt en ratolins *Tk2*^{+/+} i *Tk2*^{-/-} es van fer a partir de mostres de múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i de fetge de ratolins obtingudes prèviament per un estudi d'eficàcia³¹⁷ en el qual es va tractar els animals durant diferents períodes de temps (a partir del dia 4 fins el dia 12 (8 dies de tractament) o a partir del dia 4 fins el dia 29 (25 dies de tractament)) amb PBS o una combinació de dCtd i dThd a una dosi de 400 mg/kg/dia cada un (Secció 4.1.2).

El producte de la PCR llarga on s'amplificava quasi tota la molècula d'ADNmt es va resoldre en un gel d'agarosa i es va veure que tots els animals analitzats (tant si eren *Tk2*^{+/+} o *Tk2*^{-/-}, si havien estat tractats amb PBS o amb dCtd + dThd o si havien estat tractats durant 8 dies o 25 dies) presentaven una única banda corresponent a l'ADNmt íntegre sense presència de deleccions múltiples en múscul esquelètic (Figura 5.26 a) i en fetge (Figura 5.26 b).

Mitjançant seqüenciació massiva es va veure que el nombre de variants no homoplàsmiques (amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99%) sobre l'ADNmt en els dos òrgans i en les dues edats estudiades (12 dies i 29 dies) va resultar similar entre ratolins *Tk2*^{+/+} i *Tk2*^{-/-} tractats només amb PBS (Figura 5.27), fet que indica que el model murí de dèficit de TK2 no manifesta un increment de mutacions puntuals sobre l'ADNmt en els òrgans analitzats, d'igual forma que passava amb els fibroblasts de pacients amb dèficit de TK2 (Secció 5.2.1.1). Per altra banda, el nombre de variants sobre l'ADNmt va resultar similar entre ratolins *Tk2*^{+/+} que havien rebut tractament diari durant 8 o 25 dies amb dCtd i dThd o amb PBS (Figura 5.27). Tampoc no es van observar variacions de nombre de mutacions en els grup de ratolins *Tk2*^{-/-} tractats amb PBS o dCtd + dThd en els dos punts temporals estudiats (Figura 5.27).

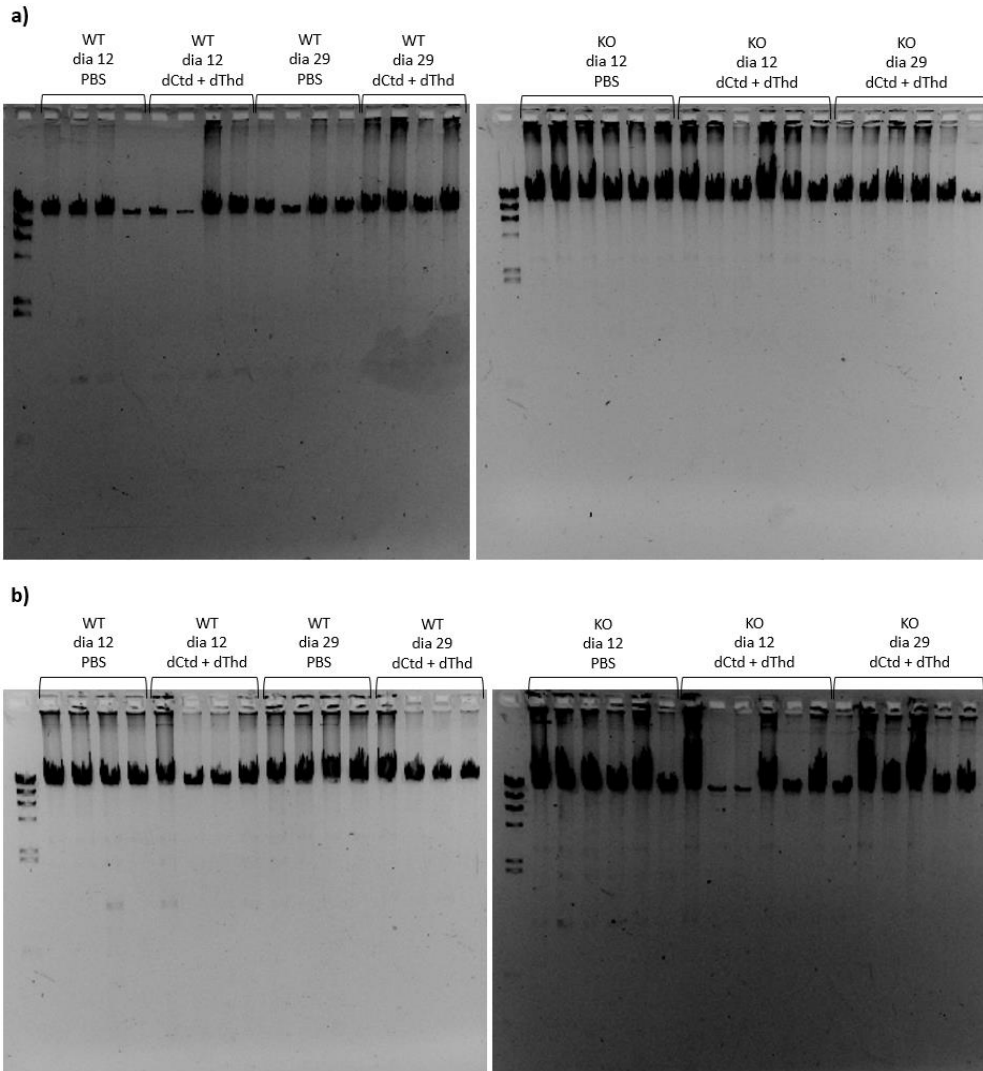


Figura 5.26. PCR llarga de mostres d'ADNmt de ratolí WT i KO per Tk2. Gel d'agarosa que mostra el producte de la PCR llarga on s'amplifica quasi tot l'ADNmt en mostres de múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) (a) o fetge (b) de ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament per sonda oral amb PBS o amb una dosi de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd a partir del dia 4 fins a 12 dies o 29 dies d'edat. Carrils de l'esquerra: marcador de pes molecular λ DNA/HindIII.

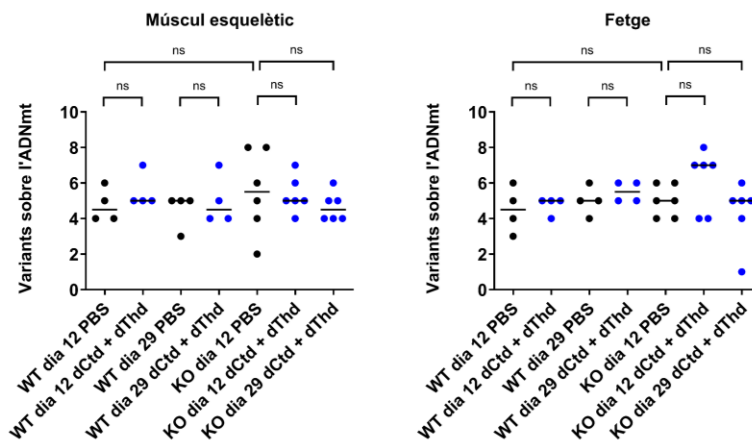


Figura 5.27. Nombre de variants sobre l'ADNmt en ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Nombre de variants trobades respecte la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge en ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament per sonda oral amb PBS (negre) o amb una dosi de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd (blau) a partir del dia 4 fins a 12 dies o 29 dies d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. ns: no significatiu.

Quan es va analitzar la distribució del tipus de mutació (delecció, inserció, transició o transversió) en els diferents grups de ratolins estudiats es va veure que aquesta es mantenia quasi idèntica en múscul i en fetge (Figura 5.28) i que el tipus de variant més freqüent en tots els grups van ser les deleccions d'un sol nucleòtid. A més, no es va veure un patró diferent en la distribució dels tipus de mutacions entre ratolins tractats amb PBS i ratolins tractats amb la combinació de dCtd + dThd. Aquest patró de distribució dels canvis també va ser similar entre ratolins Tk2^{+/+} i Tk2^{-/-} (Figura 5.28).

Adicionalment, quan es va examinar la distribució al llarg de l'ADNmt de totes les variants trobades en totes les mostres analitzades en aquest estudi es va veure que aquestes no es localitzaven en cap regió especialment susceptible, sinó que estaven distribuïdes al llarg de tota la molècula d'ADNmt tant en múscul esquelètic (Figura 5.29) com en fetge (Figura 5.30).

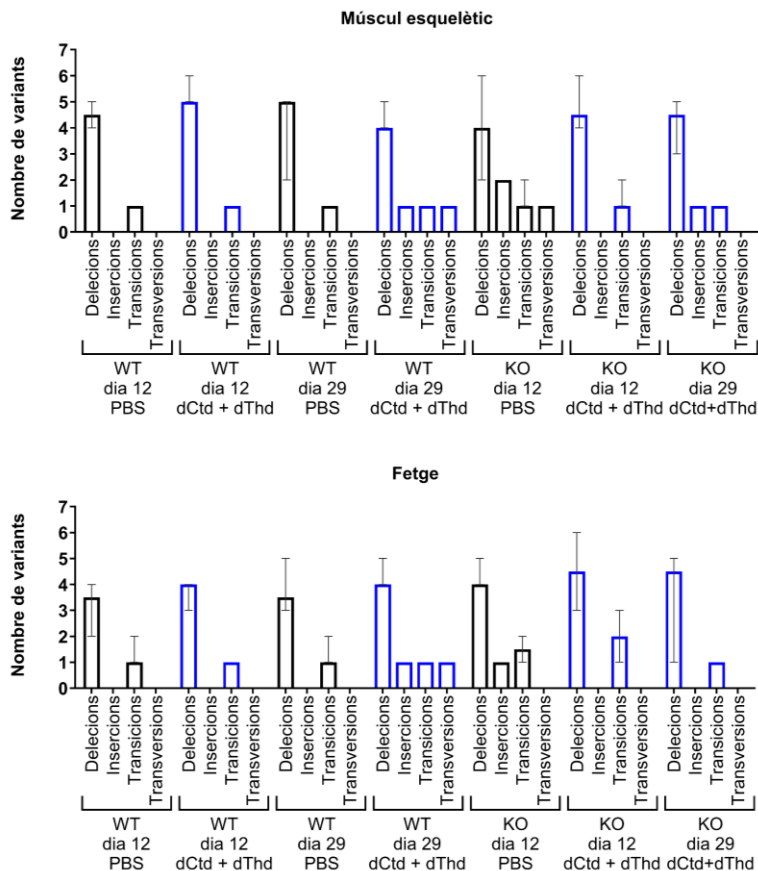


Figura 5.28. Tipus de mutació trobada en els ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Distribució per tipus de mutació (deleccions, insercions, transicions o transversions) de les variants sobre l'ADNmt trobades en ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. En negre estan marcades les variants corresponents a animals tractats amb PBS i en blau les variants corresponents a animals tractats amb dCtd + dThd. Les barres mostren la mediana de cada tipus de variant observada en cada individu dins del mateix grup i les barres d'error mostren el rang de valors. WT dia 12 PBS n=4, WT dia 12 dCtd + dThd n=4, WT dia 29 PBS n=4, WT dia 29 dCtd + dThd n=4, KO dia 12 PBS n=6, KO dia dCtd + dThd n=6, KO dia dCtd + dThd n=6.

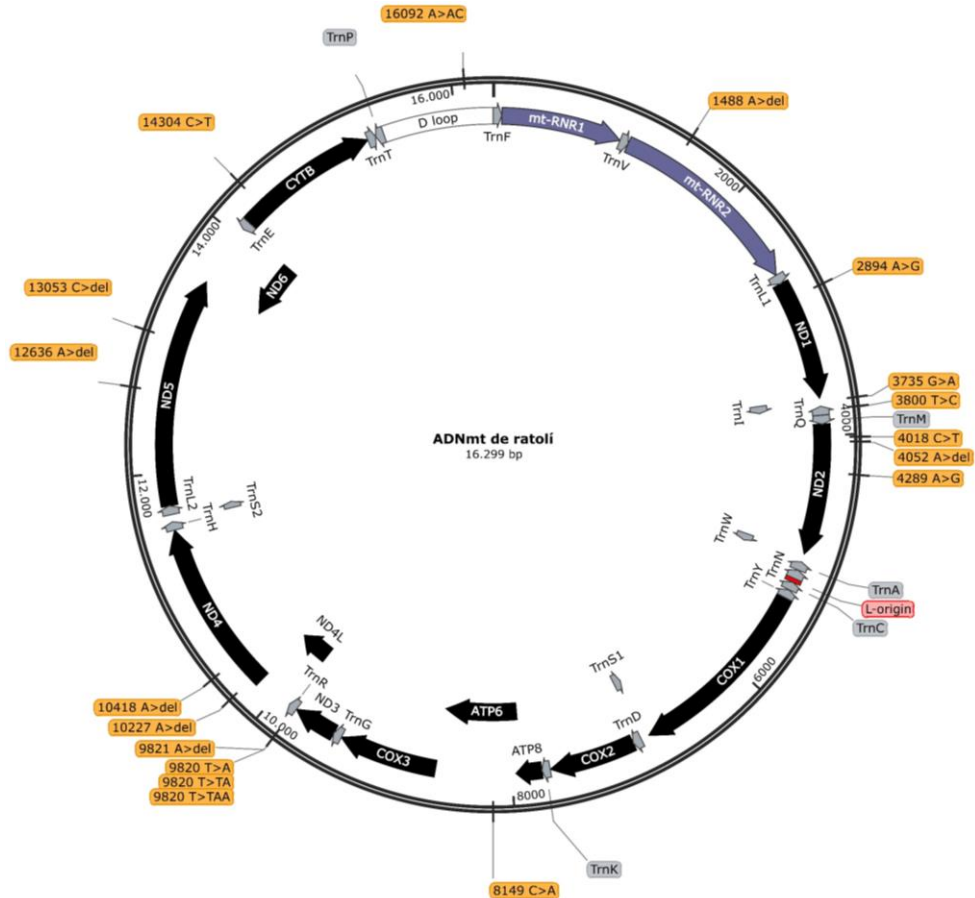


Figura 5.29. Distribució en l'ADNmt de totes les variants trobades en mostres de múscul esquelètic en ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Representació de totes les variants trobades sobre l'ADNmt (en taronja) amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en totes les mostres analitzades de múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) en ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. En negre s'indiquen els gens codificants de subunitats del sistema OXPHOS, en blau fosc s'indiquen els gens codificants d'ARNr i en gris s'identifiquen els gens codificants d'ARNt. Abreviacions: TRNF: ARNt fenilalanina, RNR1: RNAr 12S, TRNV: ARNt valina, RNR2: RNAr 16S, TRNL1: ARNt leucina 1, ND1: NADH deshidrogenasa 1, TRNI: ARNt isoleucina, TRNQ: ARNt glutamina, TRNM: ARNt metionina, ND2: NADH deshidrogenasa 2, TRNW: ARNt triptòfan, TRNA: ARNt alanina, TRNN: ARNt asparagina, TRNC: ARNt cisteïna, TRNY: ARNt tirosina, COX1: citocrom c oxidasa I, TRNS1: ARNt serina 1, TRND: ARNt àcid aspàrtic, COX2: citocrom c oxidasa II, TRNK: ARNt lisina, ATP8: ATP sintetasa 8, ATP6: ATP sintetasa 6, COX3: citocrom C oxidasa III, TRNG: ARNt glicina, ND3: NADH deshidrogenasa 3, TRNR: ARNt arginina, ND4L: NADH deshidrogenasa 4L, ND4: NADH deshidrogenasa 4, TRNH: ARNt histidina, TRNS2: ARNt serina 2, TRNL2: ARNt leucina 2, ND5: NADH deshidrogenasa 5, ND6: NADH deshidrogenasa 6, TRNE: ARNt àcid glutàmic, CYTB: citocrom b, TRNT: ARNt treonina, TRNP: ARNt prolina. Imatge generada amb SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

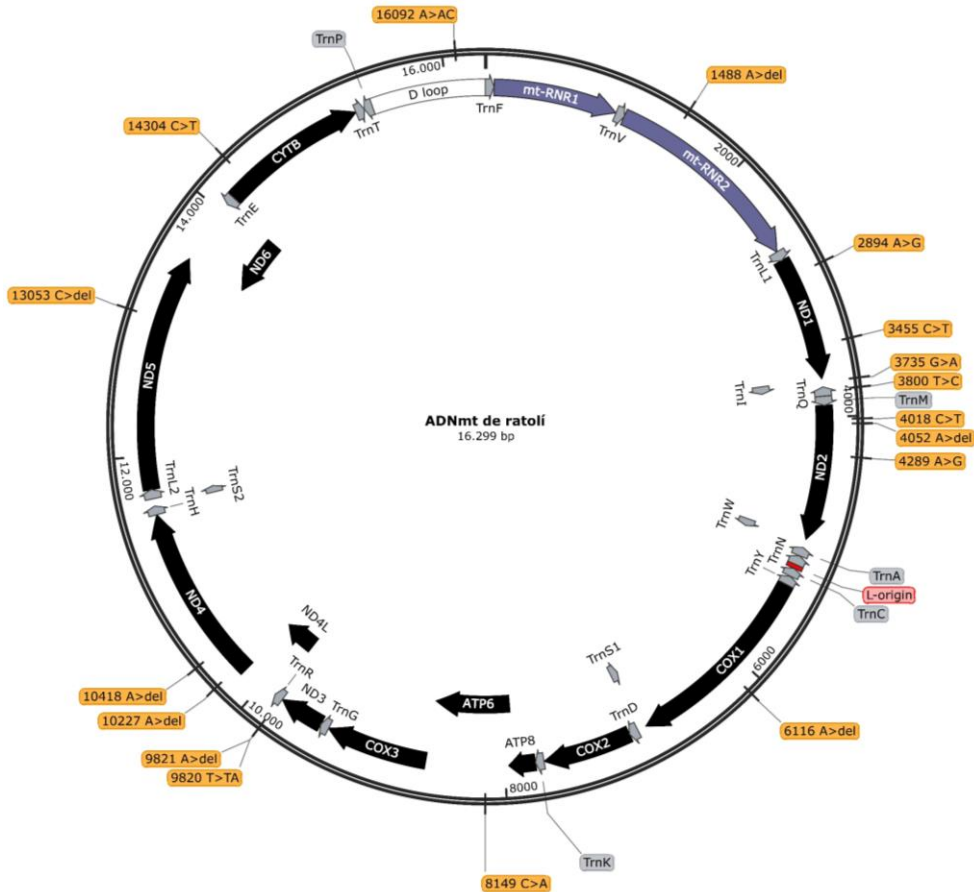


Figura 5.30. Distribució en l'ADNmt de totes les variants trobades en mostres de fetge en ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Representació de totes les variants trobades sobre l'ADNmt (en taronja) amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en totes les mostres analitzades de fetge en ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. En negre s'indiquen els gens codificants de subunitats del sistema OXPHOS, en blau fosc s'indiquen els gens codificants d'ARNr i en gris s'identifiquen els gens codificants d'ARNt. Abreviacions: TRNF: ARNt fenilalanina, RNR1: RNAr 12S, TRNV: ARNt valina, RNR2: RNAr 16S, TRNL1: ARNt leucina 1, ND1: NADH deshidrogenasa 1, TRNI: ARNt isoleucina, TRNQ: ARNt glutamina, TRNM: ARNt metionina, ND2: NADH deshidrogenasa 2, TRNW: ARNt triptòfan, TRNA: ARNt alanina, TRNN: ARNt asparagina, TRNC: ARNt cisteïna, TRNY: ARNt tirosina, COX1: citocrom c oxidasa I, TRNS1: ARNt serina 1, TRND: ARNt àcid aspàrtic, COX2: citocrom c oxidasa II, TRNK: ARNt lisina, ATP8: ATP sintetasa 8, ATP6: ATP sintetasa 6, COX3: citocrom C oxidasa III, TRNG: ARNt glicina, ND3: NADH deshidrogenasa 3, TRNR: ARNt arginina, ND4L: NADH deshidrogenasa 4L, ND4: NADH deshidrogenasa 4, TRNH: ARNt histidina, TRNS2: ARNt serina 2, TRNL2: ARNt leucina 2, ND5: NADH deshidrogenasa 5, ND6: NADH deshidrogenasa 6, TRNE: ARNt àcid glutàmic, CYTB: citocrom b, TRNT: ARNt treonina, TRNP: ARNt prolina. Imatge generada amb SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

Complementàriament, es va estudiar si el tractament amb dCtd + dThd podia estar induint mutacions sobre posicions que presentaven una variant preexistent en l'animal, de manera que poguessin alterar el seu grau d'heteroplàsmia. Per aquest motiu, es va estudiar el percentatge d'heteroplàsmia de les variants trobades. Com que en aquest cas no es podia comparar el grau d'heteroplàsmia del mateix ratolí abans i després de rebre el tractament (ja que el disseny experimental no ho permet) es va comparar el grau d'heteroplàsmia de determinades posicions entre els diferents grups d'animals estudiats, atès que aquests individus són molt homogenis genèticament. El criteri per incloure una variant en aquesta anàlisi va ser que la variant estigués present en els dos òrgans estudiats i en almenys el 50% de tots els individus de cada grup estudiat. Del total de variants trobades (18 variants diferents en totes les mostres de múscul esquelètic i 17 variants diferents en totes les mostres de fetge) només 4 van complir aquest criteri: 4052 A>del, 9821 A>del, 10227 A>del i 10418 A>del. (Taula 5.3 i Taula 5.4).

L'anàlisi de les 4 variants altament presents en tots els grups estudiats (4052 A>del, 9821 A>del, 10227 A>del i 10418 A>del) va revelar que el seu grau d'heteroplàsmia mantenia uns nivells similars en múscul esquelètic (Figura 5.31 a) i fetge (Figura 5.31 b) en tots els individus de tots els grups analitzats, indicant que cap de les condicions estudiades (genotip del ratolí ($Tk2^{+/+}$ o $Tk2^{-/-}$), presència o absència de tractament (PBS o dCtd + dThd) i temps d'exposició a aquest (8 o 25 dies)) alterava el grau d'heteroplàsmia i per tant no s'indueixen mutacions sobre posicions amb variants preexistents en la mostra.

Taula 5.3. Total de variants trobades en mostres de múscul esquelètic de ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Llistat de totes les variants trobades (18) sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en el total de mostres de múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. El nombre indica la quantitat de ratolins dins de cada grup que tenen aquella mutació i entre parèntesis s'indica el percentatge d'animals dins de cada grup que té aquella variant respecte al total d'animals d'aquell grup. WT dia 12 PBS n=4, WT dia 12 dCtd + dThd n=4, WT dia 29 PBS n=4, WT dia 29 dCtd + dThd n=4, KO dia 12 PBS n=6, KO dia 12 dCtd + dThd n=6, KO dia 29 dCtd + dThd n=6. En roig estan marcades les 4 posicions amb mutacions que estan presents en almenys el 50% d'individus dins de cada grup.

Variant	WT dia 12 PBS	WT dia 12 dCtd + dThd	WT dia 29 PBS	WT dia 29 dCtd + dThd	KO dia 12 PBS	KO dia 12 dCtd + dThd	KO dia 29 dCtd + dThd
1488 A>del	2 (50%)	4 (100%)	3 (75%)	2 (50%)	2 (33%)	2 (33%)	4 (67%)
2894 A>G	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3735 G>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)
3800 T>C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)
4018 C>T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
4052 A>del	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
4289 A>G	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (50%)	0 (0%)	1 (17%)
8149 C>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
9820 T>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)
9820 T>TA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
9820 T>TAA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
9821 A>del	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (67%)	6 (100%)	6 (100%)
10227 A>del	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	3 (75%)	5 (83%)	6 (100%)	5 (83%)
10418 A>del	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	3 (75%)	5 (83%)	6 (100%)	5 (83%)
12636 A>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)
13053 C>del	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)
14304 C>T	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
16092 A>AC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)

Taula 5.4. Total de variants trobades en mostres de fetge de ratolins WT i KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Llistat de totes les variants trobades (17) sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en el total de mostres de fetge de ratolins Tk2^{+/+} (WT) o Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. El nombre indica la quantitat de ratolins dins de cada grup que tenen aquella mutació i entre parèntesis s'indica el percentatge d'animals dins de cada grup que té aquella variant respecte al total d'animals d'aquell grup. WT dia 12 PBS n=4, WT dia 12 dCtd + dThd n=4, WT dia 29 PBS n=4, WT dia 29 dCtd + dThd n=4, KO dia 12 PBS n=6, KO dia 12 dCtd + dThd n=6, KO dia 29 dCtd + dThd n=6. En roig estan marcades les 4 posicions amb mutacions que estan presents en almenys el 50% d'individus dins de cada grup.

Variant	WT dia 12 PBS	WT dia 12 dCtd + dThd	WT dia 29 PBS	WT dia 29 dCtd + dThd	KO dia 12 PBS	KO dia 12 dCtd + dThd	KO dia 29 dCtd + dThd
1488 A>del	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (50%)	4 (67%)	4 (67%)
2894 A>G	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3455 C>T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)
3735 G>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (67%)	0 (0%)
3800 T>C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)
4018 C>T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
4052 A>del	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
4289 A>G	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	1 (17%)	4 (67%)	1 (17%)
6116 A>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)
8149 C>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
9820 T>TA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)
9821 A>del	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	6 (100%)	5 (83%)	5 (83%)
10227 A>del	2 (50%)	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	5 (83%)	6 (100%)	3 (50%)
10418 A>del	3 (75%)	4 (100%)	2 (50%)	4 (100%)	6 (100%)	5 (83%)	5 (83%)
13053 C>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)
14304 C>T	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
16092 A>AC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)

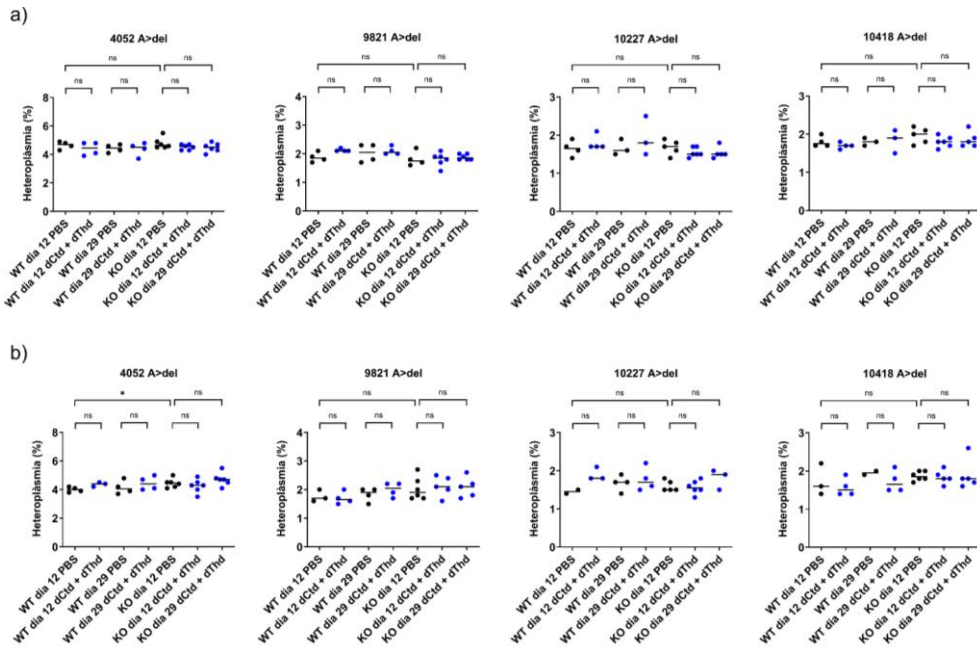


Figura 5.31. Grau d'heteroplàsmia de les 4 mutacions sobre l'ADNmt altament presents en els ratolins WT i KO per *Tk2* tractats amb PBS o dCtd + dThd. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions sobre l'ADNmt en mostres de múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) (a) i fetge (b) de ratolins *Tk2*^{+/+} (WT) o *Tk2*^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat per via oral amb PBS (negre) o dCtd + dThd (blau) a una dosi de 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. *p<0.05, ns: no significatiu.

Finalment, es va comparar el grau d'heteroplàsmia de totes les variants trobades en un mateix ratolí en els dos teixits estudiats (múscul esquelètic i fetge). Aquesta comparació va permetre veure que el grau d'heteroplàsmia de les variants era similar en els dos teixits estudiats, tant en ratolins *Tk2*^{+/+} (Figura Suplementària 14) com *Tk2*^{-/-} (Figura Suplementària 15) i tant si aquests havien estat tractats amb PBS o dCtd + dThd durant 8 dies o 25 dies, recolzant la idea de que el tractament no estava afectant mutacions ja presents en els ratolins i per tant no alterant la seva heteroplàsmia. Per l'anàlisi de les mutacions que no apareixien en els dos teixits, es va utilitzar el mateix procediment que es detalla al final de la Secció 5.2.1.1: quan una variant no apareixia en algun teixit, se li va atribuir un grau d'heteroplàsmia del 0% o del 100%, segons la situació (mirant la presència o absència de la variant sobre el nombre total de lectures per comprovar que aquesta assumptió era real).

En conjunt, les anàlisis de la presència de deleccions múltiples, el nombre de variants, el tipus de variant, la distribució d'aquestes al llarg del genoma mitocondrial i els seus graus d'heteroplàsmia entre grups experimentals i teixits indiquen que ni el genotip (*Tk2*^{+/+} o *Tk2*^{-/-}), ni el tractament (dCtd + dThd), ni el temps d'exposició a aquest (8 o 25 dies) afecten de forma diferencial a la integritat ni a la fidelitat de còpia de l'ADNmt. Tot plegat, indica que el dèficit de TK2 no resulta mutagènic sobre l'ADNmt en els ratolins a les edats estudiades i apunta a la seguretat gènica del tractament amb dCtd + dThd a la dosi emprada.

5.2.2.2. Model de ratolí KO per *Dguok*

El possible efecte mutagènic del tractament amb dAdo + dGuo sobre l'ADNmt va ser estudiat també en ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} que havien estat tractats diàriament (excepte caps de setmana) des del dia 8 d'edat fins les 6 setmanes d'edat per via oral amb una dosi de 200 mg/kg/dia de dAdo + dGuo o PBS (Secció 4.1.3).

La PCR llarga sobre l'ADNmt va mostrar que el ratolí *Dguok*^{-/-} no tenia deleccions múltiples ni en fetge ni en cervell (Figura 5.32) quan es tractava amb PBS i tampoc el grup de ratolins *Dguok*^{+/+}, indicant que la falta de dGK en aquest model de ratolí no causa deleccions múltiples sobre l'ADNmt en aquests dos òrgans a aquesta edat. A més, quan els ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} van ser tractats amb dAdo + dGuo tampoc es van induir deleccions múltiples en cap dels dos òrgans estudiats (Figura 5.32).

Mitjançant seqüenciació massiva de l'ADNmt es va veure que, en ratolins tractats amb vehicle, el nombre de variants no homoplàsmiques sobre l'ADNmt (variants amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99%) respecte la seqüència de referència en fetge de ratolins *Dguok*^{+/+} era inferior a la dels ratolins *Dguok*^{-/-} (Figura 5.33), fet que podria indicar que el dèficit de dGK pot tenir un efecte mutagènic en aquest òrgan. Cal tenir en compte, però, que la magnitud de la diferència és molt discreta i que aquests ratolins presenten una profunda depleció sobre l'ADNmt (Secció 5.1.2.1) fet que pot esbiaixar el nombre de variants trobades. El cervell dels animals *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS, per contra, va mostrar un nombre similar de canvis (Figura 5.33), indicant que el dèficit de dGK no sembla tenir un efecte mutagènic sobre l'ADNmt en cervell. Per altra banda, la comparació del nombre de variants entre el grup de ratolins *Dguok*^{+/+} tractat amb PBS o amb dAdo + dGuo no va revelar cap

diferència en cap dels dos òrgans estudiats i aquesta absència d'efecte també es va veure en els ratolins *Dguok*^{-/-}, apuntant a la seguretat gènica d'aquest tractament.

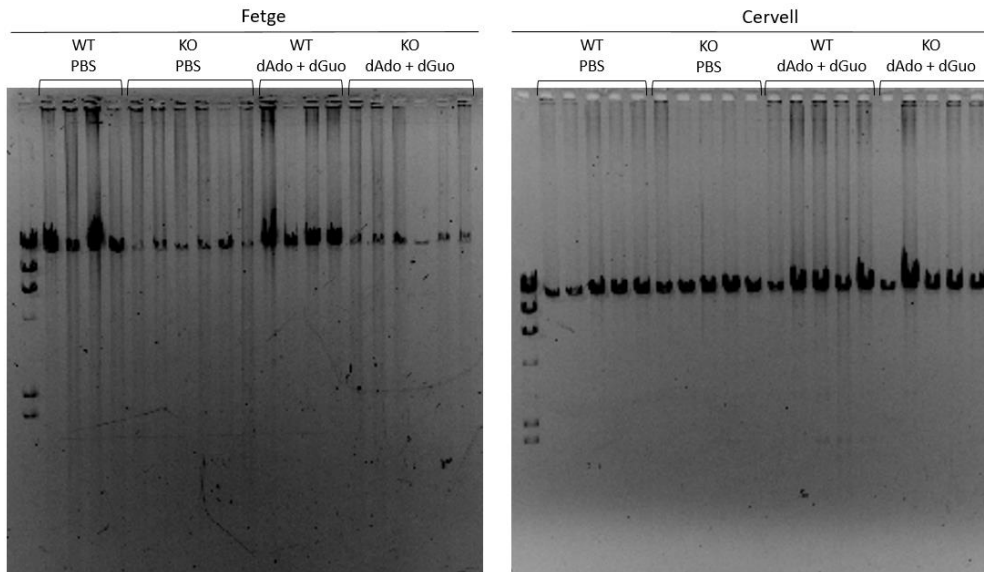


Figura 5.32. PCR llarga de mostres d'ADNmt de ratolí WT i KO per Dguok. Gel d'agarosa que mostra el producte de la PCR llarga on s'amplifica quasi tot l'ADNmt en una selecció representativa de mostres de fetge i cervell de ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) tractats diàriament per sonda oral amb PBS o amb una dosi de 200 mg/kg/dia de dAdo + dGuo a partir del dia 8 d'edat fins a 6 setmanes d'edat. Carrils de l'esquerra: marcador de pes molecular λ DNA/HindIII.

La distribució del tipus de mutació (delecció, inserció, transició o transversió) en els diferents grups de ratolins estudiats (*Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS o dAdo + dGuo) va ser quasi igual en fetge i cervell (Figura 5.34) i el tipus de variant més freqüent en tots els grups van ser les deleccions d'un nucleòtid. A més, no es va veure un patró diferent en la distribució del tipus de mutació entre ratolins tractats amb PBS i ratolins tractats amb la combinació de dAdo + dGuo o entre ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} (Figura 5.34).

Adicionalment, quan es va estudiar la distribució de totes les mutacions trobades en tots els ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS o dAdo + dGuo es va veure que les variants estaven distribuïdes al llarg de tot el genoma mitocondrial sense estar concentrades en cap regió especialment susceptible (Figura 5.35 i Figura 5.36).

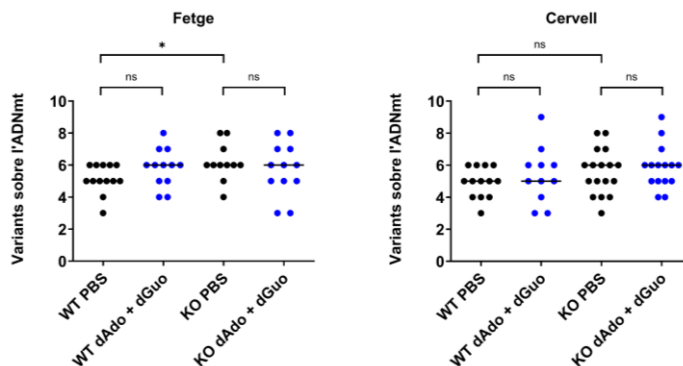


Figura 5.33. Nombre de variants sobre l'ADNmt en ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Nombre de variants sobre l'ADNmt trobades respecte la seqüència de referència amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i 99% en fetge i cervell en ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) tractats diàriament per sonda oral amb PBS (negre) o amb una dosi de 200 mg/kg/dia de dAdo + dGuo (blau) a partir del dia 8 d'edat fins a 6 setmanes d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ns: no significatiu.

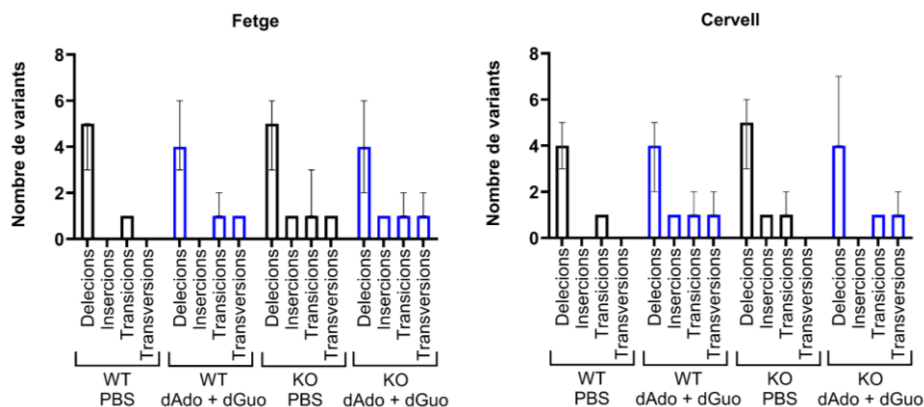


Figura 5.34. Tipus de mutació trobada en els ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Distribució per tipus de mutació (deleccions, insercions, transicions o transversions) de les variants sobre l'ADNmt trobades en cada grup de ratolins estudiats. En negre estan marcades les variants corresponents a animals tractats amb PBS i en blau les variants corresponents a animals tractats amb dAdo + dGuo. Les barres mostren la mediana de variants de cada individu dins de cada grup i les barres d'error mostren el rang de valors. WT PBS fetge $n=13$, WT dAdo + dGuo fetge $n=12$, KO PBS fetge $n=11$, KO dAdo + dGuo fetge $n=12$, WT PBS cervell $n=13$, WT dAdo + dGuo cervell $n=11$, KO PBS cervell $n=17$, KO dAdo + dGuo cervell $n=15$.

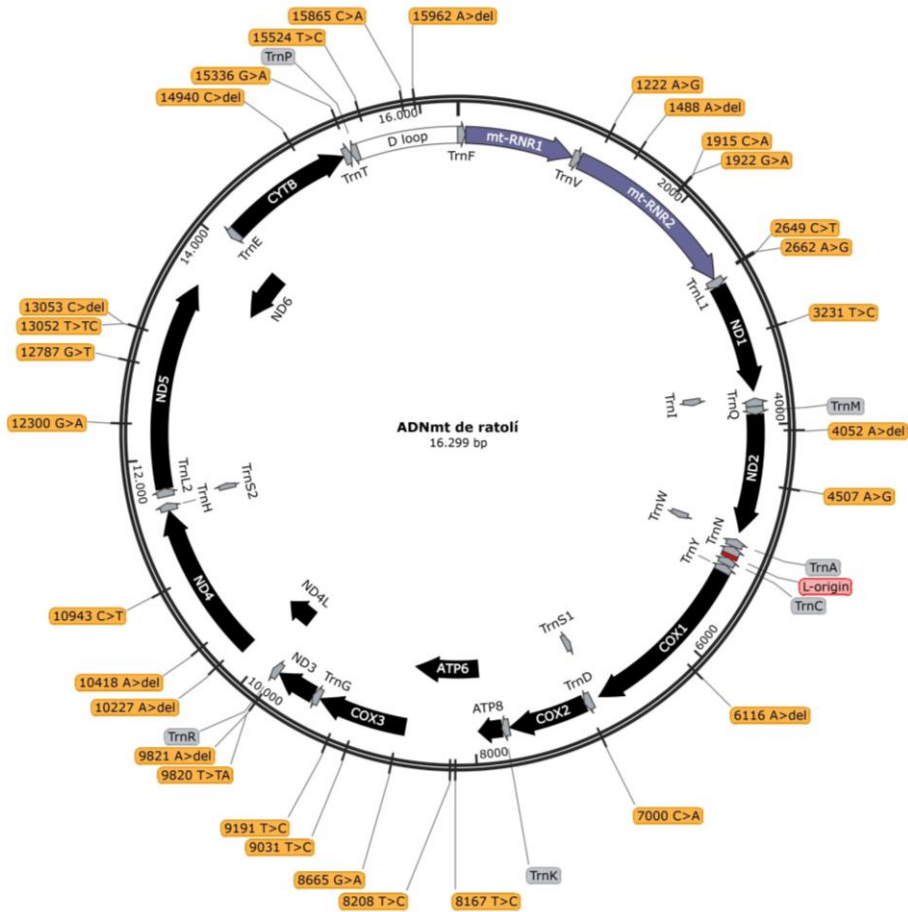


Figura 5.35. Distribució en l'ADNmt de totes les variants trobades en mostres de fetge en ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Representació de totes les variants trobades sobre l'ADNmt (en taronja) amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en totes les mostres de fetge en ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS o dAdo + dGuo 200 mg/kg/dia fins a les 6 setmanes d'edat. En negre s'indiquen els gens codificants de subunitats del sistema OXPHOS, en blau fosc s'indiquen els gens codificants d'ARNr i en gris s'identifiquen els gens codificants d'ARNt. Abreviacions: TRNF: ARNt fenilalanina, RNR1: RNAr 12S, TRNV: ARNt valina, RNR2: RNAr 16S, TRNL1: ARNt leucina 1, ND1: NADH deshidrogenasa 1, TRNI: ARNt isoleucina, TRNQ: ARNt glutamina, TRNM: ARNt metionina, ND2: NADH deshidrogenasa 2, TRNW: ARNt triptòfan, TRNA: ARNt alanina, TRNN: ARNt asparagina, TRNC: ARNt cisteïna, TRNY: ARNt tirosina, COX1: citocrom c oxidasa I, TRNS1: ARNt serina 1, TRND: ARNt àcid aspàrtic, COX2: citocrom c oxidasa II, TRNK: ARNt lisina, ATP8: ATP sintetasa 8, ATP6: ATP sintetasa 6, COX3: citocrom C oxidasa III, TRNG: ARNt glicina, ND3: NADH deshidrogenasa 3, TRNR: ARNt arginina, ND4L: NADH deshidrogenasa 4L, ND4: NADH deshidrogenasa 4, TRNH: ARNt histidina, TRNS2: ARNt serina 2, TRNL2: ARNt leucina 2, ND5: NADH deshidrogenasa 5, ND6: NADH deshidrogenasa 6, TRNE: ARNt àcid glutàmic, CYTB: citocrom b, TRNT: ARNt treonina, TRNP: ARNt prolina. Imatge generada amb SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

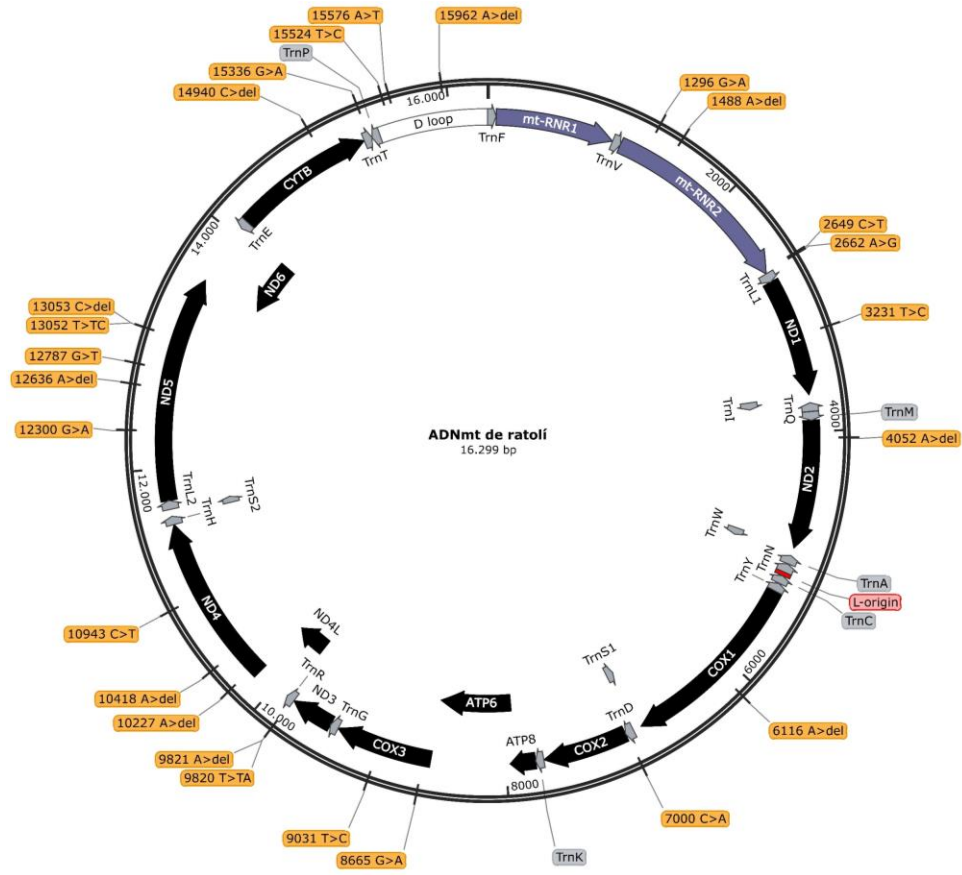


Figura 5.36. Distribució en l'ADNmt de totes les variants trobades en mostres de cervell en ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Representació de totes les variants trobades sobre l'ADNmt (en taronja) amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en totes les mostres de cervell en ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS o dAdo + dGuo 200 mg/kg/dia fins a les 6 setmanes d'edat. En negre s'indiquen els gens codificants de subunitats del sistema OXPHOS, en blau fosc s'indiquen els gens codificants d'ARNr i en gris s'identifiquen els gens codificants d'ARNt. Abreviacions: TRNF: ARNt fenilalanina, RNR1: RNAr 12S, TRNV: ARNt valina, RNR2: RNAr 16S, TRNL1: ARNt leucina 1, ND1: NADH deshidrogenasa 1, TRNI: ARNt isoleucina, TRNQ: ARNt glutamina, TRNM: ARNt metionina, ND2: NADH deshidrogenasa 2, TRNW: ARNt triptòfan, TRNA: ARNt alanina, TRNN: ARNt asparagina, TRNC: ARNt cisteïna, TRNY: ARNt tirosina, COX1: citocrom c oxidasa I, TRNS1: ARNt serina 1, TRND: ARNt àcid aspàrtic, COX2: citocrom c oxidasa II, TRNK: ARNt lisina, ATP8: ATP sintetasa 8, ATP6: ATP sintetasa 6, COX3: citocrom C oxidasa III, TRNG: ARNt glicina, ND3: NADH deshidrogenasa 3, TRNR: ARNt arginina, ND4L: NADH deshidrogenasa 4L, ND4: NADH deshidrogenasa 4, TRNH: ARNt histidina, TRNS2: ARNt serina 2, TRNL2: ARNt leucina 2, ND5: NADH deshidrogenasa 5, ND6: NADH deshidrogenasa 6, TRNE: ARNt àcid glutàmic, CYTB: citocrom b, TRNT: ARNt treonina, TRNP: ARNt prolina. Imatge generada amb SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

Amb l'objectiu de veure si el tractament amb dAdo + dGuo podia estar provocant mutacions sobre posicions que ja presentaven una variant preexistent en la mostra i alterar d'aquesta manera el seu grau d'heteroplàsmia, es va estudiar el percentatge de les variants altament presents en la població dels ratolins estudiats. El criteri per definir una variant com a altament present i incloure-la en aquest estudi va ser el mateix que el que es va seguir en els ratolins *Tk2*^{+/+} i *Tk2*^{-/-} tractats amb PBS o dCtd + dThd (Secció 5.2.2.1), és a dir, que la variant estigués present en els dos òrgans estudiats (fetge i cervell) i en almenys el 50% de tots els individus de cada grup estudiat. Del total de variants trobades (31 variants en totes les mostres de fetge i 25 variants en totes les mostres de cervell) només 4 van complir aquest criteri (4052 A>del, 9821 A>del, 10227 A>del i 10418 A>del) (Taula 5.5 i Taula 5.6) que van ser les mateixes que es van trobar en el grup de ratolins WT i KO per *Tk2* (Taula 5.3 i Taula 5.4).

Quan es va analitzar el grau d'heteroplàsmia de les 4 variants altament presents en tots els grups de ratolins estudiats es va veure que aquest era similar tant en els ratolins *Dguok*^{+/+} com en els *Dguok*^{-/-} i en els ratolins tractats amb PBS o amb dAdo + dGuo en fetge (Figura 5.37 a) o cervell (Figura 5.37 b), indicant que el tractament no estava induint mutacions sobre variants ja presents en els individus estudiats. Només es van trobar canvis en el grau d'heteroplàsmia en dues posicions en cervell (9821 A>del i 10227 A>del) en animals *Dguok*^{+/+} tractats, tot i que el canvi en el percentatge d'heteroplàsmia va resultar molt lleu.

Taula 5.5. Total de variants trobades en mostres de fetge de ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Llistat de totes les variants trobades (31) sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en el total de mostres de fetge de ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS o dAdo/dGuo 200 mg/kg/dia fins 6 setmanes d'edat. El nombre indica la quantitat de ratolins dins de cada grup que tenen aquella mutació i entre parèntesi s'indica el percentatge d'animals dins de cada grup que té aquella variant respecte al total d'animals dins de cada grup. WT PBS n=13, WT dAdo + dGuo n=12, KO PBS n=11, KO dAdo + dGuo n=12. En roig estan marcades les 4 posicions amb mutacions que estan presents en almenys el 50% d'individus dins de cada grup.

Variant	WT PBS	WT dAdo+dGuo	KO PBS	KO dAdo+dGuo
1222 A>G	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
1488 A>del	8 (62%)	4 (33%)	8 (73%)	7 (58%)
1915 C>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
1922 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
2649 C>T	2 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2662 A>G	0 (0%)	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)
3231 T>C	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4052 A>del	13 (100%)	12 (100%)	11 (100%)	12 (100%)
4507 A>G	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)
6116 A>del	0 (0%)	0 (0%)	2 (18%)	1 (8%)
7000 C>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)
8167 T>C	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
8208 T>C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)
8665 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
9031 T>C	3 (23%)	8 (67%)	1 (9%)	8 (67%)
9191 T>C	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
9820 T>TA	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	1 (8%)
9821A>del	12 (92%)	12 (100%)	11 (100%)	11 (92%)
10227 A>del	12 (92%)	12 (100%)	7 (64%)	7 (58%)
10418 A>del	12 (92%)	10 (83%)	10 (91%)	7 (58%)
10943 C>T	0 (0%)	2 (17%)	0 (0%)	0 (0%)
12300 G>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (17%)
12787 G>T	0 (0%)	6 (50%)	0 (0%)	6 (50%)
13052 T>TC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)
13053 C>del	2 (15%)	1 (8%)	2 (18%)	2 (17%)
14940 C>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8%)
15336 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
15524 T>C	2 (15%)	1 (8%)	5 (45%)	1 (8%)
15865 C>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)
15962 A>del	0 (0%)	0 (0%)	2 (18%)	0 (0%)

Taula 5.6. Total de variants trobades en mostres de cervell de ratolins WT i KO per Dguok tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Llistat de totes les variants trobades (25) sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en el total de mostres de cervell de ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS o dAdo + dGuo 200 mg/kg/dia fins 6 setmanes d'edat. El nombre indica la quantitat de ratolins dins de cada grup que tenen aquella mutació i entre parèntesi s'indica el percentatge d'animals dins de cada grup que té aquella variant respecte al total d'animals dins de cada grup. WT PBS n=13, WT dAdo + dGuo n=11, KO PBS n=17, KO dAdo + dGuo n=15. En roig estan marcades les 4 posicions amb mutacions que estan presents en almenys el 50% d'individus dins de cada grup.

Variant	WT PBS	WT dAdo+dGuo	KO PBS	KO dAdo+dGuo
1296 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)
1488 A>del	4 (31%)	6 (55%)	12 (71%)	7 (47%)
2649 C>T	2 (15%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)
2662 A>G	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
3231 T>C	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4052 A>del	13 (100%)	11 (100%)	17 (100%)	15 (100%)
6116 A>del	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7000 C>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
8665 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)
9031 T>C	3 (23%)	6 (55%)	2 (12%)	7 (47%)
9820 T>TA	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
9821A>del	13 (100%)	11 (100%)	17 (100%)	14 (93%)
10227 A>del	11 (85%)	8 (73%)	14 (82%)	14 (93%)
10418 A>del	12 (92%)	7 (64%)	15 (88%)	13 (87%)
10943 C>T	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
12300 G>A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13%)
12636 A>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
12787 G>T	0 (0%)	4 (36%)	0 (0%)	6 (40%)
13052 T>TC	0 (0%)	0 (0%)	2 (12%)	0 (0%)
13053 C>del	1 (8%)	0 (0%)	2 (12%)	4 (27%)
14940 C>del	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
15336 G>A	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)
15524 T>C	2 (15%)	1 (9%)	8 (47%)	3 (20%)
15576 A>T	0 (0%)	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)
15962 A>del	0 (0%)	0 (0%)	2 (12%)	0 (0%)

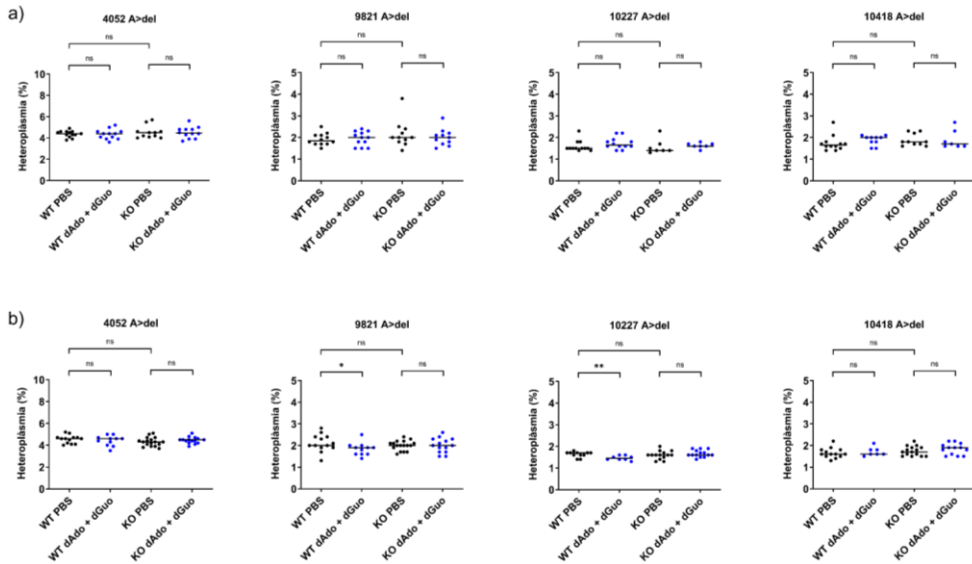


Figura 5.37. Grau d'heteroplàsmia de les 4 mutacions sobre l'ADNmt altament presents en els ratolins WT i KO per *Dguok* tractats amb PBS o dAdo + dGuo. Grau d'heteroplàsmia de les 4 mutacions sobre l'ADNmt altament presents en tots els grups estudiats en mostres de fetge (a) i cervell (b) de ratolins *Dguok*^{+/+} (WT) i *Dguok*^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat per via oral amb PBS (negre) o dAdo + dGuo (blau) a una dosi de 200 mg/kg/dia fins a les 6 setmanes d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Test estadístic: Mann-Whitney. **p*<0.05, ***p*<0.005, ns: no significatiu.

Curiosament, es van trobar 3 variants més presents en ambdós òrgans en alguns dels 4 grups estudiats però no en tots (Taula 5.5 i Taula 5.6). En concret, aquestes mutacions van ser les següents: 9031 T>C, 12787 G>T i 15524 T>C. La mutació 9031 T>C estava altament present tant en el grup de ratolins *Dguok*^{+/+} com *Dguok*^{-/-} tractats amb dAdo + dGuo, però estava molt poc present en els ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS (Taula 5.5 i Taula 5.6). A més, la representació del grau d'heteroplàsmia de la variant dins de cada grup de ratolins estudiat mostrava percentatges més alts en els ratolins tractats amb dAdo + dGuo que en els tractats amb PBS (Figura 5.38 a i Figura 5.38 b). La mutació 12787 G>T només estava present en el grup de ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb dAdo + dGuo (Figura 5.38), però estava absent en el grup de ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS (Taula 5.5 i Taula 5.6). Per contra, la variant 15524 T>C estava més representada en ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} tractats amb PBS (Taula 5.5 i Taula 5.6), encara que el seu grau d'heteroplàsmia va

ser similar a l'observat en els pocs ratolins tractats amb dAdo + dGuo que tenien aquesta variant (Figura 5.38).

Aquests resultats, en un primer moment, semblarien indicar que el tractament amb dAdo + dGuo estaria induint mutacions sobre aquestes posicions i incrementant així el seu grau d'heteroplàsmia. Donat que el tractament amb dAdo + dGuo no té efecte sobre el nombre de còpies d'ADNmt (Secció 5.1.2.1), que quasi no incrementa els dNTPs en fetge (Secció 5.1.2.4) i que no els incrementa en el cervell (Secció 5.1.2.5) seria poc probable que induís mutacions sobre l'ADNmt i, per tant, es va explorar si aquestes diferències en els graus d'heteroplàsmia es devien a un efecte de ventrada.

En el cas de la mutació 9031 T>C es va veure que els ratolins (tant WT com KO) que van ser tractats amb dAdo + dGuo i que tenien un grau d'heteroplàsmia alt (superior al 25%) eren germans i a més eren els mateixos individus en el fetge i cervell. A més, els ratolins (tant WT com KO) tractats amb dAdo + dGuo que tenien un grau d'heteroplàsmia més baixos (inferiors al 10%) i similars al de ratolins tractats amb PBS eren germans entre ells, però cap d'aquests individus era germà del grup de ratolins que tenia aquesta variant amb un alt grau d'heteroplàsmia (Figura 5.38). A més, no totes les ventrades que havien estat tractades presentaven aquesta variant (Taula 5.5 i Taula 5.6), la qual cosa indica que la presència d'aquesta mutació, amb els seus diferents graus d'heteroplàsmia, és ventrada dependent.

Pel que fa a la variant 12787 G>T, es va veure que tots els ratolins WT i KO tractats amb dAdo + dGuo eren germans i venien majoritàriament de dues ventrades diferents, cap d'elles del grup tractat amb PBS (Figura 5.38). A més, la resta de ventrades que es van tractar amb dAdo + dGuo no presentaven aquest canvi (Taula 5.5 i Taula 5.6), recolzant la idea de que aquesta mutació estava associada a la ventrada i no al tractament.

La tercera variant diferencialment present en els grups estudiats, 15524 T>C, es va trobar en ratolins de la mateixa ventrada, però la resta de ratolins analitzats dins d'aquest grup i que no presentaven aquesta variant eren d'una altra ventrada (Figura 5.38), tot indicant que aquesta mutació era deguda a la presència de la variant en la ventrada.

Així doncs, l'anàlisi en profunditat de les 3 variants que estaven diferencialment presents en els grups estudiats va revelar que aquestes es devien a mutacions presents en la ventrada,

la qual cosa va en consonància amb el disseny experimental emprat en el qual es tractava tota la ventrada sencera amb el mateix tractament (PBS o dAdo + dGuo) introduint el possible biaix de mutacions presents en un grup de ratolins propers genèticament com són els ratolins germans de la mateixa ventrada.

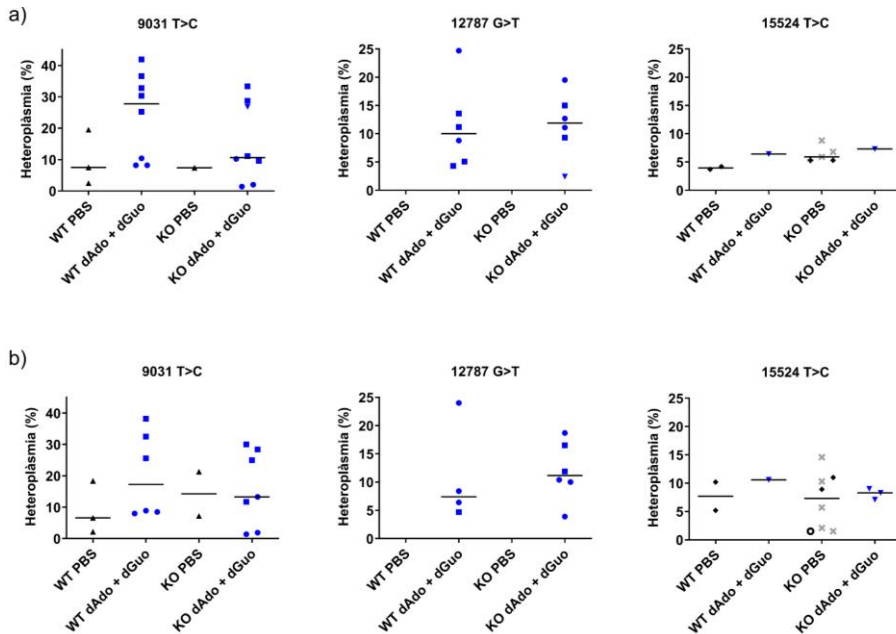


Figura 5.38. Grau d'heteroplàsmia de les 3 mutacions sobre l'ADNmt que presenten diferències entre ratolins tractats amb PBS o dAdo + dGuo en els ratolins WT i KO per Dguok. Grau d'heteroplàsmia de les 3 mutacions sobre l'ADNmt que estan presents en alguns dels grups estudiats en mostres de fetge (a) i cervell (b) de ratolins Dguok^{+/+} (WT) i Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat per via oral amb PBS (negre) o dAdo + dGuo (blau) a una dosi de 200 mg/kg/dia fins a les 6 setmanes d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia horitzontal a la mediana del grup. Els individus de la mateixa ventrada estan representats amb el mateix símbol.

Finalment, en els ratolins en els que es va poder seqüenciar tant l'ADNmt de fetge com de cervell es va comparar el grau d'heteroplàsmia de les variants trobades en els dos teixits. Per l'anàlisi de les variants que no apareixien en els dos teixits es va utilitzar el mateix procediment que es detalla al final de la Secció 5.2.1.1: quan una variant no apareixia en algun teixit, se li va atribuir un grau d'heteroplàsmia del 0% o del 100%, segons la situació (mirant la presència o absència de la variant sobre el nombre total de lectures per comprovar que aquesta assumpció era real). Aquesta anàlisi va mostrar que cada individu del grup d'animals WT tractats amb PBS (Figura Suplementària 16) o tractats amb dAdo + dGuo

(Figura Suplementària 17) i cada individu del grup d'animals KO tractats amb PBS (Figura Suplementària 18) o amb dAdo + dGuo (Figura Suplementària 19) tenien les mateixes variants en els dos teixits amb un nivell d'heteroplàsmia molt similar, excepte un ratolí WT (WT18) tractat amb dAdo + dGuo que va mostrar diferències estadísticament significatives en el grau d'heteroplàsmia entre els dos teixits (Figura Suplementària 17). Així doncs, aquestes dades indiquen que ni el genotip ni el tractament afecten de forma diferencial a la freqüència de les variants de l'ADNmt en cada individu en els dos òrgans estudiats.

En conjunt, les anàlisis sobre la presència de delecions múltiples sobre l'ADNmt en mostres de fetge i cervell de ratolins KO per *Dguok* tractats amb PBS o amb dAdo + dGuo, juntament amb les anàlisis de les variants reportades mitjançant seqüenciació massiva, que va permetre estudiar el nombre de variants en cada grup, el tipus de variants, la seva distribució al llarg de la molècula d'ADNmt, els seus graus d'heteroplàsmia entre grups experimentals i entre teixits del mateix ratolí va revelar que cap de les condicions estudiades induïa inestabilitat genòmica sobre l'ADNmt. Així doncs, ni la falta de *Dguok* ni el tractament amb dAdo + dGuo per via oral a la dosi emprada tenen un efecte genotòxic sobre l'ADNmt en els teixits estudiats d'aquest model de ratolí.

5.2.3. Seguretat gènica del tractament amb dNs estudiada en sang de pacients amb dèficit de TK2

5.2.3.1. Estudi de l'ADNmt

Per tal d'estudiar la possible genotoxicitat del tractament amb dCtd + dThd en pacients amb dèficit de TK2 es va analitzar la presència de delecions múltiples sobre l'ADNmt i el nombre de variants en l'ADNmt en mostres de sang de controls sans, mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 no tractats i mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 tractats diàriament per via oral amb dCtd + dThd (Taula 4.2).

La PCR llarga va amplificar una única molècula amb la mida esperada d'ADNmt íntegre tant en mostres d'ADN de sang de controls sans com en mostres d'ADN de sang de pacients amb dèficit de TK2 que no rebien tractament, cosa que indica que la malaltia de dèficit de TK2 no cursa amb delecions múltiples sobre l'ADNmt en sang (Figura 5.39). A més, l'ADN de sang de pacients amb dèficit de TK2 que rebien tractament amb dCtd + dThd tampoc mostrava

delecions múltiples (Figura 5.39), indicant que el tractament no tenia aquest tipus de genotoxicitat.

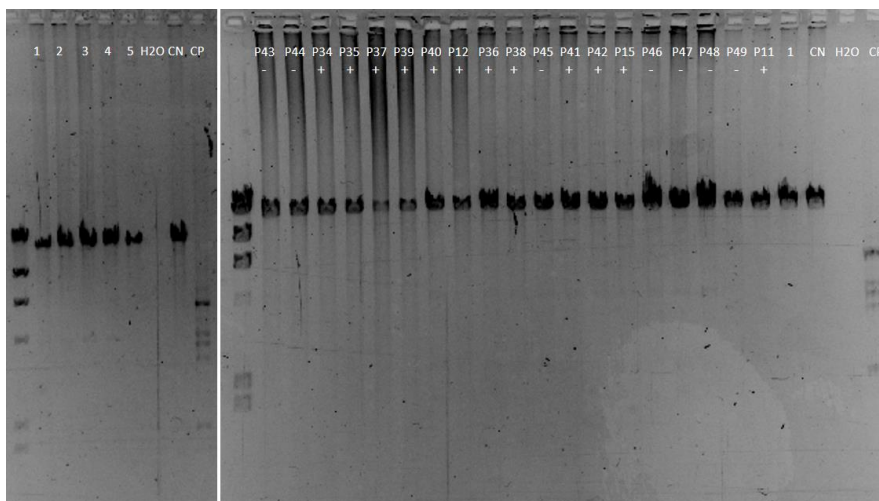


Figura 5.39. PCR llarga de mostres d'ADNmt obtingut de sang de controls sans i de pacients amb dèficit de TK2 no tractats i tractats amb dCtd + dThd. Gel d'agarosa que mostra el producte de la PCR llarga on s'amplifica quasi tot l'ADNmt en mostres de sang de controls sans (1 – 5) i mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 (P11, P12, P15, P34 – P49) no tractats (-) o tractats amb dCtd + dThd (+) a diferents dosis i diferents temps (Taula 4.2). CN: Control negatiu de delecions múltiples, CP: control positiu de delecions múltiples, H2O: control negatiu de PCR. Carrils de l'esquerra: marcador de pes molecular λ DNA/HindIII.

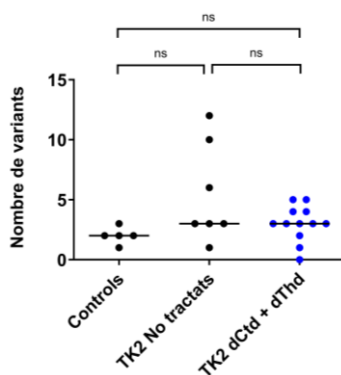


Figura 5.40. Nombre de variants sobre l'ADNmt en sang de controls sans i de pacients amb dèficit de TK2 no tractats o tractats amb dCtd + dThd. Nombre de variants sobre l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% en mostres de sang de controls sans, mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 que no han rebut tractament i mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 que han rebut tractament diari de dCtd + dThd a diferents dosis i diferents períodes de temps (Taula 4.2). Test estadístic: Mann-Whitney. ns: no significatiu.

El nombre de variants sobre l'ADNmt trobades en sang de pacients amb dèficit de TK2 no tractats va ser similar al de les mostres de sang de controls (Figura 5.40), fet que indica que aquest dèficit no indueix mutacions en l'ADNmt del teixit hematopoètic de pacients. Aquesta observació està en línia amb el que s'ha observat en els fibroblasts de pacients (Secció 5.2.1.1) i en el model murí KO de *Tk2* (Secció 5.2.2.1). Per altra banda, el grup de pacients que havia estat sota tractament diari amb dCtd + dThd no presentava un increment en el nombre de mutacions sobre l'ADNmt en sang en comparació amb el grup de pacients no tractat o amb el grup control (Figura 5.40).

Donat que els pacients amb dèficit de TK2 inclosos en aquest estudi havien rebut el tractament durant períodes de temps diferents i a diferents dosis es va analitzar si existia una correlació (Spearman) entre el nombre de variants i aquestes dues variables (temps de tractament i dosi), mostrant absència de correlació entre aquestes variables (Figura 5.41).

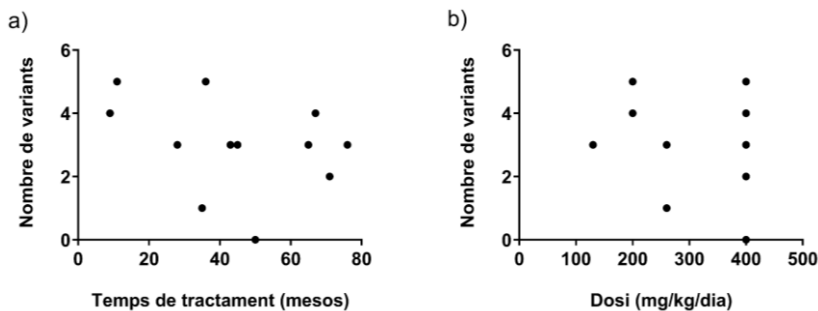


Figura 5.41. Correlació entre el nombre de variants sobre l'ADNmt amb el temps i la dosi. Correlació del nombre de variants en l'ADNmt amb un grau d'heteroplàsmia entre el 1% i el 99% reportades en mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 tractats diàriament per via oral amb dCtd + dThd i el temps de tractament (a) o la dosi (b). Test estadístic: Spearman. Ambdues correlacions són no significatives.

En resum, les anàlisis en mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 va mostrar que aquests no tenen ni deleccions múltiples ni un augment en el nombre de mutacions puntuals respecte als controls sans. Per tant, el dèficit de TK2 no resulta mutagènic, almenys en l'ADNmt de sang. A més, el tractament diari per via oral de dCtd + dThd durant un període llarg de temps no resulta genotòxic sobre l'ADNmt en aquest teixit, ja que tampoc no hi indueix ni deleccions múltiples ni mutacions puntuals.

5.2.3.2. Estudi de l'ADNn

La possible genotoxicitat del tractament amb dCtd + dThd es va estudiar també sobre l'ADNn partint de mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 abans i després de ser tractats diàriament per via oral amb dCtd + dThd (Taula 4.2). En aquest cas, degut a la inviabilitat de seqüenciar tot l'ADNn en el marc d'aquest projecte, es va optar per utilitzar un panell de seqüenciació (*Human Comprehensive Cancer Panel*, HCCP) que cobria 275 gens (836.670 kb) que tenen especial susceptibilitat de patir mutacions i que estan associats a càncer.

Primer de tot, es va comprovar que el control de validació introduït en l'experiment, que consistia en ADN de sang d'un pacient amb mutacions confirmades en algunes posicions, mostrava una freqüència similar en el panell utilitzat per al seu diagnòstic (*Oncomine Myeloid Research Assay*, OMRA (*ThermoFisher Scientific*)) i en el panell emprat en aquest estudi quan s'estudiaven les variants localitzades en zones cobertes pels dos panells (Taula 5.7). Aquesta dada va permetre donar validesa al panell utilitzat en aquest estudi, ja que presentava reproduïbilitat amb un altre panell.

Taula 5.7. Control de validació del Human Comprehensive Cancer Panel. La taula mostra el gen, mutació i freqüències en el panell de diagnòstic (OMRA) i en el panell actual (HCCP) de les variants en regions de l'ADNn cobertes pels dos panells.

Gen	Mutació	Freqüència panell OMRA (resultat previ)	Freqüència panell HCCP (panell actual)
NRAS	NM_002524.5: c.38G>A	1,5%	1,7%
KRAS	NM_033360.4: c.351A>T	6,0%	6,7%
KRAS	NM_033360.4: c.38G>A	4,7%	5,0%
SRSF2	NM_003016.4: c.277_300del	26,2%	10,3%
U2AF1	NM_006758.2: c.101C>T	15,1%	16,2%

Utilitzant el *Human Comprehensive Cancer Panel* el nombre de variants trobades respecte a la seqüència de referència amb una freqüència entre el 1% i el 100% va resultar similar entre la mostra d'abans i de després de rebre el tractament, en cada un dels 10 pacients amb dèficit de TK2 analitzats, tot i que hi havia una gran dispersió en el nombre de variants entre els diferents pacients (Figura 5.42). A més, aquest nombre de variants va ser similar al del control de validació del panell (356 variants) i al del control sa (352 variants) introduïts en aquest estudi.

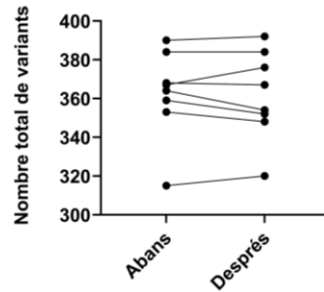


Figura 5.42. Nombre total de variants sobre l'ADNn trobades utilitzant el Human Comprehensive Cancer Panel. Nombre de variants en les mostres d'ADN de sang dels 10 pacients amb dèficit de TK2 abans i després de ser tractats diàriament per via oral amb diferents dosis de dCtd + dThd (Taula 4.2). Test estadístic: Wilcoxon test, no significatiu.

Pel que fa a la distribució de la freqüència de totes les variants identificades es va veure que totes les mostres analitzades tenien un patró bastant semblant (Figura 5.43 i Figura 5.44). Es van trobar al voltant de 100 variants amb una freqüència de 1 sobre 1 (100%) que corresponen a les variants presents en homozigosi, mentre que el nombre de variants amb una freqüència al voltant de 0,5 (50%), que correspon a variants presents en heterozigosi, va resultar superior. Les variants amb freqüències baixes (menors al 30%) i intermèdies (allunyades de les freqüències del 50% i del 100%) corresponen a mutacions somàtiques. Aquest patró de distribució de les variants en funció de la seva freqüència va ser encara més semblant quan es comparava una mostra del mateix pacient abans i després de rebre el tractament amb dCtd + dThd (Figura 5.43 i Figura 5.44). La distribució del nombre de variants en funció de la seva freqüència al·lèlica també va ser similar a la del control de validació del panell i a la del control sa (Figura Suplementària 20).

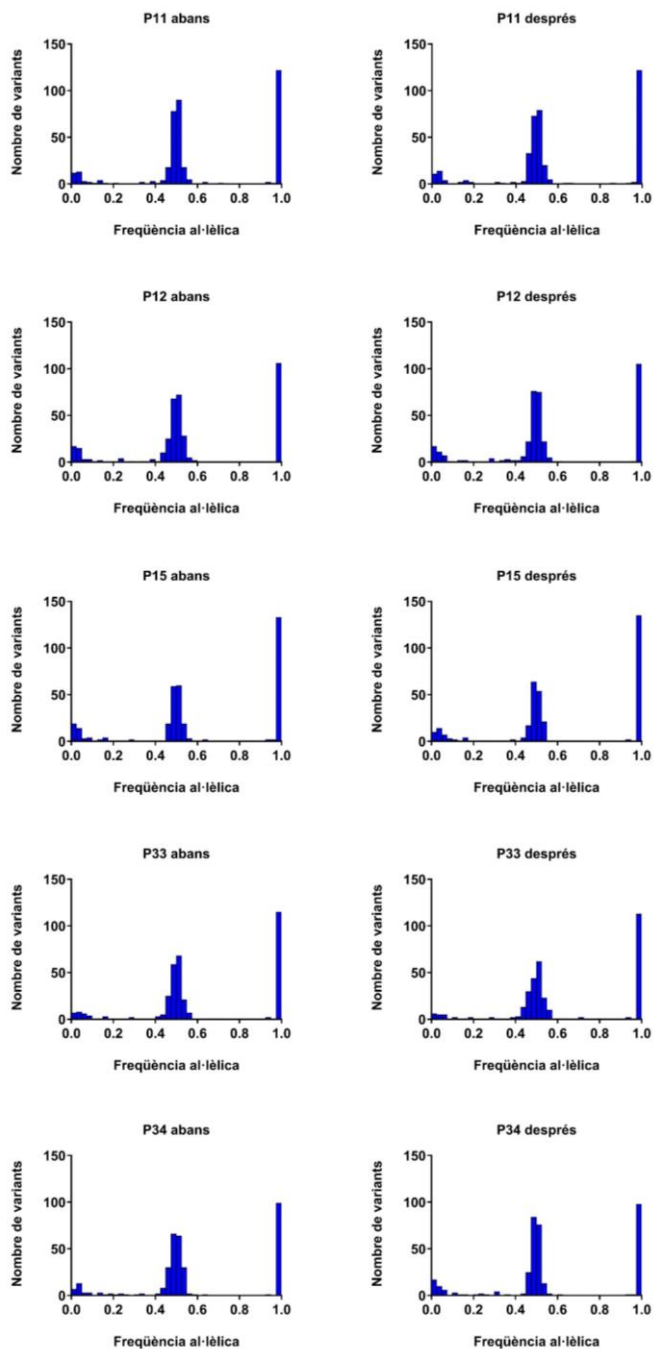


Figura 5.43. Distribució del nombre de variants sobre l'ADNn trobades amb el Human Comprehensive Cancer Panel amb la seva freqüència al·lèlica. Les variants representades tenen una freqüència entre el 1% i el 100% i són de mostres d'ADN de sang de pacients amb dèficit de TK2 (P11, P12, P15, P33, P34) abans i després de rebre tractament diari a diferents dosis de dCtd + dThd.

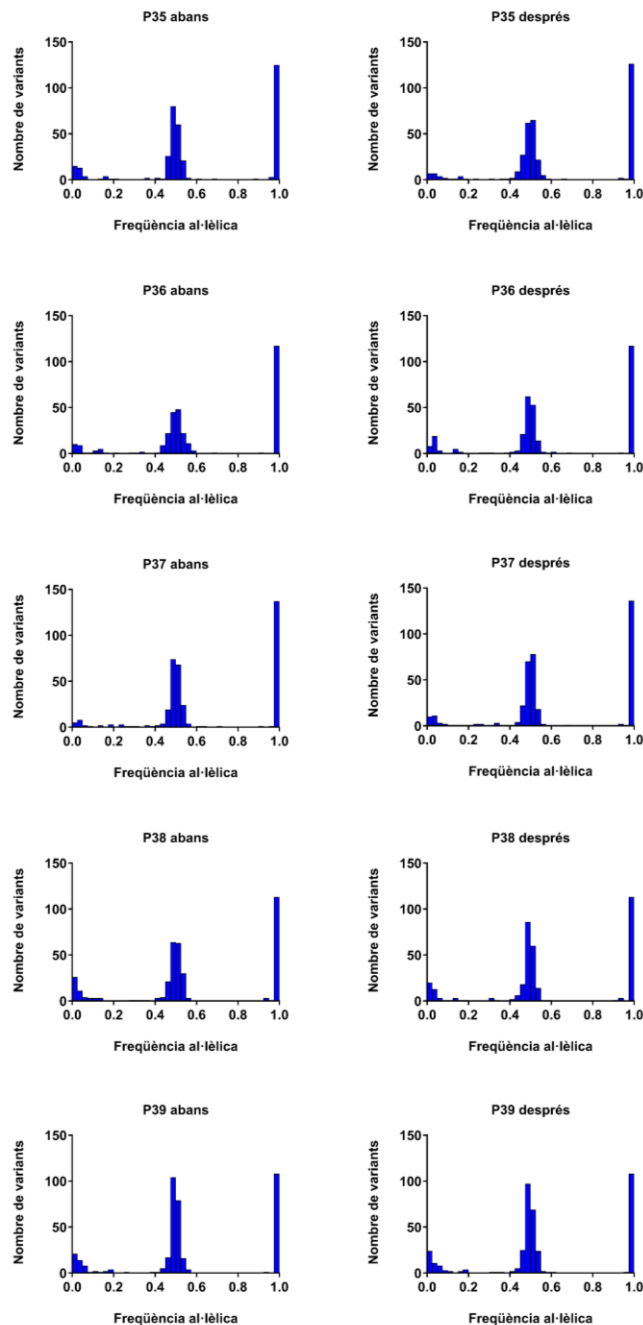


Figura 5.44. Distribució del nombre de variants sobre l'ADNn trobades amb el Human Comprehensive Cancer Panel amb la seva freqüència al·lèlica. Les variants representades tenen una freqüència entre el 1% i el 100% i són de mostres d'ADN de sang de pacients amb dèficit de TK2 (P35, P36, P37, P38, P39) abans i després de rebre tractament diari a diferents dosis de dCtd + dThd.

Si el tractament oral diari amb dCtd + dThd fos genotòxic i induís mutacions somàtiques sobre l'ADNn esperaríem que aquestes mutacions s'haguessin introduït en baix grau, i per tant la freqüència d'aquests canvis seria baixa. És per aquest motiu que aquest treball s'ha centrat en l'estudi de les variants presents amb una freqüència baixa (inferior al 30% i superior al 1%). Quan es va comparar el nombre de variants en aquest rang de freqüències per a cadascun dels 10 pacients, no es van trobar diferències entre la mostra d'ADN de sang abans i després de rebre tractament (Figura 5.45 a). D'altra banda, sí que es va observar una variabilitat en el nombre de mutacions depenent del pacient (en la condició d'abans de rebre tractament els pacients tenien un nombre de mutacions que anava de 26 fins a 54 mentre que en la condició de després de rebre el tractament el nombre de mutacions anava de 24 a 54) (Figura 5.45 a). A més, la proporció de mutacions amb una freqüència inferior al 30% respecte al total de mutacions trobades en la mostra també va ser similar entre la mostra abans i després de rebre el tractament (Figura 5.45 b).

Cabria la possibilitat que el tractament induís canvis en l'ADN que ja estan presents en la mostra en forma de variants heterozigotes, i per tant, esperaríem que aquestes variants (amb una freqüència del $50\% \pm 5\%$) alteressin lleument la seva freqüència. És per aquest motiu que es van comparar el nombre de variants amb una freqüència al voltant del 50% (entre el 40% i 44,9% i entre el 55% i 59,9%) en les mostres abans i després de rebre el tractament. En aquest cas, de nou, tant el nombre de variants com la seva proporció respecte al total de mutacions trobades en la mostra va ser similar en les dues condicions analitzades (Figura 5.45 c i Figura 5.45 d).

Finalment, també cabria la possibilitat que el tractament induís un canvi sobre una variant ja present en forma d'homozigosi en la mostra, la qual cosa provocaria una lleu davallada en la freqüència d'homozigosi ($100\% - 5\%$). Per aquest motiu es va comparar el nombre de mutacions i la proporció d'aquestes respecte al total de variants trobades amb una freqüència entre el 90% i el 94,9% en les mostres abans i després de rebre tractament amb dCtd + dThd i van resultar similars (Figura 5.45 e i Figura 5.45 f).

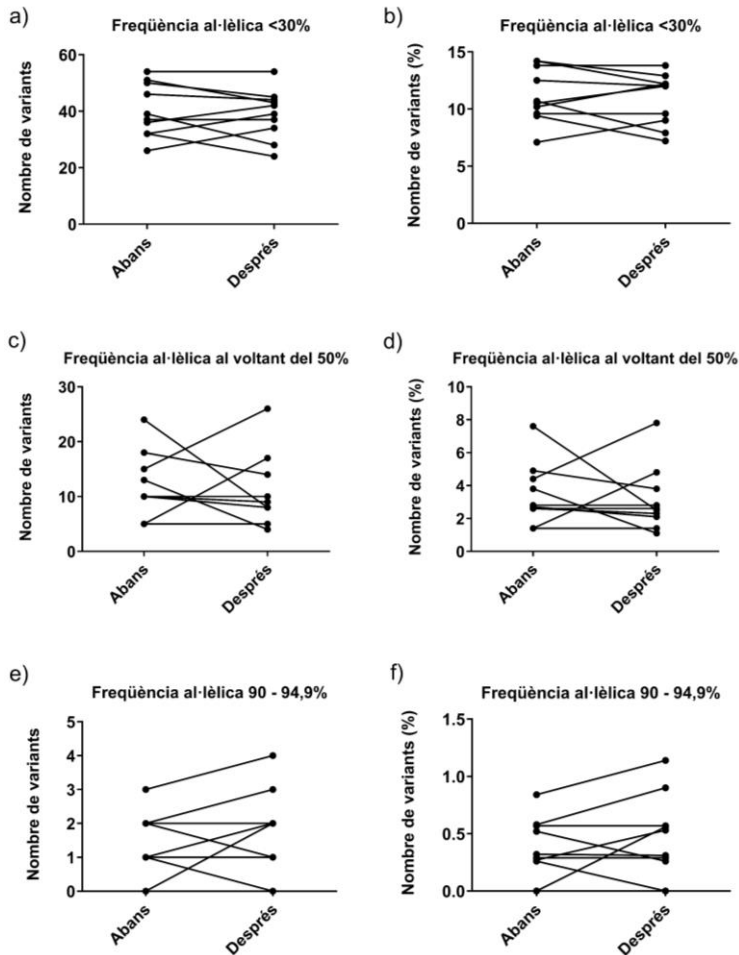


Figura 5.45. Nombre de variants trobades sobre l'ADNn en diferents rangs de freqüències al·lèliques. Nombre de variants (a) i percentatge respecte al total de variants trobades en la mostra (b) amb una freqüència al·lèlica baixa (inferior al 30%) en mostres d'ADN obtingut de sang de pacients amb dèficit de TK2 abans i després de rebre el tractament diari per via oral amb dCtd + dThd. Nombre de variants (c) i percentatge respecte al total de variants trobades en la mostra (d) amb una freqüència al·lèlica al voltant del 50% (entre el 40 i 44,9% i 55 i 59,9%). Nombre de variants (e) i percentatge respecte al total de variants trobades en la mostra (f) amb una freqüència al·lèlica al voltant de l'homozigosi (90 – 94,9%). Test estadístic: Wilcoxon test, no significatiu.

Si el tractament amb dCtd + dThd fos genotòxic s'induirien nous canvis amb freqüències baixes (entre el 1% i el 30%). Per tal d'estudiar exclusivament aquestes variants *de novo*, es van excloure de l'anàlisi les variants que estaven presents en el mateix pacient tant abans com després del tractament dins d'aquest rang de freqüència, ja que aquestes variants no estaven provocades pel tractament.

Aquesta anàlisi va mostrar que el nombre de variants era similar en tots els pacients analitzats abans i després de rebre el tractament i no es van detectar diferències estadísticament significatives (Figura 5.46 a). A més, com que hi havia variabilitat en el nombre de variants trobades entre els diferents pacients (entre 4 i 22 variants) (Figura 5.46 a), es va fer una correcció restant el nombre de variants presents després del tractament menys les que es van trobar abans, per a cada un dels 10 pacients analitzats. Aquesta darrera anàlisi va mostrar que la majoria de pacients tenien un valor negatiu (Figura 5.46 b), indicant que el nombre de noves variants després del tractament era lleument inferior que les trobades abans del tractament, tot i que, com s'ha indicat anteriorment, no es va observar influència significativa del tractament.

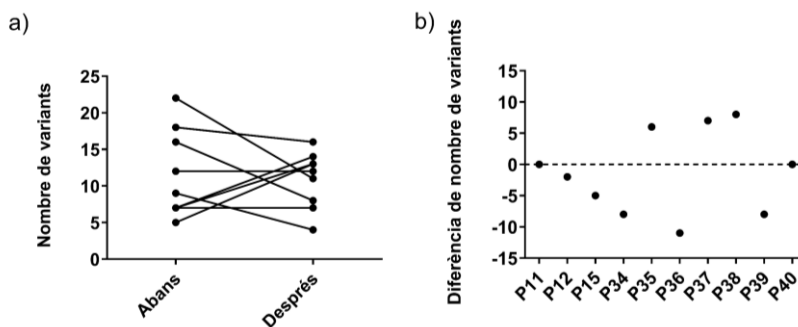


Figura 5.46. Variants amb una freqüència menor al 30% trobades en l'ADN només abans o només després del tractament amb dCtd + dThd. a) Nombre de variants en l'ADN de sang de pacients amb dèficit de TK2 que es troben amb una freqüència al·lèlica inferior al 30% i que només es troben en la mostra de sang abans o després del tractament amb dCtd + dThd. Test estadístic: Wilcoxon test, no significatiu. b) Diferència entre el nombre de variants, per a cada pacient, que es troben amb una freqüència al·lèlica inferior al 30%, després i abans del tractament.

Addicionalment, es va estudiar la freqüència al·lèlica de les variants de baixa freqüència (entre el 1% i el 30%) que estaven presents només en la condició d'abans de rebre el tractament o després de rebre'l (Figura 5.47) i es va veure que la majoria d'aquestes mutacions tenien una freqüència al·lèlica baixa (la majoria inferior al 10%) en les dues condicions estudiades (abans i després del tractament). El test estadístic va revelar dues diferències estadísticament significatives en dos pacients (P36 i P38) tot i anar en direccions oposades: en el P36 hi havia unes freqüències al·lèliques més elevades després de rebre el tractament mentre que el P38 presentava unes freqüències al·lèliques reduïdes després de rebre el tractament.

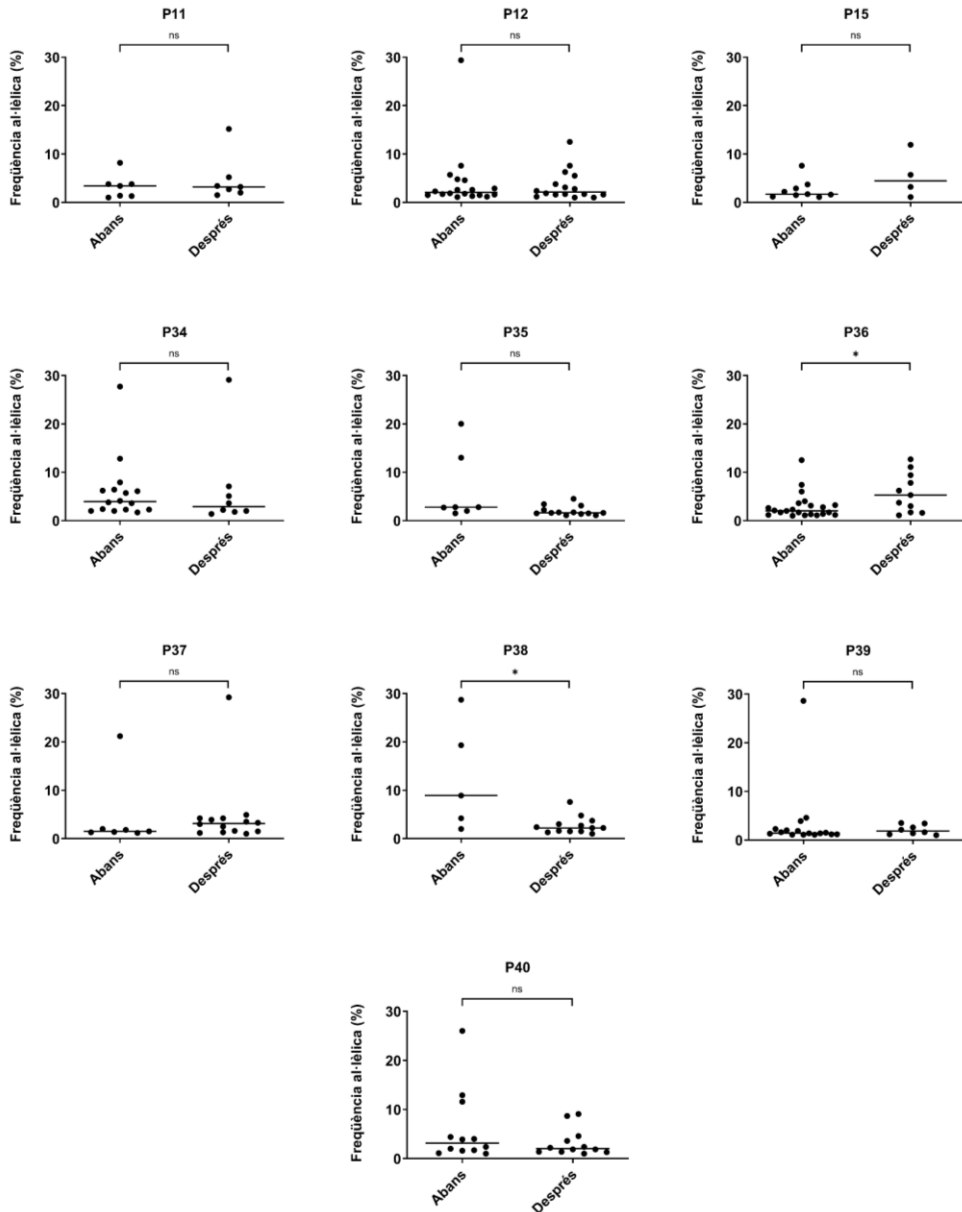


Figura 5.47. *Freqüència al·lèlica de les variants en l'ADN amb una freqüència menor al 30% trobades només abans o només després del tractament amb dCtd + dThd. Freqüència al·lèlica de les variants amb una freqüència al·lèlica entre el 1% i el 30% que estan presents només en l'ADN de les mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 abans de rebre tractament diari amb dCtd + dThd o només en les mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 després de rebre el tractament. Test estadístic: Mann-Whitney. *p<0,05.*

El fet de que s'hagin trobat mutacions en una de les condicions i en l'altra no (abans o després de rebre el tractament) es podria explicar per la seva freqüència: la majoria de mutacions tenen una freqüència baixa (Figura 5.47), cosa que podria fer que en alguns casos es situïn per sota del llindar de detecció (1%) i no es reportin com a variant, mentre que en la mostra aparellada superen per poc aquest llindar i es reporten com a variant. També hi ha certes mutacions amb una freqüència molt propera al 30% que només es troben en una de les dues condicions estudiades i que l'explicació de la seva presència en una de les condicions pot ser que en una mostra està present amb una freqüència lleument inferior al 30% i es reporta com a variant, mentre que en l'altra mostra aparellada està present amb una freqüència superior al llindar del 30%, cosa que fa que no es reporti la variant.

A part de les mutacions que s'havien trobat només en una de les dues condicions (abans o després del tractament) es va estudiar també la freqüència de cada una de les mutacions que s'havien trobat en les dues condicions comparant la seva freqüència al·lèlica abans i després del tractament per explorar si el tractament estava consolidant o expandint posicions preexistents ja mutades i alterant així la seva freqüència. L'estudi de les mesures aparellades va revelar que les freqüències al·lèliques presents en la mostra no tractada es mantenien també, amb petites variacions, en la mostra després de rebre el tractament (Figura 5.48).

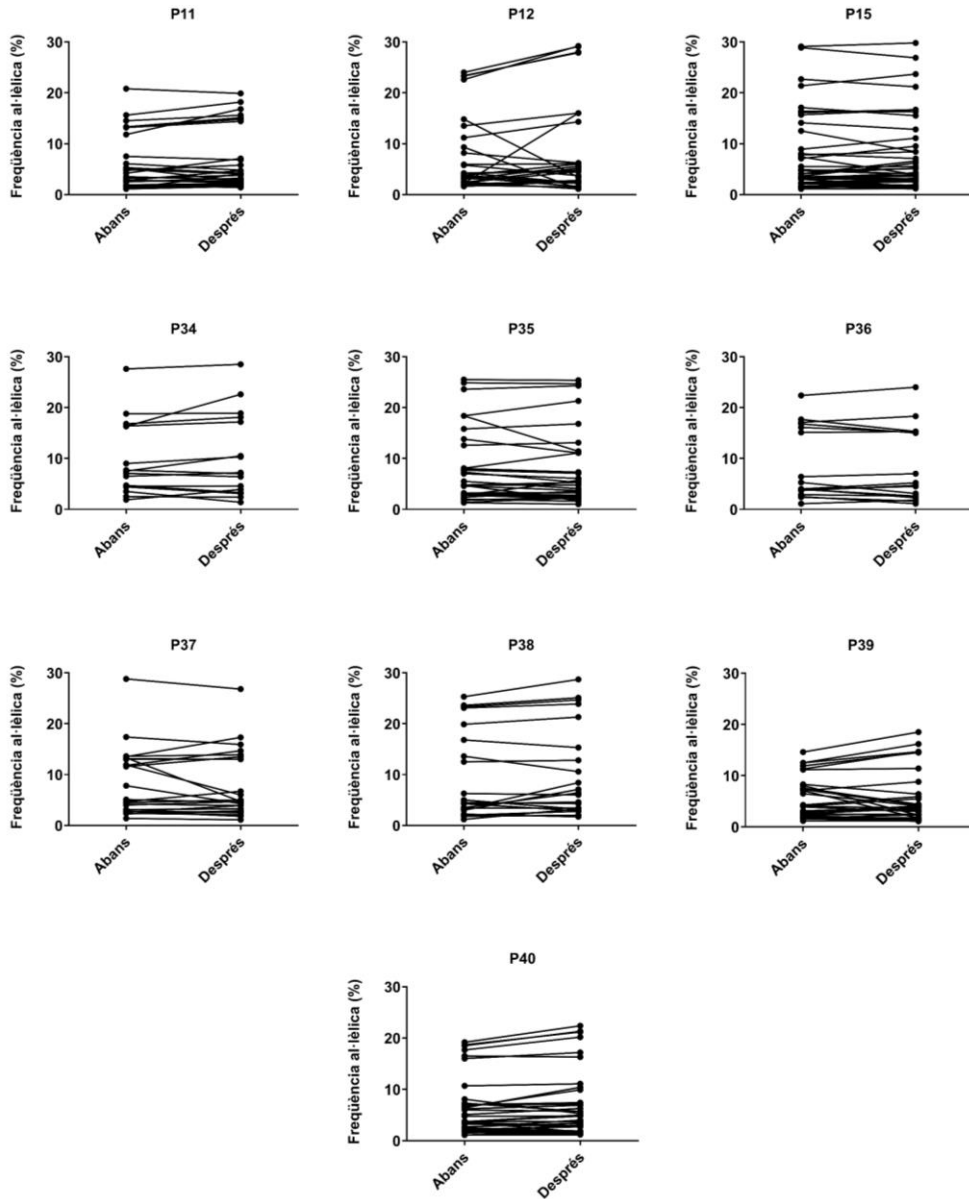


Figura 5.48. Freqüència al·lèlica de les variants en l'ADNn amb una freqüència menor al 30% trobades tant en la condició d'abans com després de rebre el tractament amb dCtd + dThd. Freqüència al·lèlica de les variants amb una freqüència al·lèlica entre el 1% i el 30% que estan presents en l'ADN de les mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 abans de rebre tractament diari amb dCtd + dThd aparellades amb la freqüència al·lèlica de les mostres de sang després de rebre el tractament. Test estadístic: Wilcoxon test, no significatiu.

Finalment, donat que el temps de tractament i la dosi no va ser igual en tots els pacients (Taula 4.2) es va explorar si hi havia una correlació entre aquestes dues variables i el nombre de mutacions trobades amb una freqüència al·lèlica entre el 1% i el 30%.

La correlació (Spearman) entre el nombre de variants trobades en l'ADNn de sang total després de tractar i el temps de tractament va resultar no significativa (Figura 5.49 a). Donat que el nombre total de variants amb una freqüència al·lèlica inferior al 30% va ser molt diferent depenent del pacient, però similar en el mateix pacient abans i després del tractament (Figura 5.46 a), es va fer una correcció restant el nombre de variants després de tractar menys abans de tractar i es va correlacionar aquest valor amb el temps d'exposició al tractament (Figura 5.49 b). Realitzant la resta es corregeixen els valors obtenint una població més homogènia i es pot comparar el nombre de mutacions de tots els pacients amb el temps sense crear un biaix pel nombre de mutacions (tant alt com baix) que presenti aquell pacient. En aquest cas, tampoc va haver correlació.

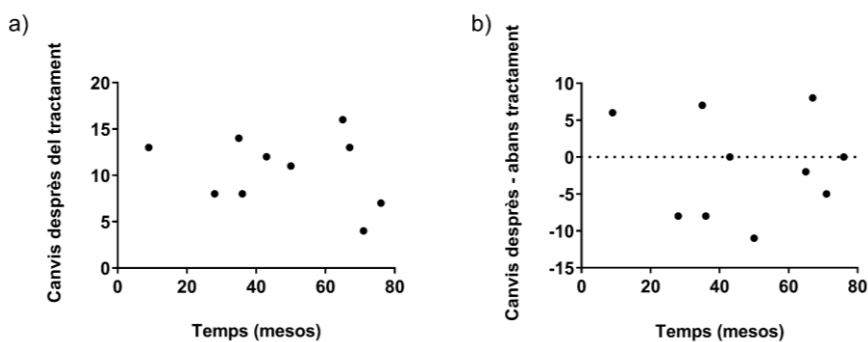


Figura 5.49. Correlació entre el nombre de variants sobre l'ADNn amb el temps de tractament. Correlació entre el temps de tractament i el nombre de variants sobre l'ADNn en mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 després de rebre tractament diari per via oral amb dCtd + dThd (a) i correlació entre el temps de tractament i la diferència del nombre de variants després de rebre el tractament diari per via oral amb dCtd + dThd menys el nombre de variants abans de rebre el tractament, en ADN de mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 (b). La línia discontinua en (b) marca el nivell de diferència=zero. Test estadístic: Spearman. Ambdues correlacions són no significatives.

La dosi administrada tampoc va correlacionar amb el nombre de variants sobre l'ADNn de sang després de tractar (Figura 5.50 a) ni tampoc amb les diferències del nombre de variants després de tractar menys abans de tractar (Figura 5.50 b).

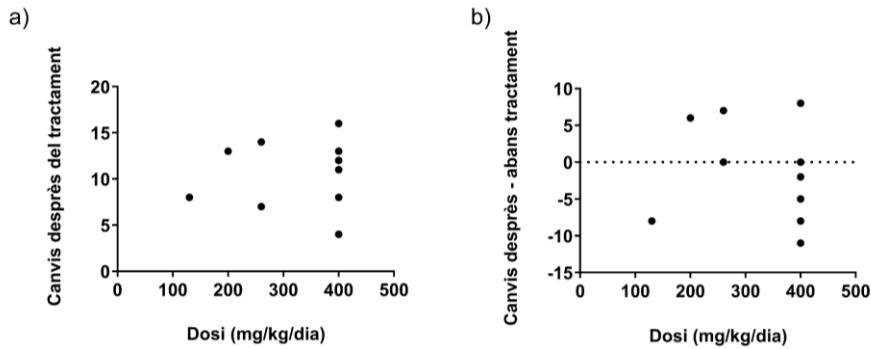


Figura 5.50. Correlació entre el nombre de variants sobre l'ADNn amb la dosi del tractament. Correlació entre la dosi i el nombre de variants sobre l'ADNn en mostres de sang total de pacients amb dèficit de TK2 després de rebre tractament diari per via oral amb dCtd + dThd (a) i correlació entre la dosi i la diferència del nombre de variants després de rebre el tractament diari per via oral amb dCtd + dThd menys el nombre de variants abans de rebre el tractament, en ADN de mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 (b). La línia discontinua en (b) marca el nivell de diferència=zero. Test estadístic: Spearman. Ambdues correlacions són no significatives.

En conjunt, mitjançant l'anàlisi de l'ADNn en mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 s'ha pogut veure que el tractament amb dCtd + dThd no afecta al nombre total de variants presents en els pacients amb dèficit de TK2 ni al nombre del subgrup de variants presents en forma d'homozigosi, heterozigosi o en baix grau (<30%). A més, les freqüències al·lèliques de les variants molt poc presents (inferiors al 30%) tampoc es veuen alterades, indicant que el tractament amb dCtd + dThd no està induint mutacions a baix grau sobre l'ADNn. Addicionalment, tampoc s'ha observat correlació entre el nombre de variants sobre l'ADN i la dosi o el temps d'exposició al tractament, tot apuntant a la seguretat gènica d'aquest tractament.

5.3. Implicació dels transportadors de nucleòsids en l'efecte terapèutic dels dNs de pirimidina

5.3.1. Estudis de supervivència

Donat que aquesta tesi es centra en l'administració de dNs per tractar MDDS i que teníem accés a un ratolí KO per *Ent1* (*Ent1*^{-/-}) que codifica el transportador de nucleòsids ENT1, vam estudiar el paper d'aquesta proteïna en el transport de dNs en el context del dèficit de TK2. Amb aquest objectiu, es van aparellar els ratolins *Ent1*^{-/-} (viabls i fèrtils en homozigosi) amb ratolins portadors (*Tk2*^{+/-}), ja que els *Tk2*^{-/-} no arriben a edat fèrtil. Després de successives generacions es van obtenir 4 genotips diferents: *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+}, *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/+}, *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}.

La primera aproximació per veure la possible implicació d'ENT1 en la teràpia amb dNs va ser mitjançant un estudi de supervivència en ratolins dels 4 genotips acabats d'esmentar en dues condicions: sense cap tractament o amb tractament amb una dosi diària de dCtd + dThd de 400 mg/kg/dia administrada per via oral a partir del dia 4 d'edat (Secció 4.1.5.1) (Figura 5.51).

Els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/+} no tractats tenien una supervivència igual que els *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+}, no tractats, tal com s'havia reportat prèviament¹¹⁶. A més, el tractament no va afectar la supervivència d'aquests dos grups, ja que al final de l'experiment tots els ratolins dels dos genotips eren vius (Figura 5.51).

Els resultats de supervivència s'expressen com a mediana (i rang de supervivència). Els ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} no tractats van viure una mediana de 17 dies (14 – 26 dies) (n=11), tal com s'havia descrit prèviament³¹⁷ mentre que els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} no tractats van viure una mediana de 24 dies (19 – 25 dies) (n=14) (Figura 5.51 i Figura 5.52)(Taula 5.8). Aquesta diferència estadísticament significativa en la supervivència indica que la falta d'ENT1 té un paper protector en la malaltia causada pel dèficit de TK2 en ratolins. D'altra banda, el tractament va allargar la supervivència dels ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} des dels 17 dies (14 – 26 dies) (n=11) fins a 51 dies (48 – 71 dies) (n=12) (Figura 5.51 i Figura 5.52)(Taula 5.8), quan prèviament s'havia reportat una supervivència de 34 dies en el grup tractat³¹⁷. En el cas dels

ratolins $Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}$ el tractament només va allargar la supervivència des dels 24 dies (19 – 25 dies) (n=14) fins als 27 dies (24 – 32 dies) (n=9) (Figura 5.51 i Figura 5.52)(Taula 5.8). Aquesta dràstica reducció en l'efecte del tractament en absència d'ENT1 indica que, almenys en ratolins, aquest transportador és un mitjancer necessari per a l'efecte terapèutic dels dNs en el dèficit de TK2.

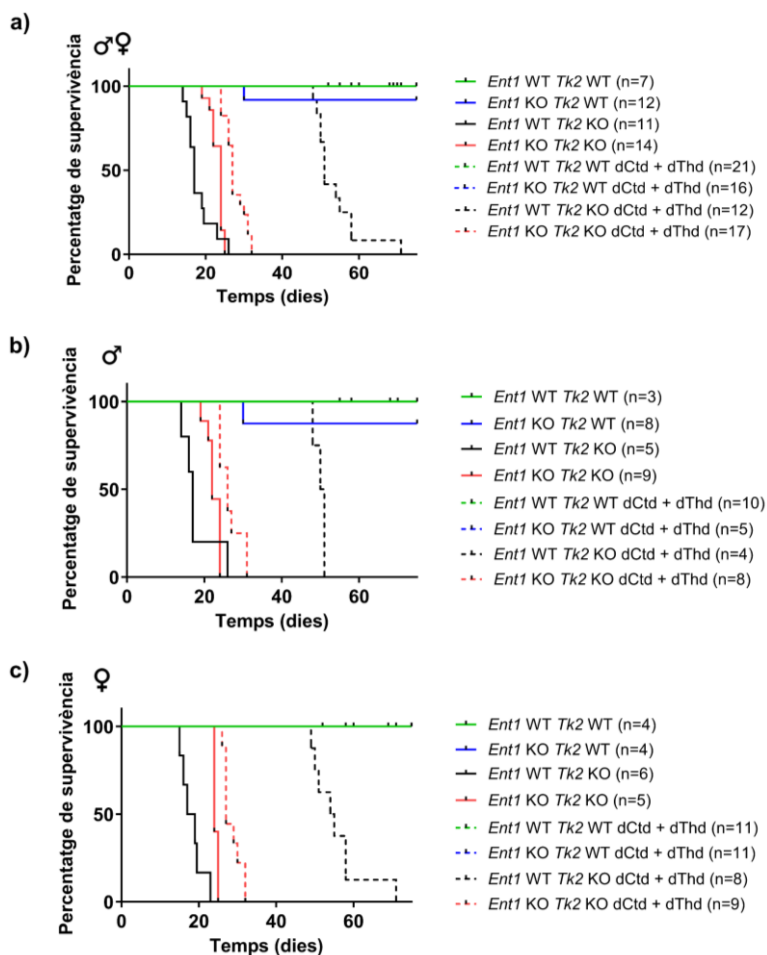


Figura 5.51. Corbes de supervivència per veure el paper d'ENT1. Corbes Kaplan – Meier de supervivència dels 4 genotips estudiats (($Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}$ ($Ent1$ WT $Tk2$ WT), $Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}$ ($Ent1$ KO $Tk2$ WT), $Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}$ ($Ent1$ WT $Tk2$ KO) o $Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}$ ($Ent1$ KO $Tk2$ KO)) de ratolins dels dos sexes (a), de mascles (b) o de femelles (c). Els grups d'animals que no han rebut tractament estan representats en línia contínua, mentre que els grups que han rebut tractament (dosi diària de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd) a partir del 4t dia d'edat estan representats en línia discontinúta. Entre parèntesis està indicat el nombre de ratolins dins de cada grup. Test estadístic: Mantel – Cox. Resultats del test estadístic en la Taula Suplementària 1.

Els resultats de supervivència s’han analitzat estadísticament a través de dos tests no paramètrics: Mantel-Cox, que analitza l’evolució de les supervivències d’acord amb la gràfica Kaplan-Meyer (Figura 5.51), i test de Mann-Whitney, que també analitza les distribucions de les supervivències entre grups (Figura 5.52). Els resultats del test Mantel-Cox estan recollits en la Taula Suplementària 1 i els resultats del test Mann-Whitney estan recollits en la Figura 5.52. Els dos tests estadístics han revelat els mateixos resultats, tot i que amb magnituds de significança lleument diferents en alguns grups.

Taula 5.8. Supervivència per veure el paper d’ENT1. Dia de la mort expressada amb la mediana i rang dels ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) i dels ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO) que no han rebut tractament o que han rebut una dosi oral diària de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd a partir de 4 dies d’edat. Les dades estan indicades sense separar els ratolins per sexe (primera fila) o agrupant-los per sexe (segona i tercera fila).

Sexe	Grup de tractament	<i>Ent1</i> WT <i>Tk2</i> KO	<i>Ent1</i> KO <i>Tk2</i> KO
♂ i ♀	No tractats	17,0 (14 – 26)	24,0 (19 – 25)
	dCtd + dThd	51,0 (48 – 71)	27,0 (24 – 32)
♂	No tractats	17,0 (14 – 26)	22,0 (19 – 24)
	dCtd + dThd	50,5 (48 – 51)	26,0 (24 – 31)
♀	No tractats	18,0 (15 – 23)	24,0 (24 – 25)
	dCtd + dThd	54,5 (49 – 71)	27,0 (26 – 32)

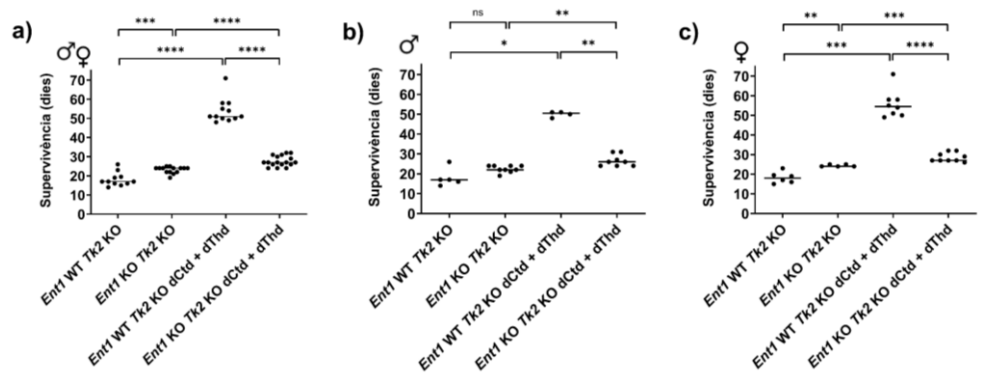


Figura 5.52. Supervivència per veure el paper d’ENT1. Representació del dia de la mort dels ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) i dels ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO). Es representa la supervivència de ratolins dels dos sexes conjuntament (a), de mascles (b) o de femelles (c) speradament, en absència de tractament o amb tractament amb dCtd + dThd a una dosi diària de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd a partir de 4 dies d’edat. Test estadístic: Mann-Whitney. **p*<0,05, ***p*<0,005, ****p*<0,0005, *****p*<0,0001, ns: no significatiu.

Quan es va estudiar la supervivència per separat depenent del sexe (Figura 5.52)(Taula 5.8) es va veure que les femelles tenien una lleugera tendència a viure més que els mascles en tots els grups estudiats (entre 1 i 4 dies de diferència en les medianes), però solament en el grup dels ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} no tractats es va veure una diferència estadísticament significativa (Figura 5.53). Tot i així, els resultats observats en el conjunt de ratolins coincidien amb els obtinguts per als ratolins separats per sexe (Figura 5.52) amb l'única excepció de la diferència de supervivència entre els ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i els *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} sense tractament, que va ser estadísticament significativa en el total de ratolins (17 vs. 24, $p=0,001$) (Figura 5.52 a) i en les femelles (18 vs. 24, $p<0,0043$) (Figura 5.52 c) però no en els mascles, tot i tenir la mateixa tendència (17 vs. 22, $p=0,0724$) (Figura 5.52 b).

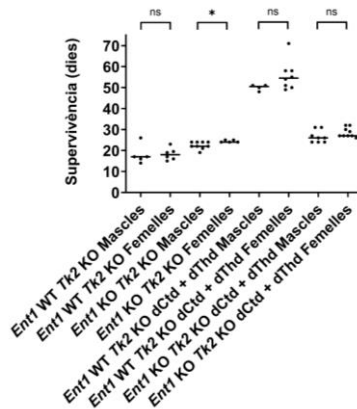


Figura 5.53. Supervivència separada per sexe per veure el paper d'ENT1. Representació del dia de la mort separat pel sexe dels ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) i dels ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO) sense tractament o amb tractament amb dCtd + dThd a una dosi diària de 400 mg/kg/dia de dCtd + dThd a partir de 4 dies d'edat. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p<0,05$, ns: no significatiu.

Durant l'estudi de supervivència es va fer el seguiment diari dels pesos dels ratolins dels quatre grups definits pels genotips *Ent1* i *Tk2* sotmesos al tractament amb dCtd + dThd (Figura 5.54). Tant els ratolins mascles com femelles *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+} van guanyar pes durant l'estudi, de la mateixa manera que ho feien els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/+}, tal com s'havia descrit prèviament¹¹⁶. Els dos sexes de ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} van guanyar pes de forma menys accelerada que els ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+} i van assolir el seu pes màxim al dia 36 en el cas de mascles o 37 en el cas de les femelles. A partir d'aquest punt els pesos dels ratolins anaven disminuint dia a dia fins el dia de la seva mort, replicant el que s'havia observat

prèviament³¹⁷. Els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} van experimentar un increment de pes lleu a l'inici del seguiment, tal com ho van fer la resta de genotips, però a partir del dia 16, en el cas de mascles, i 17, en el cas de femelles, es va començar a produir la pèrdua de pes diària fins al dia de la mort (Figura 5.54).

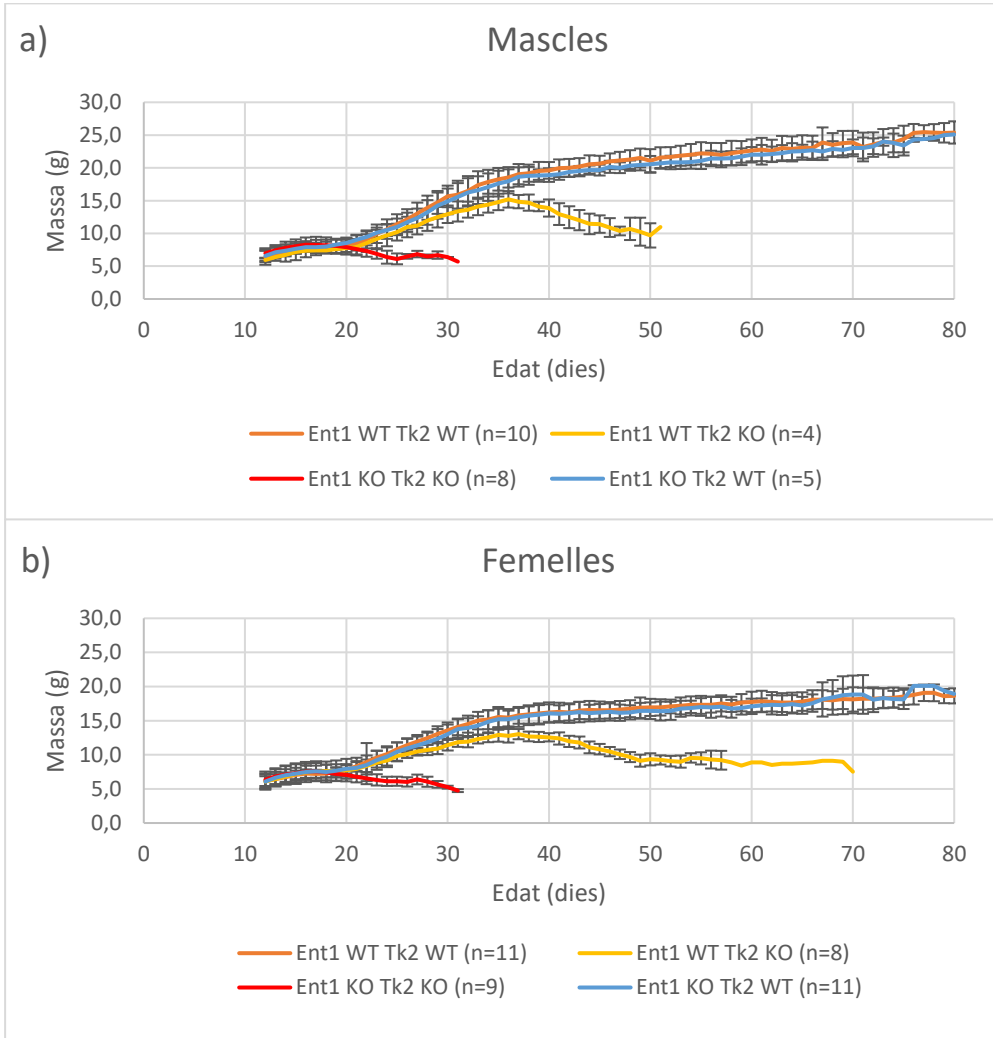


Figura 5.54. Evolució diària de les masses dels ratolins que han estat tractats en l'estudi de supervivència. Els valors corresponen a la mitjana i desviació estàndard de les masses dels ratolins mascles (a) i femelles (b) dels diferents genotips estudiats: *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+} (*Ent1* WT *Tk2* WT), *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/+} (*Ent1* KO *Tk2* WT), *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) o *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO) sotmesos al tractament diari per via oral de dCtd + dThd 400 mg/kg/dia a partir del dia 4 d'edat. El seguiment de massa es va iniciar a partir del dia 12, que coincideix en el moment en que es podien identificar individualment els ratolins.

5.3.2. Estudis farmacocinètics

Amb l'objectiu de veure si el transportador de nucleòsids ENT1 influïa en l'absorció dels dNs a nivell intestinal es van fer estudis farmacocinètics després de l'administració per via oral de 500 mg/kg de dCtd + dThd en ratolins *Ent1^{+/+}* o *Ent1^{-/-}* de 9 – 12 setmanes d'edat i mesurant aquests compostos i els seus primers productes de degradació en plasma (Secció 4.1.5.2). Els ratolins *Ent1^{-/-}* van presentar un perfil d'absorció típic de farmacocinètiques d'administració per via oral i similar als dels ratolins *Ent1^{+/+}*, tant per la dCtd com per la dThd (Figura 5.55). La concentració de dCtd i dThd assolida en el pic, tot i tenir molta dispersió depenent del ratolí analitzat, va resultar similar entre els dos compostos i entre els dos genotips. Aquest fet indica que la dCtd i dThd s'absorbeixen de forma similar a nivell intestinal i que aquests dos compostos poden ser absorbits en l'intestí de ratolins *Ent1^{-/-}* quan es tracten per via oral. L'única diferència apreciable en l'absorció entre els ratolins *Ent1^{+/+}* i *Ent1^{-/-}* va ser que el pic d'absorció per als dos compostos administrats es donava una mica abans en els ratolins *Ent1^{+/+}* (dCtd en el minut 60 i dThd en el minut 64) que en els *Ent1^{-/-}* (rangs: dCtd en el minut 65 – 141 i dThd en el minut 65 – 217), fet que suggereix un retard en l'absorció en els ratolins *Ent1^{-/-}*.

Quan es va calcular l'àrea sota la corba dels 4 compostos estudiats (dCtd, dThd, dUrd, Thy) en les farmacocinètiques (Figura 5.56) es va veure que, amb independència del genotip, aquesta era diferent entre la dCtd i dThd, indicant que la concentració de dThd es mantenia més elevada que la de dCtd al llarg de l'estudi farmacocinètic, tot i tenir una concentració en el pic d'absorció similar (Figura 5.55). A més, l'àrea sota la corba de la dCtd i de la dThd va ser similar en ratolins *Ent1^{+/+}* i *Ent1^{-/-}*, indicant un altre cop que l'absorció intestinal de la dCtd i la dThd és similar en presència i en absència del transportador ENT1. Els únics compostos que es van veure afectats de forma diferent entre un *Ent1^{+/+}* i *Ent1^{-/-}* van ser la dThd i la Thy, on la primera presentava una tendència no estadísticament significativa a tenir una àrea més gran i la segona a tenir-la més baixa en els ratolins *Ent1^{-/-}* (Figura 5.56).

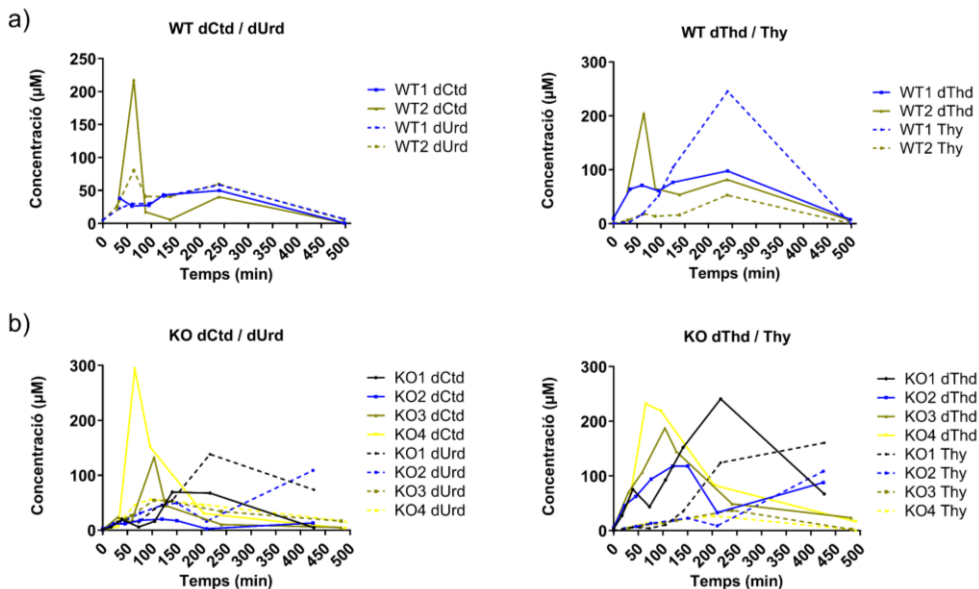


Figura 5.55. Farmacocinètica en ratolins WT i KO per Ent1. El gràfic mostra les concentracions (µM) en plasma de dCtd i dThd (línia contínua) i els seus primers productes de degradació (línia discontinua), dUrd i Thy, respectivament al llarg d'aproximadament 8 hores en ratolins Ent1^{+/+} (WT) (a) (n=2) o Ent1^{-/-} (KO) (b) (n=4) de 9 – 12 setmanes d'edat que han rebut una dosi per via oral de 500 mg/kg de dCtd + dThd.

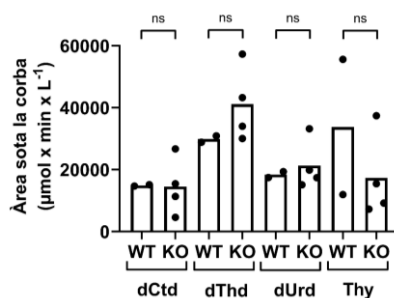


Figura 5.56. Àrea sota la corba dels compostos mesurats en la farmacocinètica. Àrea sota la corba (µmol x min x L⁻¹) de dCtd, dThd, dUrd i Thy en la farmacocinètica de ratolins Ent1^{+/+} (WT) o Ent1^{-/-} (KO). La barra indica la mitjana i cada punt el valor individual. Test estadístic: Mann-Whitney.

5.3.3. Contingut de dNs en diferents òrgans en ratolins de 8 – 12 setmanes

Per tal de veure quin paper tenia ENT1 en l'entrada del tractament amb dCtd i dThd en els diferents teixits es va fer un experiment d'administració dels dos compostos i de mesura d'aquests i dels seus primers productes de degradació, dUrd i Thy en plasma i diferents òrgans (fetge, múscul esquelètic i cervell). Les mostres de teixit es van recollir dues hores després d'administrar el tractament a una dosi de 500 mg/kg per via oral en ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat (Secció 4.1.5.2). Donat que els ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* moren als 17 i 24 dies de mediana, respectivament (Secció 5.3.1), l'anàlisi dels dNs en adults només es va poder fer en ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}* (*Ent1^{+/+}*) i *Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}* (*Ent1^{-/-}*), que són els mateixos genotips estudiats en la farmacocinètica (Secció 5.3.2).

5.3.3.1. Concentracions de dNs en plasma

En condicions basals, sense tractament, no hi havia diferències en la concentració plasmàtica de dCtd (Figura 5.7 a) i dThd (Figura 5.7 b) entre els dos genotips estudiats. En canvi, sí que es va veure una reducció en la concentració de dUrd en el ratolí *Ent1^{-/-}* (Figura 5.7 c), suggerint que la dCtd endògena pot entrar als teixits a través d'ENT1 i es pot degradar a dUrd i aquesta es pot exportar al plasma, potser també a través d'ENT1. Les concentracions de Thy en ratolins tractats amb PBS van resultar indetectables (Figura 5.7 d).

Quan es va administrar el tractament de dCtd + dThd va haver un increment en les concentracions de dCtd i dThd en els ratolins dels dos genotips (Figura 5.7 a i Figura 5.7 b), tal com s'havia vist en la farmacocinètica (Secció 5.3.2). La concentració de dCtd va ser superior en els animals que mancaven ENT1, suggerint que aquest compost entra menys en els teixits degut a la falta d'ENT1 i es manté més temps en plasma (Figura 5.7 c). A més, l'entrada limitada d'aquest dN en cèl·lules probablement fa que la seva degradació (que té lloc per enzims intracel·lulars) sigui més lenta, la qual cosa pot explicar que les concentracions plasmàtiques de dUrd siguin més baixes en aquests ratolins. La concentració de Thy, va mostrar una tendència a ser més baixa en els ratolins *Ent1^{-/-}*, tot i no ser estadísticament significativa (Figura 5.7 d).

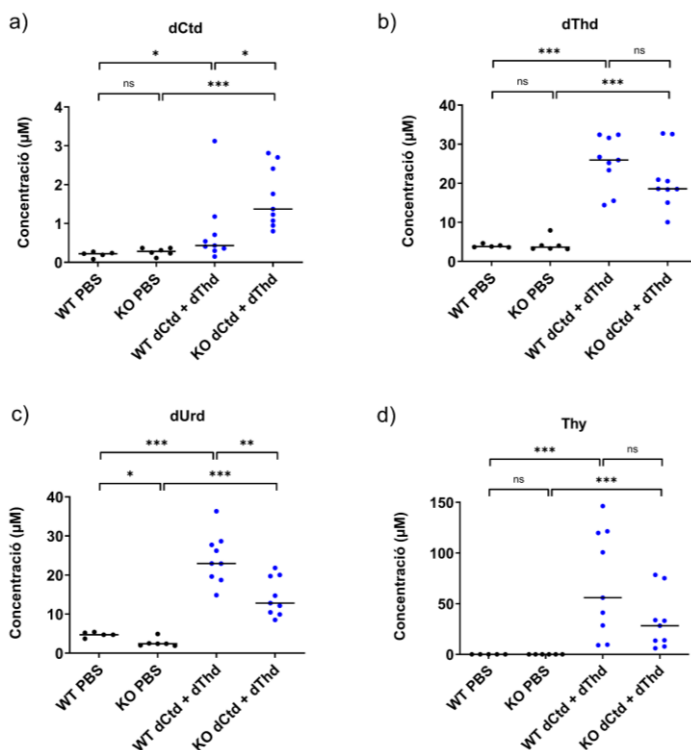


Figura 5.57. Concentracions de dCtd, dThd, dUrd i Thy en plasma de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Concentracions (µM) en plasma de dCtd (a) i dThd (b) i els seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins *Ent1*^{+/+} (WT) o *Ent1*^{-/-} (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. **p*<0,05, ***p*<0,005, ****p*<0,0005, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

Adicionalment, donat que en la sang es dona un intercanvi constant de diferents compostos amb els òrgans es va calcular la ràtio de producte de degradació entre producte administrat (dUrd/dCtd i Thy/dThd) (Figura 5.58 a i Figura 5.58 b). Quan es va estudiar aquesta ràtio es va veure que els ratolins *Ent1*^{-/-} mostraven sempre una ràtio inferior, tot i només ser estadísticament significatiu per la ràtio de dUrd/dCtd (Figura 5.58 a i Figura 5.58 b). Això està d'acord amb la interpretació que els ratolins *Ent1*^{-/-} tenen concentracions plasmàtiques més elevades de dCtd, aquest entra menys a les cèl·lules i, per tant, es degrada menys cap a dUrd. Aquesta ràtio no es va poder calcular en el cas de la Thy/dThd en animals tractats amb PBS perquè la Thy era indetectable i se li va atribuir el valor de zero per a la seva anàlisi.

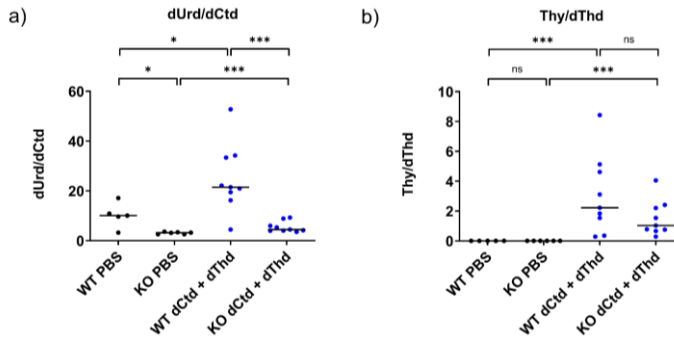


Figura 5.58. Ràtio de les concentracions dUrd/dCtd i Thy/dThd en plasma de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Ràtio de la concentració (μM) de dUrd/dCtd (a) i Thy/dThd (b) en plasma de ratolins $\text{Ent1}^{+/+}$ (WT) o $\text{Ent1}^{-/-}$ (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$ *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu. Els valors de la ràtio Thy/Thd no es van calcular per que els valors de Thy van ser indetectables i es representen amb valor 0.

5.3.3.2. Contingut de dNs en fetge

En absència de tractament les quantitats dels 4 compostos analitzats van ser similars en els ratolins $\text{Ent1}^{-/-}$ i $\text{Ent1}^{+/+}$, excepte per a la dCtd, que va resultar lleugerament superior en el genotip $\text{Ent1}^{-/-}$ (Figura 5.59). Tot i així, la magnitud de la diferència era molt discreta.

El tractament va incrementar la quantitat de dThd en els dos genotips i també la de dCtd en ratolins $\text{Ent1}^{-/-}$, indicant que aquest dN pot entrar al fetge en aquests ratolins. En canvi el tractament no va incrementar el contingut de dCtd en el fetge dels animals que expressen ENT1 (Figura 5.59 a). Aquesta observació no es va donar per la dThd (Figura 5.59 b) ni per la Thy, que augmentaven assolint concentracions similars en el fetge dels dos genotips (Figura 5.59 d).

Donat que en aquest cas s'està estudiant un òrgan, on es donen tant l'entrada del compost administrat com la seva degradació, es va calcular la suma del producte administrat més el seu primer producte de degradació i es va analitzar aquesta variable com a un indicador més representatiu del total de l'entrada del tractament al teixit. Aquesta anàlisi va mostrar una entrada similar de dCtd al fetge (estimada com la suma dCtd + dUrd) en presència i absència d'ENT1, mentre que el valor de la suma de dThd + Thy era significativament inferior en fetge de ratolins sense ENT1 quan es tractaven, indicant menys entrada i degradació de la dThd cap a Thy (Figura 5.60).

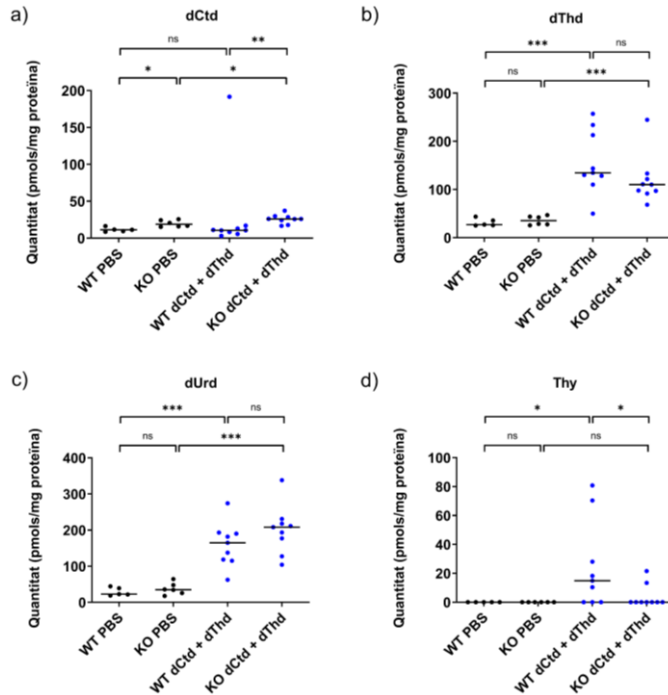


Figura 5.59. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en fetge de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en fetge de dCtd (a) i dThd (b) i els seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins $Ent1^{+/+}$ (WT) o $Ent1^{-/-}$ (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

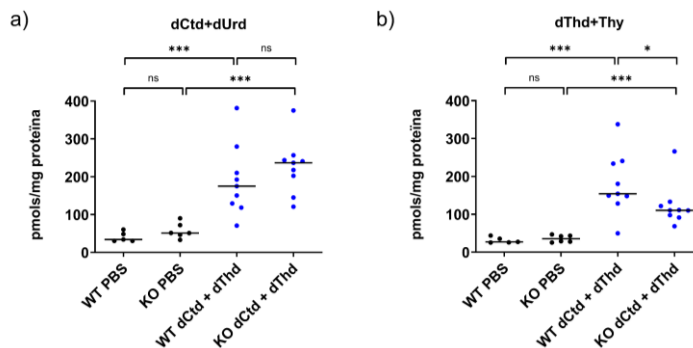


Figura 5.60. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en fetge de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en fetge de ratolins $Ent1^{+/+}$ (WT) o $Ent1^{-/-}$ (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu.

5.3.3.3. Contingut de dNs en múscul esquelètic

En condicions basals, sense tractament, es va veure que els ratolins que no expressaven ENT1 tenien continguts més elevats de dCtd (Figura 5.61 a), tal com passava en el fetge (Secció 5.3.3.2), però quantitats més baixes de dUrd (Figura 5.61 b). Tot i així, la magnitud de les diferències era molt discreta en ambdós casos. La quantitat de dThd va resultar similar en els dos grups, mentre que la quantitat de Thy va resultar indetectable en els dos genotips no tractats.

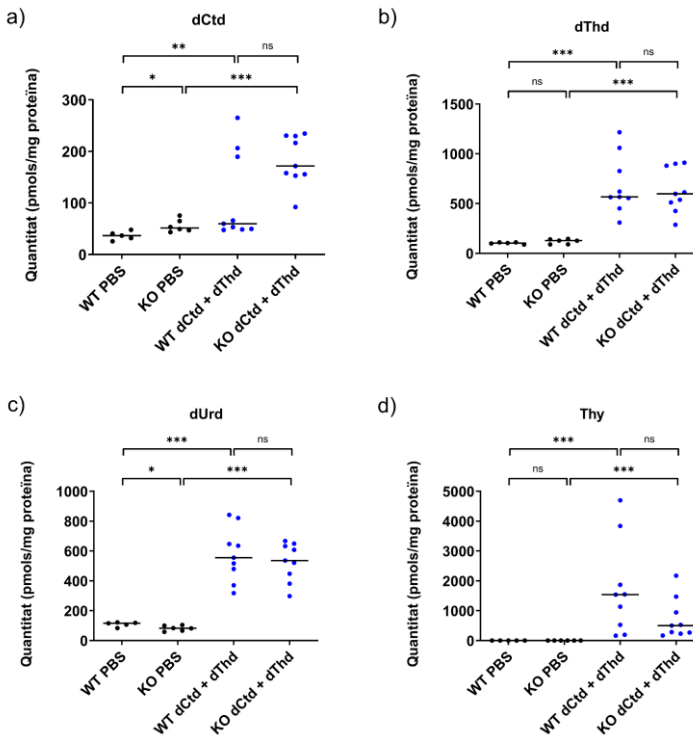


Figura 5.61. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en múscul esquelètic de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de dCtd (a) i dThd (b) i els seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins *Ent1*^{+/+} (WT) o *Ent1*^{-/-} (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

L'administració del tractament va provocar un augment dels dos dNs administrats, així com dels seus productes de degradació en els dos genotips estudiats i no es van observar

diferències en les quantitats dels dNs i dels seus productes de degradació entre els genotip *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-} (Figura 5.61) apuntant a la poca dependència del múscul esquelètic per aquest transportador per a internalitzar dCtd o dThd.

La suma dels productes administrats més els seus productes de degradació va mostrar que no hi havia diferències entre els ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-} quan aquests havien estat tractats amb PBS o dCtd + dThd apuntant a la poca dependència que té el múscul esquelètic per ENT1 per internalitzar o externalitzar la dCtd, dThd, dUrd o Thy (Figura 5.62).

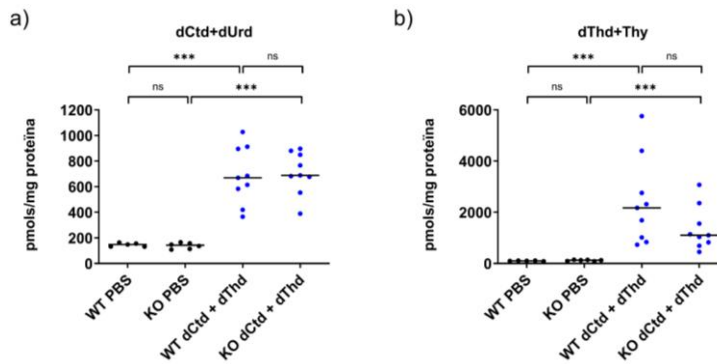


Figura 5.62. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en múscul esquelètic de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de ratolins *Ent1*^{+/+} (WT) o *Ent1*^{-/-} (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. ****p*<0,0005, ns: no significatiu.

5.3.3.4. Contingut de dNs en cervell

A diferència del fetge (Secció 5.3.3.2) i del múscul esquelètic (Secció 5.3.3.3), en absència de tractament els ratolins *Ent1*^{-/-} van mostrar quantitats similars de dCtd als dels *Ent1*^{+/+} (Figura 5.63 a), però quantitats més baixes de dUrd (Figura 5.63 c). A més, a diferència del fetge (Secció 5.3.3.2) i del múscul (Secció 5.3.3.3) els ratolins *Ent1*^{-/-} van mostrar continguts més baixos de dThd (Figura 5.63 b), mentre que la Thy va ser indetectable en els dos genotips (Figura 5.63 d).

L'administració del tractament no va causar un increment en la dCtd en cap dels dos genotips estudiats (Figura 5.63 a), mostrant els dos quantitats semblants de dCtd, però la dUrd va ser clarament superior en els ratolins *Ent1*^{+/+} (Figura 5.63 c) indicant que la dCtd pot entrar al

cervell i degradar-se ràpidament en els ratolins que expressen ENT1, però no en els ratolins que no expressen aquest transportador. Per tant, aquests ratolins no importen la dCtd al cervell i aquesta no és degradada cap a dUrd. L'administració del tractament també va mostrar una diferència equivalent entre els dos genotips per a la dThd i Thy: tant la dThd com la Thy van ser més altes en ratolins que expressaven ENT1, indicant l'alta dependència del cervell per ENT1 per a importar la dThd (Figura 5.63 b).

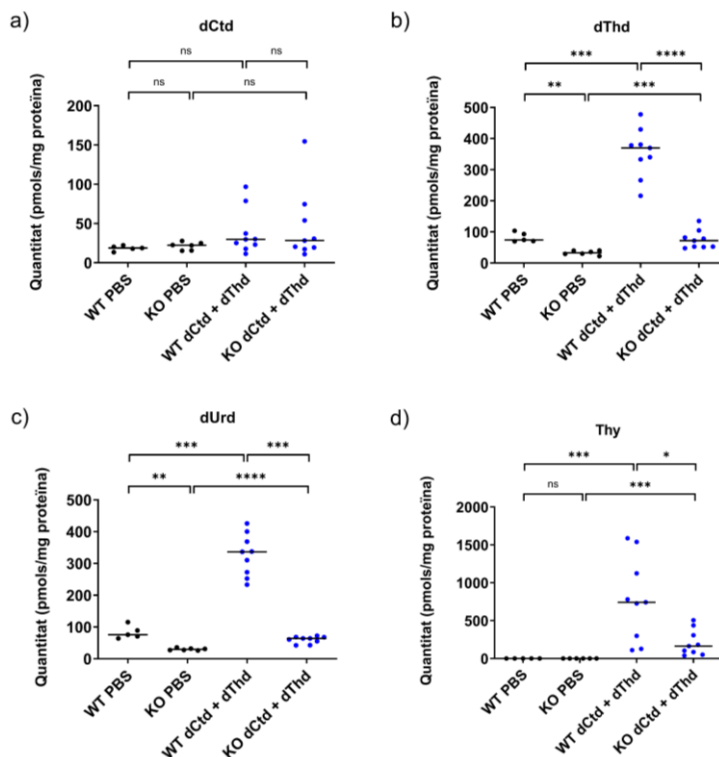


Figura 5.63. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en cervell de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en cervell de dCtd (a) i dThd (b) i els seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins $Ent1^{+/+}$ (WT) o $Ent1^{-/-}$ (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p > 0,0001$, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

Quan es va fer la suma del producte administrat més el seu producte de degradació es va veure la mateixa diferència en els dos compostos i els seus dos productes de degradació i en les dues condicions (en presència o absència de tractament): els ratolins amb manca d'ENT1

tenien sempre continguts més baixos de dCtd + dUrd i dThd + Thy (Figura 5.64) apuntant a l'alta dependència d'ENT1 per part del cervell per a poder importar la dCtd i dThd administrades.

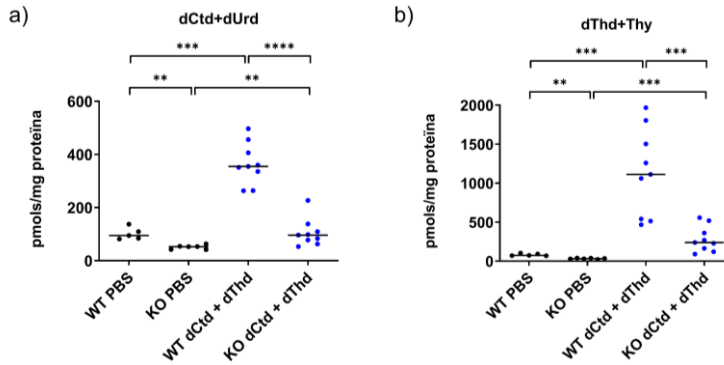


Figura 5.64. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en cervell de ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en cervell de ratolins *Ent1*^{+/+} (WT) o *Ent1*^{-/-} (KO) de 8 – 12 setmanes d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 500 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. ***p*<0,005, ****p*<0,0005, *****p*<0,0001, ns: no significatiu.

5.3.4. Contingut de dNs en diferents òrgans en ratolins de 12 dies d'edat

Tal com s'ha observat anteriorment l'absència d'ENT1 anul·la virtualment l'efecte del tractament amb dCtd + dThd sobre la supervivència en el dèficit de TK2 (Secció 5.3.1). Per aquest motiu, es va voler estudiar si les diferències en la supervivència es podien deure al contingut tissular dels dNs. Com que l'absència de TK2 en els ratolins fa que no visquin més de 17 dies (Secció 5.3.1) ens obliga a estudiar la quantitat de dNs en ratolins menors a aquesta edat. Així doncs, aquests estudis de biodistribució es van fer administrant PBS o dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg en ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} de 12 dies d'edat. Les mostres de plasma i òrgans (fetge, múscul esquelètic i cervell) es van recollir dues hores després de l'administració per mesurar el contingut de dCtd i dThd, així com dels seus primers productes de degradació (dUrd i Thy, respectivament) (Secció 4.1.5.2).

5.3.4.1. Concentracions de dNs en plasma

En condicions basals, sense tractament, les concentracions dels dNs analitzats, especialment la dCtd, van resultar superiors tant en el plasma com en els teixits de ratolins de 12 dies

d'edat respecte als ratolins de 8 – 12 setmanes d'edat (Secció 5.3.3). Aquestes diferències es feien encara més grans quan s'administrava el tractament. Aquesta observació ja s'havia descrit prèviament i un dels possibles motius que expliquen aquest fet és que amb l'edat hi ha un augment de l'expressió i activitat en intestí dels enzims catabòlics TP i CDA³¹⁷, que degraden els dNs, reduint d'aquesta manera les seves concentracions amb l'edat.

En condicions d'absència de tractament els ratolins *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* presentaven unes concentracions significativament més elevades de dCtd i dThd (Figura 5.65 a i Figura 5.65 b), possiblement perquè en no tenir expressió d'ENT1, aquests compostos no poden entrar tan eficientment en els òrgans i estan més temps en circulació sanguínia. En consonància, les concentracions de dUrd van resultar més altes en el plasma de ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* (Figura 5.65 c), suggerint que ENT1 contribueix a l'entrada de la dCtd en els teixits, on es degrada a dUrd, essent aquesta una possible explicació per a l'elevació de la concentració circulant de dCtd en absència d'ENT1. Les concentracions de Thy van resultar indetectables en el plasma de tots els ratolins no tractats (concentracions menors a 0,05 µM).

El tractament amb dCtd + dThd administrat per via oral va augmentar notablement la concentració plasmàtica de dCtd i dThd en els dos grups de ratolins estudiats (Figura 5.65 a i Figura 5.65 b). En consonància, les concentracions dels productes de degradació, dUrd i Thy, també van incrementar en els dos genotips de ratolins tractats (Figura 5.65 c i Figura 5.65 d). A més, tal com passava en la condició sense tractament, els ratolins *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* presentaven més quantitat de dCtd (Figura 5.65 a) i dThd (Figura 5.65 b) però menor de dUrd (Figura 5.65 c) i Thy (Figura 5.65 d), tot i no ser estadísticament significativa en el darrer cas. Aquest fet, segurament és degut al mateix motiu que per la dCtd i dUrd observat en ratolins no tractats.

Quan es van estudiar les ràtios de dUrd/dCtd es va veure la mateixa reducció significativa en els ratolins *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* amb i sense tractament, indicant que aquest ratolí té concentracions plasmàtiques més altes de dCtd i els degrada menys cap a dUrd (Figura 5.66 a). La mateixa tendència es va veure en la ràtio Thy/dThd en ratolins tractats (Figura 5.66 b). Aquesta ràtio no es va poder calcular en ratolins no tractats, ja que les concentracions plasmàtiques de Thy eren indetectables.

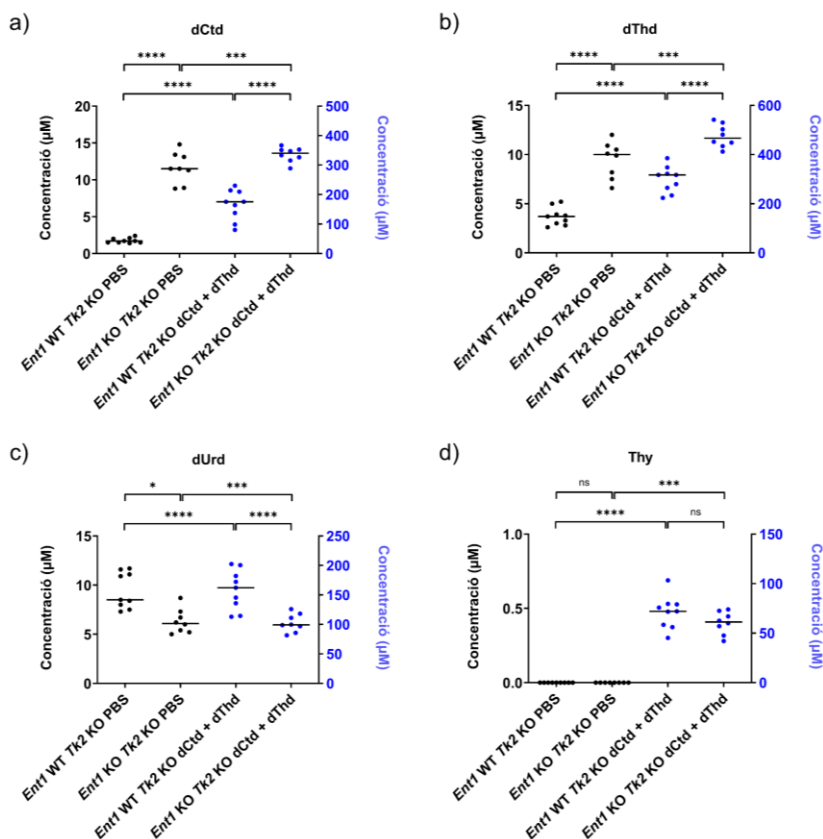


Figura 5.65. Concentracions de dCtd, dThd, dUrd i Thy en plasma de ratolins de 12 dies d'edat. Concentracions (μM) en plasma de dCtd (a) i dThd (b) i els seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. *p<0,05, ***p<0,0005, ****p<0,0001, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

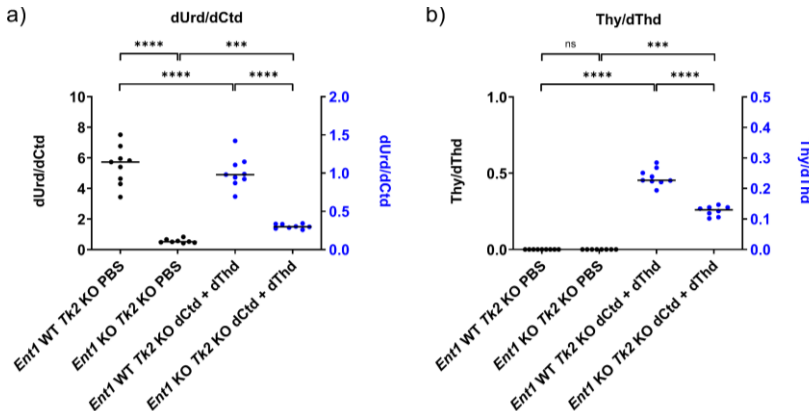


Figura 5.66. Ràtio de les concentracions dUrd/dCtd i Thy/dThd en plasma de ratolins de 12 dies d'edat. Ràtio de la concentració (μM) de dUrd/dCtd (a) i Thy/dThd (b) en plasma de ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$, ns: no significatiu. Els valors de la ràtio Thy/Thd no es van calcular per que els valors de Thy van ser indetectables i es representen amb valor 0.

5.3.4.2. Contingut de dNs en fetge

De forma similar al que s'observava en plasma (Secció 5.3.4.1), en condicions basals, sense tractament, la dCtd i dThd en fetge de ratolins de 12 dies d'edat van resultar més altes en animals que no expressaven ENT1 (Figura 5.67 a i Figura 5.67 b). En conseqüència a l'augment de dCtd, aquesta es degrada més cap a dUrd augmentant la seva quantitat (Figura 5.67 c), cosa que no es pot observar per la Thy, ja que resulta indetectable en aquestes condicions en els dos genotips (Figura 5.67 d).

El tractament amb dCtd + dThd va augmentar aquests compostos i dels seus productes de degradació en els dos genotips estudiats (Figura 5.67 a i Figura 5.67 b) tot i que l'increment de dThd va ser lleugerament menor en el ratolí Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Figura 5.67 b). A més, sota tractament els ratolins que no expressaven ENT1 tenien quantitats més altes de dCtd (Figura 5.67 a), mentre que no hi havia diferències en la quantitat de dThd en els dos genotips estudiats (Figura 5.67 b), la qual cosa suggereix que gran part de la dThd és internalitzada independentment d'ENT1.

La suma del dN administrat més el seu producte de degradació va mostrar la mateixa tendència que pels compostos separats: els ratolins amb manca d'ENT1 en condicions basals sense tractament tenen majors quantitats de dCtd i dThd i dels seus productes de degradació (Figura 5.68 a i Figura 5.68 b). Aquesta situació es repeteix quan s'administra el tractament només en el cas de la dCtd (Figura 5.68 a), suggerint que l'entrada de dThd en fetge no és altament depenent d'ENT1, participant altres transportadors en la seva internalització o externalització (Figura 5.68 b).

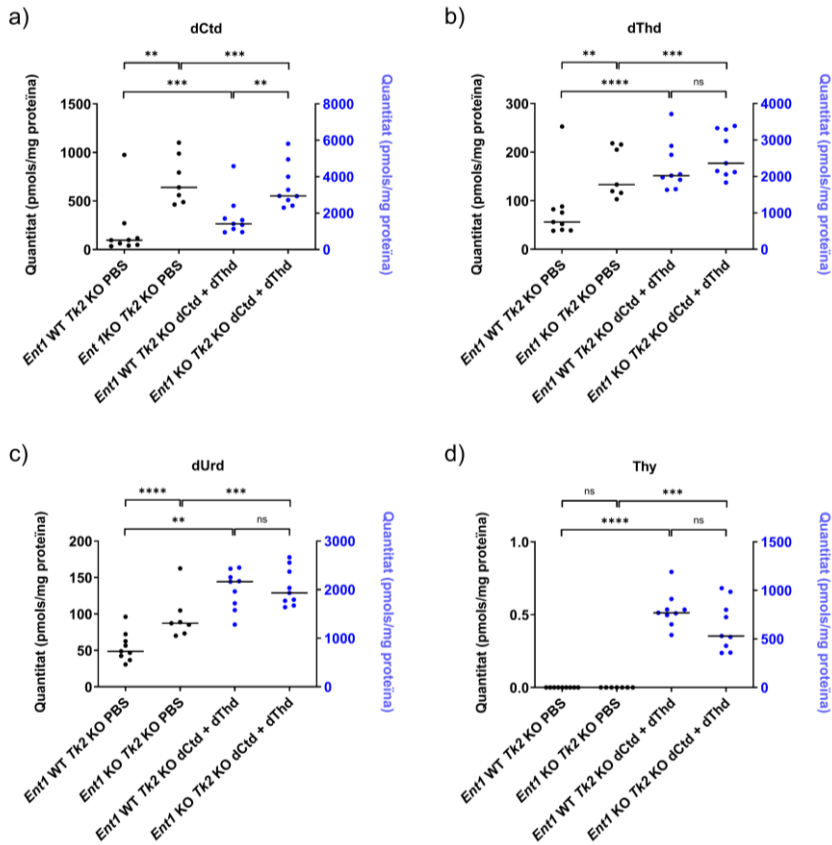


Figura 5.67. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en fetge de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en fetge de dCtd (a) i dThd (b) i dels seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

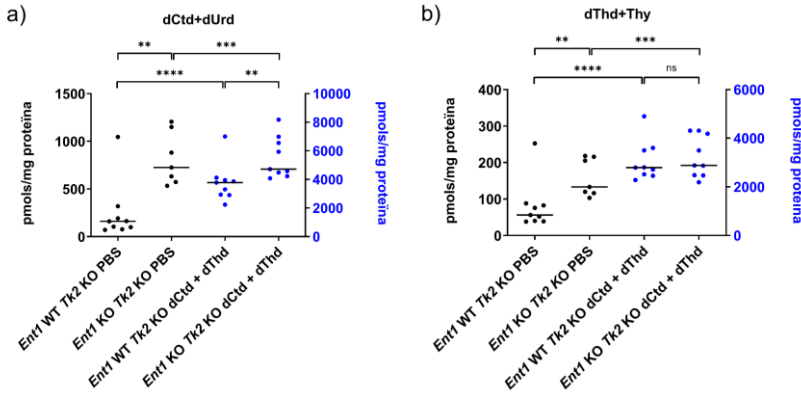


Figura 5.68. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en fetge de ratolins de 12 dies d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en fetge de ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$, ns: no significatiu.

5.3.4.3. Contingut de dNs en múscul esquelètic

De nou, tal com passava en plasma (Secció 5.3.4.1) i fetge (Secció 5.3.4.2) en absència de tractament, el contingut de dCtd i dThd en múscul era més elevat en ratolins que no expressaven ENT1 (Figura 5.69 a i Figura 5.69 b). Pel que fa als productes de degradació (dUrd, Thy), no es van veure diferències en la seva quantitat en absència de tractament (Figura 5.69 c), encara que la Thy en múscul, de nou, va ser indetectable (Figura 5.69 d).

Quan els ratolins van ser tractats es va observar un increment de la quantitat dels compostos administrats i dels seus productes de degradació en tots els ratolins, independentment del genotip. A més, en aquestes condicions es va observar el mateix comportament que en absència de tractament: els dNs administrats van ser superiors en els ratolins que mancaven ENT1 (Figura 5.69 a i Figura 5.69b). Contràriament a l'esperat, els ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}, que presenten més dCtd i dThd, tenien menys productes de la seva degradació (Figura 5.69 c i Figura 5.69 d). Aquestes dades suggereixen que aquest tractament entra al múscul, en part, a través d'ENT1, encara que hi podria haver algun altre transportador que juga un paper en la seva internalització.

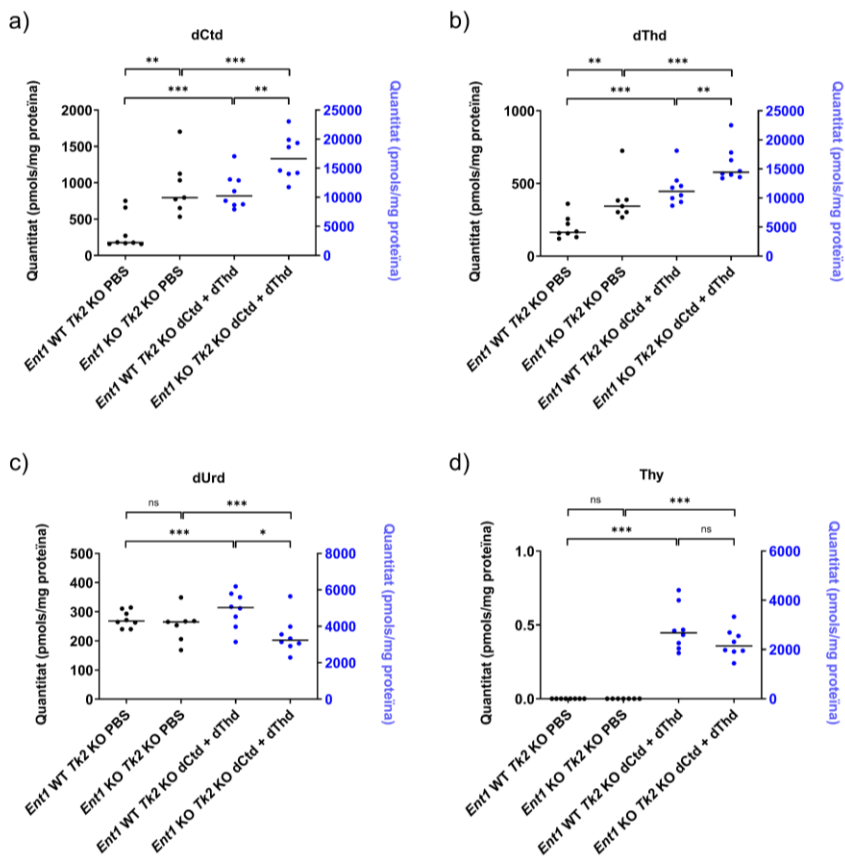


Figura 5.69. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en múscul esquelètic de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de dCtd (a) i dThd (b) i dels seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu. Els valors de Thy van ser indetectables en la condició de tractament amb PBS i es representen amb valor 0.

Quan es va estudiar la suma del producte administrat més el seu producte de degradació es va veure que el ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} sempre tenien quantitats més elevades de dThd + Thy, tant si havien estat tractats com si no (Figura 5.70), el mateix passava per a la dCtd + dUrd, tot i només ser estadísticament significatiu en el cas de ratolins no tractats.

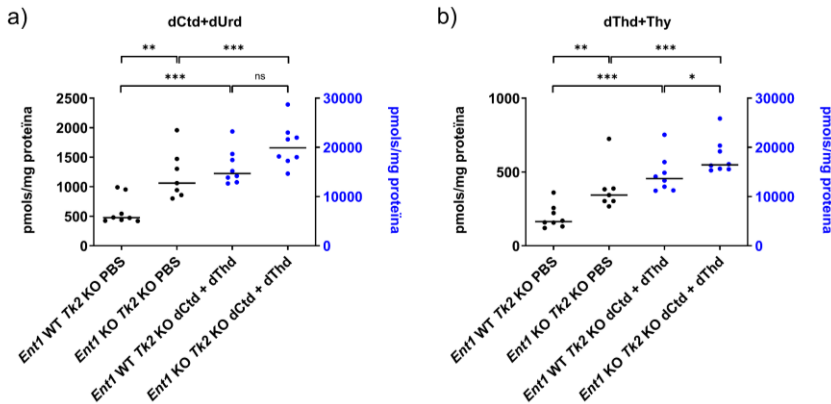


Figura 5.70. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en múscul esquelètic de ratolins de 12 dies d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) de ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ns: no significatiu.

5.3.4.4. Contingut de dNs en cervell

A diferència del que passava en plasma (Secció 5.3.4.1), fetge (Secció 5.3.4.2) i múscul esquelètic (Secció 5.3.4.3), en absència de tractament els ratolins dels dos genotips presentaven quantitats similars de dCtd i dThd (Figura 5.71 a i Figura 5.71 b), però més altes dels productes de degradació dUrd i Thy en els ratolins que expressaven ENT1 (Figura 5.71 c i Figura 5.71 d).

Quan es va administrar el tractament, tant la dCtd com la dThd, així com els seus productes de degradació (especialment la dUrd) van augmentar molt més en els ratolins que expressaven ENT1 en comparació amb els que en mancaven (Figura 5.71), indicant que el cervell era molt dependent d'ENT1 per a la importació dels dNs. Aquestes dades indiquen que tot i que el tractament amb dCtd + dThd entra en el cervell de tots els ratolins, ho fa de forma molt més eficient quan hi ha ENT1, indicant la importància d'aquest transportador en l'entrada dels dos dNs en aquest òrgan. Aquestes dades repliquen el que s'havia vist en els ratolins adults amb els genotips Ent1^{+/+} i Ent1^{-/-} (Secció 5.3.3.4).

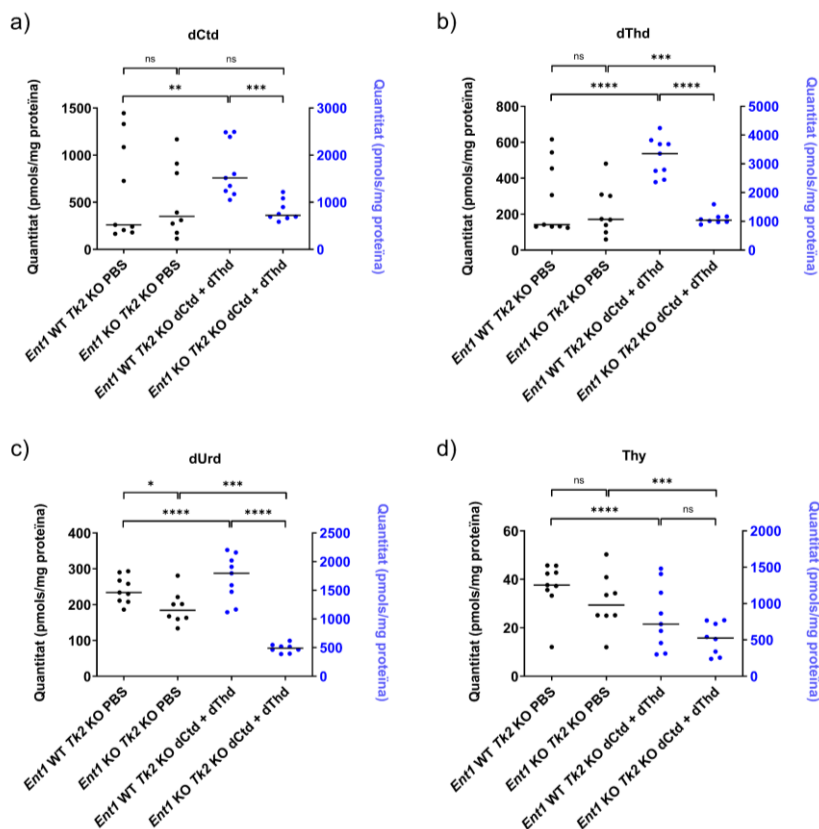


Figura 5.71. Quantitat de dCtd, dThd, dUrd i Thy en cervell de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en cervell de dCtd (a) i dThd (b) i dels seus primers productes de degradació, dUrd (c) i Thy (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$, ns: no significatiu.

La suma dels productes administrats més els seus productes de degradació va confirmar que en absència de tractament la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy era igual en els ratolins que expressaven o mancaven ENT1 (Figura 5.72), apuntant a la poca dependència d'ENT1 per part del cervell en condicions basals. Per contra, en presència de tractament s'incrementaven molt significativament les quantitats de dCtd + dUrd i dThd + Thy en el ratolins que expressaven ENT1 respecte als que no l'expressaven, indicant que l'entrada de la dCtd i dThd en cervell és altament dependent d'ENT1.

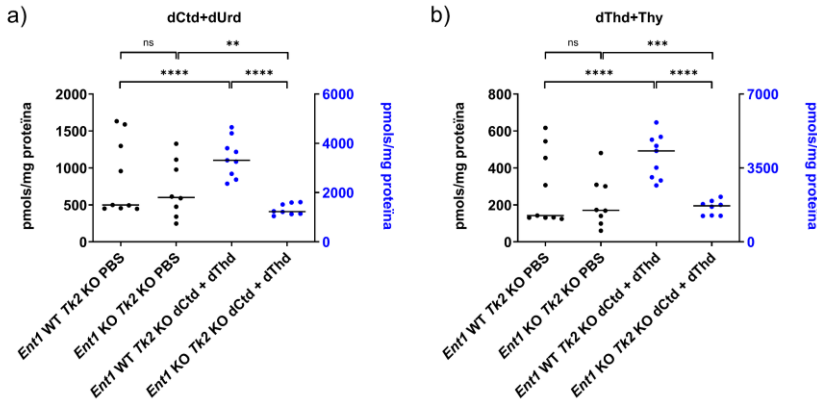


Figura 5.72. Suma de la quantitat de dCtd + dUrd i dThd + Thy en cervell de ratolins de 12 dies d'edat. Suma de la quantitat (pmols/mg proteïna) de dCtd + dUrd (a) i dThd + Thy (b) en cervell de ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre, escala a l'esquerra del gràfic) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau, escala de la dreta del gràfic) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. **p<0,05, ***p<0,0005, ****p<0,0001, ns: no significatiu.

5.3.5. Contingut de ribonucleòsids (rNs) en diferents òrgans en ratolins de 12 dies d'edat

ENT1 transporta tant ribonucleòsids (rNs) com dNs i, de fet, s'ha observat que el ratolí Ent1^{-/-} té alterat el metabolisme de l'Ado¹¹⁶. Per tant, es va estudiar la quantitat dels rNs en fetge, múscul esquelètic i cervell en ratolins de 12 dies d'edat.

En el fetge, en absència de tractament, l'únic rN que es va veure afectat pel genotip va ser la Ctd, que era lleugerament superior en ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} respecte als ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Figura 5.73 b). El tractament amb dCtd + dThd va causar un augment en la Urd en els dos grups de ratolins estudiats respecte al grup de ratolins tractat amb PBS (Figura 5.73 d) i un augment en la Ctd en els ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}, però no en els ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}, (Figura 5.73 b). A més, en condicions de tractament amb dCtd + dThd es mantenia l'augment de Ctd en el grup de ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} respecte als Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} i també es va veure un augment de l'Ado en els ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} respecte als Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}.

En múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) només es va veure un increment estadísticament significatiu en la Ctd en els ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} respecte als Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Figura 5.74 b)

tractats amb PBS, tal com s'havia vist en fetge. Per altra banda, el tractament amb dCtd + dThd no va afectar la quantitat de cap dels 4 compostos en aquest òrgan (Figura 5.74). En el cervell, ni el genotip ni el tractament van tenir cap efecte detectable en el contingut de rNs (Figura 5.75).

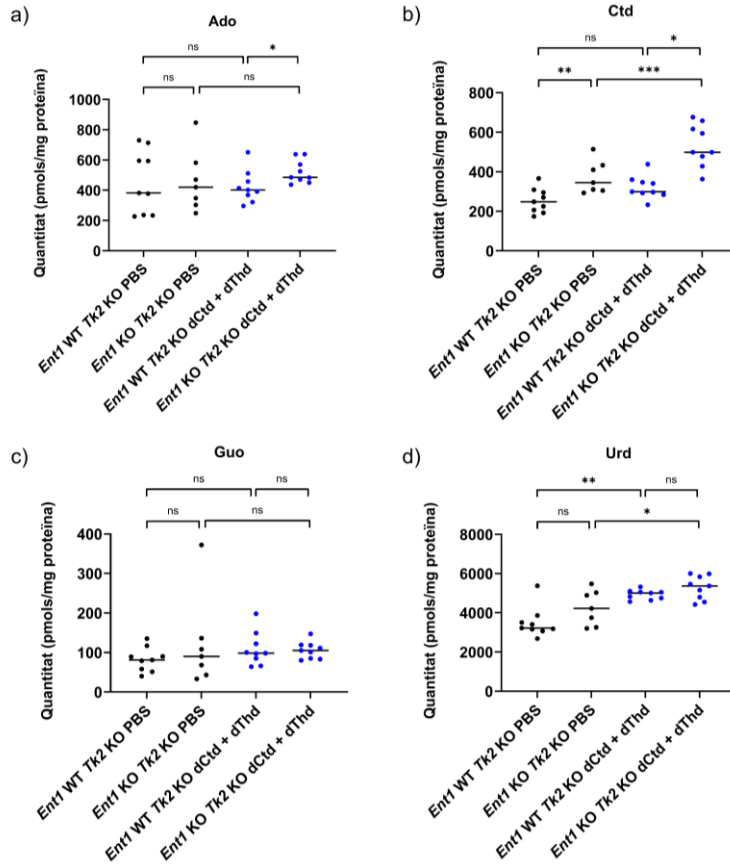


Figura 5.73. Quantitat de ribonucleòsids en fetge de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en fetge d'Ado (a), Ctd (b), Guo (c) i Urd (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ns: no significatiu.

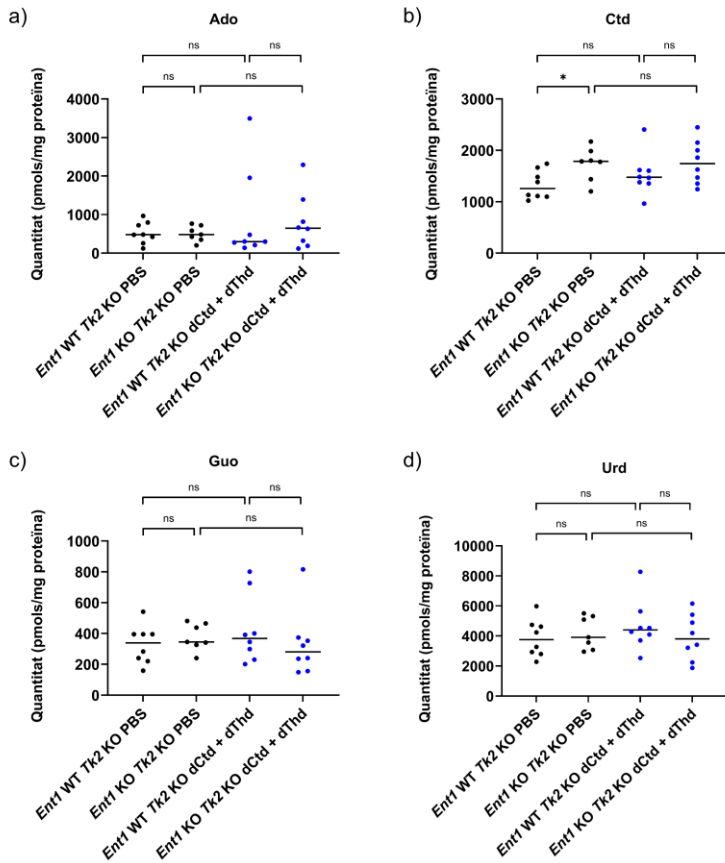


Figura 5.74. Quantitat de ribonucleòsids en múscul esquelètic de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) d'Ado (a), Ctd (b), Guo (c) i Urd (d) en ratolins Ent1^{+/+}Tk2^{-/-} (Ent1 WT Tk2 KO) o ratolins Ent1^{-/-}Tk2^{-/-} (Ent1 KO Tk2 KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ns: no significatiu.

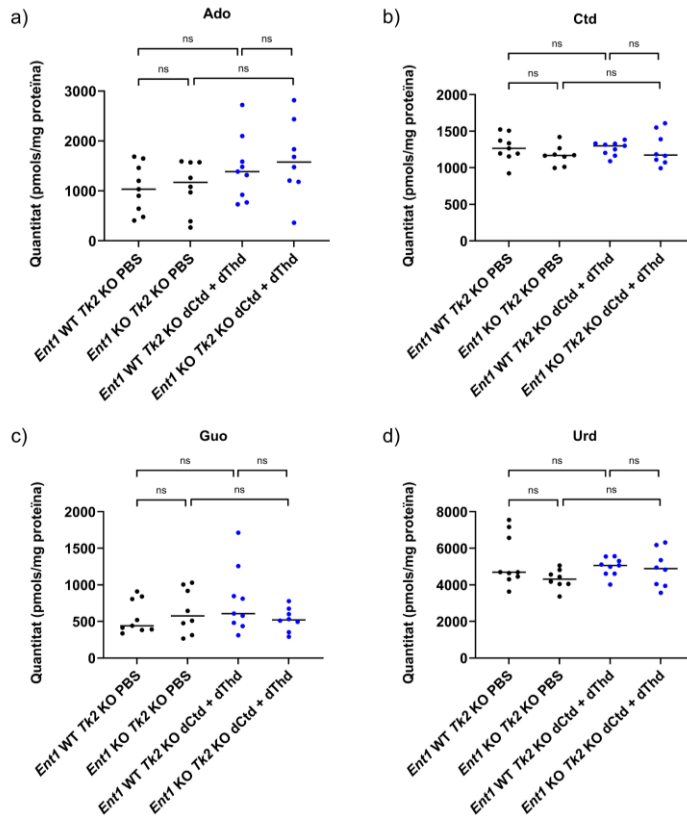


Figura 5.75. Quantitat de ribonucleòsids en cervell de ratolins de 12 dies d'edat. Quantitat (pmols/mg proteïna) en cervell d'Ado (a), Ctd (b), Guo (c) i Urd (d) en ratolins $Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}$ ($Ent1$ WT $Tk2$ KO) o ratolins $Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}$ ($Ent1$ KO $Tk2$ KO) de 12 dies d'edat tractats per sonda oral amb PBS (en negre) o amb dCtd + dThd a una dosi de 400 mg/kg (en blau) analitzats 2 hores després de l'administració. Test estadístic: Mann-Whitney. ns: no significatiu.

5.3.6. Estudi del nombre de còpies d'ADNmt

Per intentar veure si la diferència de supervivència entre ratolins $Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}$ i $Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}$ no tractats (17 dies vs. 24 dies) (Secció 5.3.1) tenia relació amb el nombre de còpies d'ADNmt es va estudiar aquesta variable en diferents òrgans en ratolins de dues edats diferents: una edat propera a la mediana de supervivència del grup que viu menys (12 dies d'edat) i una edat més primerenca (5 dies d'edat).

5.3.6.1. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 12 dies d'edat

Els ratolins $Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}$ presentaven un nombre de còpies d'ADNmt similar al dels animals $Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}$ en els 4 teixits analitzats, tot i mostrar un lleu augment no significatiu en el

nombre de còpies d'ADNmt en el fetge i múscul (Figura 5.77). Els ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i els *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} presentaven un mateix grau de depleció als 12 dies d'edat en cervell, tal com s'havia reportat prèviament en els dos models de dèficit de TK2^{316,317}. Tot i que en el model KO també es va descriure una lleu depleció en múscul esquelètic³¹⁷, l'experiment actual no la mostra, tot i haver una tendència no estadísticament significativa a tenir menys còpies d'ADNmt en absència de TK2 (Figura 5.76 d). El fetge i cor dels ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} no van mostrar depleció de l'ADNmt (Figura 5.76).

Així doncs, les diferències de supervivència observades entre els genotips *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}, (Secció 5.3.1) no s'expliquen per diferències en el nombre de còpies d'ADNmt en els dos genotips als 12 dies d'edat en els òrgans estudiats.

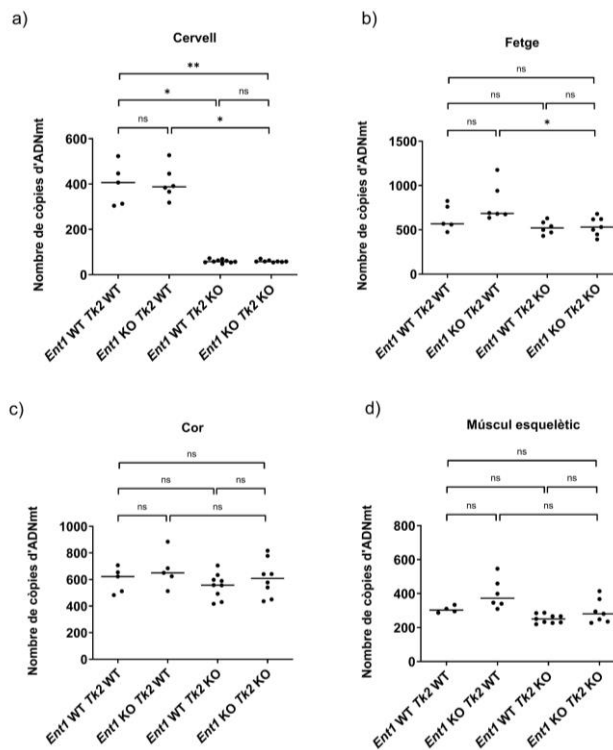


Figura 5.76. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 12 dies d'edat. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula en mostres de cervell (a), fetge (b), cor (c) i múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) (d) de ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{+/+} (*Ent1* WT *Tk2* WT), *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{+/+} (*Ent1* KO *Tk2* WT), *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* WT *Tk2* KO) o *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} (*Ent1* KO *Tk2* KO) als 12 dies d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia a la mediana del grup. Test estadístic: Kruskal-Wallis. Quan hi ha diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) s'aplica el test de Dunn per comparar els diferents grups. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ns: no significatiu.

5.3.6.2. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 5 dies d'edat

Com que no es van observar diferències en el nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 12 dies d'edat que poguessin explicar les diferències en la supervivència dels ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}*, es va explorar si aquesta podia estar relacionada amb la quantitat d'ADNmt en una edat més primerenca (5 dies d'edat).

El nombre de còpies d'ADNmt en cervell en ratolins de 5 dies d'edat va ser similar entre ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}*, mentre que els ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* presentaven el mateix grau de depleció (Figura 5.77 a). En fetge (Figura 5.77 b) i en cor (Figura 5.77 c) cap dels grups de ratolins estudiats presentava depleció.

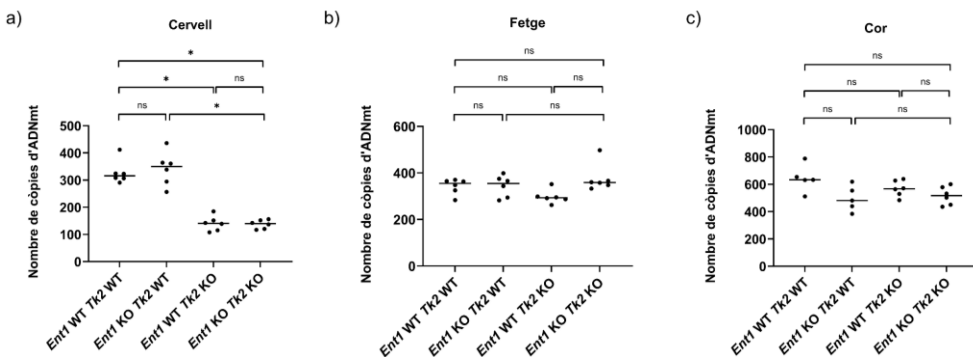


Figura 5.77. Nombre de còpies d'ADNmt en ratolins de 5 dies d'edat. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula en mostres de cervell (a), fetge (b) i cor (c) de ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{+/+}* (*Ent1* WT *Tk2* WT), *Ent1^{-/-}Tk2^{+/+}* (*Ent1* KO *Tk2* WT), *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* (*Ent1* WT *Tk2* KO) o *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* (*Ent1* KO *Tk2* KO) als 5 dies d'edat. Els punts corresponen als valors individuals de cada ratolí i la línia a la mediana del grup. Test estadístic: Kruskal-Wallis. Quan hi ha diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) s'aplica el test de Dunn per comparar els diferents grups. * $p < 0,05$, ns: no significatiu.

En resum, exceptuant la depleció d'ADNmt en cervell als 5 i 12 dies d'edat deguda a l'absència de TK2 (que és igual tant en presència com en absència d'ENT1), no es van observar diferències importants en la quantitat d'ADNmt en els altres teixits estudiats, ni es va veure cap efecte rellevant degut a l'absència d'ENT1 en cap teixit. Aquestes dades indiquen que les diferències de supervivència entre els ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* no s'expliquen per diferències en el nombre de còpies d'ADNmt en els teixits analitzats, almenys en les dues edats estudiades.

6. DISCUSSIÓ

Les MDDS constitueixen un grup de malalties causades per mutacions en gens de codificació nuclear que participen en el manteniment de l'ADNmt a través de diferents mecanismes. A nivell molecular, aquestes síndromes causen depleció, delecions múltiples o mutacions puntuals sobre l'ADNmt en els teixits més afectats que porten a una disfunció mitocondrial i a les diferents patologies associades⁷². A més, les MDDS tenen una incidència i prevalença molt baixa, fet que les converteix en malalties minoritàries. Això, sumat a la seva gran variabilitat fenotípica, fa que siguin difícils de diagnosticar. Tot i així, en els últims anys gràcies al desenvolupament de la seqüenciació massiva, que permet seqüenciar diversos gens associats a aquestes síndromes en pacients amb sospita clínica de patir-les, s'ha pogut donar un diagnòstic en molts casos. Igualment, es van descrivint casos de MDDS associats a nous gens.

El fet que aquestes malalties siguin minoritàries té una segona conseqüència, que és la dificultat en la seva recerca, ja sigui en la identificació dels seus mecanismes fisiopatològics com en el desenvolupament de teràpies, ja que el nombre de pacients, mostres i estudis que es poden realitzar és limitat. Tant és així, que s'han identificat alguns gens que causen MDDS però no es sap com aquests participen en el manteniment de l'ADNmt, cosa que dificulta el desenvolupament de teràpies dirigides a corregir-ne l'alteració molecular. A més, la recerca i desenvolupament de teràpies específiques és molt escassa degut al nombre reduït de pacients i els tractaments actuals es limiten a corregir alguns dels símptomes associats a la malaltia.

Un dels tractaments que té potencial per a tractar les MDDS són els dNs. L'ús de dNs s'ha proposat com a teràpia per a MDDS causades per mutacions en gens associats al metabolisme de dNTPs com són *DGUOK*^{85,312}, *TK2*^{316,317} o *RRM2B*³²¹, de manera que aquests compostos són convertits a dNTPs per la via de salvament citosòlica i posteriorment entren al mitocondri estimulant la replicació de l'ADNmt. De fet, aquest tractament s'ha donat de forma compassiva en pacients amb dèficit de TK2 obtenint bons resultats³¹⁸ i actualment està en fase d'assaig clínic.

En el laboratori on s'ha desenvolupat aquesta tesi es va veure que el tractament amb dNs també estimulava la replicació de l'ADNmt en cèl·lules portadores de mutacions en *POLG*²³³,

que codifica la polimerasa gamma i que no participa directament en el metabolisme de dNTPs (entenent com a tal la seva síntesi o degradació). Aquestes dades suggereixen que els dNs actuen de dues formes que poden ser complementàries. Per una banda, els dNs causen un augment de dNTPs revertint la falta d'aquells causada pel defecte molecular. Aquest seria el cas del tractament amb dCtd + dThd per al dèficit de TK2^{316,317} o el cas del tractament amb dAdo + dGuo en cèl·lules amb dèficit de dGK^{85,312}. Per altra banda, l'increment dels dNTPs, que són el substrat del replisoma, podria estimular la replicació de l'ADNmt. Aquest seria el cas del tractament amb els 4 dNs en les cèl·lules amb dèficit de POLG²³³. De fet, el tractament amb dNs (dCtd + dThd) aconsegueix augmentar la quantitat d'ADNmt en fetge i múscul esquelètic fins i tot en animals WT³¹⁷, fet que dona suport al caràcter estimulador de la replicació de l'ADNmt per part dels dNTPs, inclús quan no hi ha cap gen mutat. Com que aquest últim efecte és independent de si els gens afectats participen en el metabolisme de dNTPs o en altres funcions relacionades amb el manteniment de l'ADNmt, en aquesta tesi s'ha proposat i estudiat l'expansió del tractament amb dNs en altres MDDS, independentment del rol que té el gen mutat sobre el manteniment de l'ADNmt i s'ha avaluat la seva eficàcia en diferents models *in vitro* (fibroblasts amb mutacions en diferents gens associats a MDDS, Taula 4.1) i un model *in vivo* (ratolí *Dguok*^{-/-}).

Tal com s'ha indicat, el tractament amb dNs causa un increment de les concentracions dels dNTPs. En el cas del tractament amb el dN o dNs relacionats amb el gen mutat, com és el cas de l'administració dels dNs de pirimidina en el dèficit de TK2 o dels dNs de purina en el dèficit de dGK, es produeix un increment asimètric de les concentracions dels dNs³¹⁷ i, en conseqüència, dels dNTPs a favor del compost administrat. Aquest increment asimètric també s'ha observat *in vitro* quan es donen els 4 dNTPs²³³, probablement, per diferències en l'entrada i/o metabolisme d'aquests en la cèl·lula. Tant l'increment dels 4 dNTPs com l'increment d'algun d'ells i la consegüent alteració de l'estequiometria entre els dNTPs pot resultar genotòxica¹²⁶, per aquest motiu una part substancial d'aquesta tesi ha estat dedicada a explorar la seguretat gènica del tractament en models *in vitro*, *in vivo* i en sang de pacients amb dèficit de TK2 que han estat tractats de forma compassiva.

Finalment, tenint en compte que la baixa biodisponibilitat dels dNs és una de les dificultats que poden determinar la viabilitat d'aquest tractament³¹⁷, en aquesta tesi hem intentat

aportar algun resultat que ajudi a entendre millor com els dNs poden arribar als teixits afectats. Donat que els dNs entren a la cèl·lula i al mitocondri per transportadors específics i aprofitant que teníem accés a un ratolí KO per un d'aquests transportadors (el ratolí *Ent1*^{-/-}) s'ha estudiat el paper que juga aquest transportador en l'entrada dels dNs administrats com a tractament.

6.1. Eficàcia dels dNs per al tractament de MDDS

En aquesta tesi l'eficàcia del tractament amb dNs ha estat explorada *in vitro* en fibroblasts primaris de pell de pacients en estat de quiescència. Aquest tipus cel·lular s'ha utilitzat en multitud d'estudis de MDDS, ja que són unes cèl·lules fàcils d'obtenir mitjançant una biòpsia relativament poc invasiva. El model cel·lular de fibroblasts té dos principals inconvenients quan s'estudia la fisiopatologia de les MDDS.

El primer inconvenient és que aquestes cèl·lules no formen part dels principals òrgans afectats en la malaltia i, per tant, moltes vegades no mostren els trets característics de les MDDS com són la depleció, deleccions múltiples o mutacions puntuals sobre l'ADNmt. Tant és així, que cap línia de fibroblasts utilitzada en aquesta tesi ha presentat deleccions múltiples, mentre que aquestes sí que són presents en el múscul esquelètic de molts dels pacients amb MDDS. A més, només un nombre reduït de fibroblasts ha mostrat depleció de l'ADNmt sense necessitat d'induir-la (el que s'anomena depleció espontània), que han estat les cèl·lules amb mutacions en *DGUOK* i *MPV17*, tal com s'havia reportat prèviament^{85,217} i una de les tres línies cel·lulars amb mutacions en *SUCLG1*. El fet que totes les cèl·lules analitzades amb mutacions en *DGUOK* i *MPV17* mostrin depleció espontània, mentre que la resta de cèl·lules amb mutacions en altres gens no la mostren, semblaria indicar que la funció d'aquests dos gens és molt important per al correcte manteniment de l'ADNmt tant en fibroblasts com en els teixits més afectats dels pacients. El fet que només una de les tres línies analitzades amb mutacions en *SUCLG1* mostri depleció espontània podria ser degut a que diferents mutacions s'associïn a diferent afectació dels teixits i/o gravetat, tot i que no hem trobat cap treball que estudiï aquesta possible correlació genotip/fenotip en una malaltia tan poc freqüent com la causada per mutacions en *SUCLG1*. També pot ser que els pacients que manifesten depleció de l'ADNmt en fibroblasts siguin portadors de polimorfismes en algun

gen relacionat amb el manteniment de l'ADNmt que afavoreix la presència del fenotip de la malaltia en fibroblasts. Pel que fa a l'aparició de mutacions puntuals somàtiques sobre l'ADNmt, només les hem observat clarament augmentades en els fibroblasts amb mutacions en *TYMP* (que causen MNGIE), tal com passa en altres teixits dels pacients¹³³. La resta de fibroblasts dels pacients no han mostrat un increment de mutacions puntuals somàtiques sobre l'ADNmt, la qual cosa concorda amb que tampoc s'hagi descrit a la literatura un augment de mutacions sobre el genoma mitocondrial en altres teixits dels pacients causats per les mutacions patogèniques en el gens associats a MDDS.

Encara que no està clar perquè els fibroblasts no mostren els trets fenotípics moleculars (depleció, deleccions múltiples i mutacions puntuals) que sí que manifesten els teixits més afectats en els pacients, una possible explicació podria estar relacionada amb les diferències en el metabolisme de dNTPs, que varia segons el tipus cel·lular. D'aquesta manera, els fibroblasts tindrien un metabolisme que aportaria els dNTPs suficients per al correcte manteniment de l'ADNmt, mentre que les cèl·lules més afectades no. Aquestes diferències també podrien ser degudes a diferències d'expressió tissular de proteïnes clau per al correcte manteniment de l'ADNmt.

La segona limitació dels fibroblasts per estudiar les MDDS és que aquests són cèl·lules replicatives, tot i tenir una taxa replicativa baixa i proporcions modestes de cèl·lules en fase S en el cultiu. Per contra, la majoria dels teixits afectats en els pacients són teixits postmitòtics, com el cervell o el múscul esquelètic. Aquesta limitació s'ha superat cultivant les cèl·lules en absència de factors de creixement, és a dir, posant el FBS a una concentració molt baixa (0,1%) i portant a terme els experiments en cultius confluents, que inhibeixen el creixement cel·lular per contacte. Aquestes dues condicions fan que els fibroblasts entrin en quiescència.

A més, el cultiu de les cèl·lules en estat de quiescència presenta una altra peculiaritat que resulta adient per al tipus d'estudis desenvolupats en aquesta tesi. Durant la fase S les concentracions dels dNTPs són més altes que en la resta del cicle cel·lular degut a la contribució de la síntesi *de novo*⁸⁰. En condicions replicatives l'aportació exògena de dNs no causaria un increment molt pronunciat dels dNTPs (expandits a través de la ruta de

salvament a partir dels dNs), ja que aquest increment es veuria diluït per la síntesi *de novo*, que com s'ha mencionat anteriorment, és quantitativament més important en la fase S. En canvi, en condicions de quiescència, la ruta *de novo* és minoritària en comparació amb la ruta de salvament i els dNTPs són més baixos, de manera que la suplementació amb dNs té un impacte en les concentracions de dNTPs a través de la seva fosforilació per la via de salvament citosòlica i mitocondrial. Cal puntualitzar que tot i que en aquesta tesi no s'han mesurat els dNTPs en les cèl·lules quan s'administrava el tractament amb dNs, es tenen dades prèvies en el laboratori, on utilitzant el mateix disseny experimental, s'observaven increments en els dNTPs intracel·lulars derivats de la suplementació amb dNs, tant en fibroblasts controls com en fibroblasts amb mutacions en *POLG*²³³. També es tenen dades d'un altre treball que mostren que els dNs administrats marcats amb diferents isòtops s'acaben incorporant a l'ADN³²⁸.

En aquesta tesi es volia estudiar l'efecte dels dNs sobre la depleció de l'ADNmt i, per tant, era necessari que les cèl·lules mostressin aquest fenotip molecular. Com que només 6 línies de fibroblasts mostraven depleció espontània, només s'ha pogut estudiar directament l'efecte dels dNs sobre el nombre de còpies d'ADNmt en aquestes línies, sense necessitat d'induir la depleció amb BrEt. Els resultats mostren que el tractament amb dNs reverteix la depleció en tots els casos, coincidint amb el que s'havia reportat prèviament per mutacions en *DGUOK*⁸⁵ i en *MPV17*²¹⁷. En aquesta tesi mostrem per primera vegada que els dNs eviten la depleció d'ADNmt en cèl·lules amb mutacions en *SUCLG1*, tot i que només ho hem pogut observar en una de les tres línies estudiades amb mutacions en aquest gen, que també era l'única de les 3 línies que mostrava un fenotip de replicació disfuncional de l'ADNmt (tant en el disseny de depleció espontània com induïda).

En tot cas, aquests resultats indiquen que els dNs poden ser utilitzats per evitar la depleció de l'ADNmt causada per mutacions en gens associats al metabolisme de dNTPs, com és el cas de *DGUOK*, però també en MDDS causades per mutacions en gens no relacionats directament amb el metabolisme de dNTPs, com és el cas de mutacions en *MPV17* i per determinades mutacions en *SUCLG1*.

Per a la resta de línies de fibroblasts, que no han presentat depleció espontània, ha calgut induir depleció de l'ADNmt amb BrEt. Aquest compost és un agent intercalant que indueix superenrotllament sobre l'ADN, cosa que impedeix l'accés dels factors de transcripció i que es creu que també ho fa per a la replicació^{250,253}. Això afecta al manteniment de l'ADNmt, ja que s'impedeix la seva síntesi però no necessàriament la seva degradació, cosa que porta a la depleció. De fet, experiments portats a terme en aquesta tesi i en altres grups²⁵² han mostrat que la coadministració de dNs amb BrEt no evita la depleció de l'ADNmt induïda per aquest agent intercalant, contràriament al que passa quan primer s'incuba solament amb BrEt, s'elimina i posteriorment s'incuba amb dNs²³³. Tal i com es pot veure en els nostres resultats, si existeix un efecte estimulador de la replicació de l'ADNmt per part dels dNs es dona exclusivament en la fase de recuperació, en absència de BrEt. Aquest efecte, segurament, es deu a que encara que els dNs puguin estimular la maquinària de replicació, aquesta no pot accedir a l'ADNmt degut al superenrotllament induït per l'exposició contínua al BrEt.

A part de la interferència en la replicació de l'ADNmt, que és el que interessa per estudiar l'efecte dels dNs sobre l'ADNmt, s'ha observat que el BrEt té influència sobre l'expressió gènica en cèl·lules en cultiu. En estudis portats a terme en cèl·lules mare neurals induïdes (iNSCs) a partir de fibroblasts s'ha observat una expressió diferencial en gens relacionats amb l'autofàgia, mitofàgia i gens implicats en vies metabòliques, entre les quals es troben les vies de metabolisme de purines i pirimidines²⁵². Aquest efecte, però, és transitori i en retirar el BrEt, els gens diferencialment expressats tornen als mateixos nivells d'expressió que abans d'incubar amb aquest agent químic.

Com que el possible efecte dels dNs en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt només es pot veure incubant primer amb BrEt per induir depleció de l'ADNmt i eliminant-lo després per incubar amb els dNs, s'ha seguit aquesta estratègia per estudiar l'efecte dels dNs sobre l'ADNmt en cèl·lules que no presenten depleció espontània. Un cop induïda la depleció i retirat el BrEt del cultiu els fibroblasts han actuat de dues maneres diferents.

El primer comportament observat en retirar el BrEt s'ha donat en la majoria de fibroblasts estudiats (totes les cèl·lules amb mutacions en *TWINK*, *DNA2*, *RRM2B*, *SPG7*, *SUCLA2* i la

majoria de cèl·lules amb mutacions en *OPA1* i *SUCLG1*) i consisteix en que les cèl·lules són capaces de recuperar el nombre inicial de còpies d'ADNmt en retirar el BrEt i no mantenen la depleció al llarg del temps. Aquest comportament és idèntic al que presenten les cèl·lules derivades de controls sans i no evidencia cap defecte en la recuperació de l'ADNmt.

El segon comportament observat en retirar el BrEt del medi de cultiu s'ha donat en només 3 línies de pacients: l'única línia amb mutacions en *RNASEH1* (P5), una de les cinc línies amb mutacions en *OPA1* (P22) i una de les tres línies amb mutacions en *SUCLG1* (P31). Aquest comportament consisteix en que les cèl·lules no són capaces de revertir la depleció de l'ADNmt quan es retira el BrEt del medi de cultiu. Aquesta observació ja s'havia fet prèviament en el laboratori pel cas de cèl·lules portadores de mutacions en *RNASEH1*³²⁹ i s'havia reportat una recuperació parcial en uns fibroblasts amb unes mutacions diferents¹⁷⁴. També és un comportament que hem observat sempre en fibroblasts derivats de pacients amb variants patogèniques en *POLG*²³³.

Els motius pels quals unes cèl·lules mostren fenotip de depleció i altres no en retirar el BrEt, no estan clars. El fet que la depleció es mantingui en una de les tres línies amb mutacions en *SUCLG1* i en una de les cinc línies amb mutacions en *OPA1* suggereix que la capacitat de revertir la depleció després d'eliminar el BrEt no és únicament depenent del gen, sinó que poden participar altres factors, entre els qual es troba la mutació concreta que afecta al gen. De fet, les cèl·lules amb mutacions en *SUCLG1* que han mantingut la depleció després d'eliminar el BrEt han estat les mateixes que mostraven depleció espontània de l'ADNmt i aquestes tenen les variants patogèniques en homozigosi, mentre que les cèl·lules que no han mostrat fenotip de depleció les tenen en forma d'heterozigosi. Pel cas d'*OPA1*, la presència de depleció en retirar el BrEt també es podria deure al tipus de mutació i a la gravetat de la malaltia que causa, ja que les cèl·lules que presenten depleció en retirar el BrEt provenen d'un pacient infantil. Un factor addicional que podria explicar la presència o absència de fenotip de depleció en retirar el BrEt seria la presència de polimorfismes en altres gens que participen en el manteniment de l'ADNmt que predisposessin o protegissin contra la depleció, tal com s'ha comentat anteriorment.

Les cèl·lules que no mostraven fenotip de depleció en retirar el BrEt han impedit estudiar l'efecte dels dNs sobre l'ADNmt utilitzant aquesta aproximació experimental. En aquests casos caldria fer ús d'altres models cel·lulars o de models *in vivo* que mostressin una clara depleció mantinguda en el temps per obtenir dades concloents. Un exemple d'aquesta situació no concloent és el dèficit de TK2: els fibroblasts de pacients amb mutacions en *TK2* són capaços de revertir la depleció quan es retira el BrEt en absència de dNs²⁵⁵ impossibilitant veure l'efecte dels dNs *in vitro* (Figura Suplementària 21), però fent ús de dos models diferents de ratolins amb dèficit de TK2 que mostren un clar fenotip de depleció en alguns teixits s'ha vist que aquests compostos tenen un paper estimulador en la replicació de l'ADNmt^{316,317} i, de fet, el seu ús en pacients ha demostrat ser eficaç a nivell clínic, tot i no haver-se pogut mesurar la quantitat d'ADNmt en els pacients³¹⁸. Així doncs, l'absència de fenotip de depleció en retirar el BrEt no és indicatiu de que el tractament amb dNs no pugui ser efectiu en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt. De fet, malgrat aquesta absència de fenotip, en alguns casos s'ha pogut observar un cert efecte estimulador per part dels dNs (el cas de cèl·lules amb mutacions en *DNA2* (P4) i *RRM2B* (P6 i P7) discutit més endavant).

El comportament de les 3 línies de pacients que no recuperaven el nombre de còpies d'ADNmt en retirar el BrEt ha permès veure si els dNs estimulen la replicació de l'ADNmt. En el cas dels fibroblasts amb mutacions en *SUCLG1* i *OPA1* el tractament ha revertit la depleció totalment o parcial, apuntant a l'eficàcia dels dNs en l'estimulació de l'ADNmt en MDDS causades per mutacions en gens no involucrats directament en el metabolisme de dNTPs. El fet que algunes cèl·lules amb unes mutacions en el mateix gen mostrin depleció i la reverteixin amb l'ús de dNs mentre que altres cèl·lules amb mutacions diferents en el mateix gen no mostrin depleció i no es pugui veure l'efecte dels dNs, obre la porta a pensar que l'eficàcia dels dNs pugui ser depenent de la mutació, fent que alguns pacients es puguin beneficiar del tractament mentre que d'altres no, cosa que caldria corroborar en algun altre model experimental que mostri una clara depleció de l'ADNmt. Pel cas de *SUCLG1* no hi ha cap model animal on es pugui estudiar l'efecte dels dNs però pel cas d'*OPA1*, sí. El model de ratolí d'*Opa1* té alterat el *splicing* en heterozigosi i resulta en haploinsuficiència de la proteïna²⁸⁰. Tot i que quan s'ha analitzat el nombre de còpies d'ADNmt en mostres d'orella del ratolí no s'ha observat depleció de l'ADNmt, podria ser que sí que en tingués en altres

teixits més greument afectats en el dèficit d'OPA1, com podrien ser les cèl·lules de la retina, cosa que no s'ha estudiat.

Les altres cèl·lules que han mostrat depleció en retirar el BrEt, les cèl·lules amb mutacions en *RNASEH1*, no han revertit la depleció amb la presència dels dNs apuntant a la ineficàcia d'aquests en estimular la replicació de l'ADNmt. Aquest ha estat l'únic cas on havent fenotip de depleció després de retirar el BrEt no s'observa efecte terapèutic per part dels dNs. Això es pot deure al mecanisme d'acció que postulem per als dNs, que consisteix en l'estimulació de l'activitat del replisoma a través de l'activació de la polimerasa gamma per augment de disponibilitat del seu substrat (els dNTPs). Com que la endonucleasa *RNASEH1* actua en el procés de replicació de l'ADNmt abans que la POLG³⁸ es tracta d'un pas limitant anterior al moment en el qual els dNs tenen el seu efecte estimulador de la replicació, de manera que aquests ja no poden fer la seva funció en les cèl·lules amb variants patogèniques en *RNASEH1*.

Tot i que, com s'ha indicat abans, les línies cel·lulars que restitueixen normalment el nombre de còpies d'ADNmt després de l'eliminació del BrEt no constitueixen un bon model per a estudiar l'efecte dels dNs, els nostres resultats obtinguts amb mutants en *RRM2B* i *DNA2* ens van obligar a matisar aquesta afirmació. En aquests casos, tot i que les cèl·lules han estat capaces de recuperar el nombre inicial de còpies d'ADNmt sense presència de dNs, ho han fet més ràpid quan aquests hi eren presents. De fet, uns resultats similars es van obtenir en un primer estudi sobre mutacions en *RRM2B*³²¹. Aquests resultats suggereixen un efecte estimulador en la replicació de l'ADNmt per part dels dNs per a les mutacions en aquests gens. Tot i així, caldria confirmar aquests resultats en un model que presenti una clara depleció, ja sigui *in vitro* o *in vivo*. Encara que no hi ha descrit cap model animal amb afectacions en *DNA2*, sí que existeix un ratolí KO per *RRM2B*²⁷⁵, el qual no s'ha estudiat si té depleció de l'ADNmt, però sí que presenta depleció de les quantitats de dNTPs i té una supervivència de 85 dies, de manera que estudiant aquestes variables amb la presència de tractament es podrien tenir dades preclíniques sobre l'eficàcia dels dNs en el dèficit de p53R2 (codificat per *RRM2B*).

A part dels estudis d'eficàcia dels dNs *in vitro*, en aquesta tesi s'ha explorat també la seva eficàcia *in vivo* en el model de ratolí KO per *Dguok*²⁶⁷, de forma similar al que s'havia fet pel cas de TK2 en altres estudis^{316,317}. A nivell mitocondrial hi ha dos enzims que catalitzen el pas limitant en la via de salvament del metabolisme de dNTPs. Per una banda, la TK2 s'encarrega de fosforilar dCtd i dThd cap a dCMP i dTMP i per altra banda la dGK s'encarrega de fosforilar dAdo i dGuo cap a dAMP i dGMP (Figura 2.4). Mutacions en qualsevol dels dos gens causen MDDS^{188,192} i en el cas de la TK2 la teràpia amb dCtd i dThd ha allargat la supervivència i ha incrementat la quantitat d'ADNmt en dos models diferents de ratolins amb dèficit de TK2^{316,317}. En vista d'aquests resultats i d'altres obtinguts en cèl·lules amb mutacions en *DGUOK* tractades amb dNs de purina⁸⁵ s'esperaria que el tractament amb dAdo i dGuo també funcionés pel dèficit de dGK d'igual forma que ho ha fet pel dèficit de TK2^{316,317}.

El model de ratolí *Dguok*^{-/-} presenta una depleció quasi total de l'ADNmt en fetge i molt pronunciada en múscul esquelètic i cervell, tal com es va reportar en la descripció inicial d'aquest model²⁶⁷. Aprofitant aquest tret fenotípic hem fet ús d'aquests ratolins per estudiar l'efecte dels dNs sobre el nombre de còpies d'ADNmt com a biomarcador de la seva eficàcia. Quan hem estudiat la quantitat d'ADNmt en absència de tractament en aquests ratolins hem trobat uns graus de depleció de l'ADNmt en fetge, múscul esquelètic i cervell similars als reportats originalment²⁶⁷. En canvi, no hem trobat depleció en cor, a diferència del que s'havia descrit pels autors que van generar el model²⁶⁷. El nombre de ratolins estudiats en el report original era molt reduït (n=3), en comparació al nostre (n=10), la qual cosa suggereix que la depleció en cor originalment reportada podria ser un artefacte degut a una mostra reduïda. Resulta molt remarcable que, tot i que vam trobar una depleció del 55% en cervell i del 75% en el múscul esquelètic, els ratolins no presenten alteracions en la mobilitat o comportament, encara que aquest últim no ha estat estudiat en profunditat^{267,289}. Resulta encara més sorprenent que amb una depleció quasi total en el fetge (superior al 95%) els ratolins tinguin una supervivència normal sense afectacions hepàtiques greus, tret d'alteracions en les transaminases i augment de la proliferació cel·lular^{267,289}. Aquestes dades indiquen la presència de mecanismes compensatoris molt eficaços per a la falta d'ADNmt en aquests tres teixits, com podria ser l'augment de la vida mitjana dels ARNm i proteïnes que són codificades per aquest genoma²⁶⁷. L'altre model de ratolí amb dèficit de

dGK²⁷⁹, el KI *Dguok*^{F180S/F180S}, té una depleció en cervell i fetge similar a l'observada en el model KO utilitzat en aquesta tesi, però té quantitats normals d'ARNm de gens codificats en l'ADNmt²⁷⁹. Aquest fet explica que els animals siguin viables tot i tenir una depleció molt profunda.

La mesura dels dNTPs mitocondrials en els ratolins *Dguok*^{-/-} en absència del tractament ha mostrat que tant en el fetge com en el cervell hi ha una davallada de la quantitat de dGTP, però no de dATP, ni de la resta de dNTPs, apuntant a que la depleció en l'ADNmt en el dèficit de dGK està causada per la depleció del dGTP, que és el dNTP majoritari en els mitocondris dels dos teixits estudiat en animals WT. Aquesta troballa també ha estat descrita prèviament en fibroblasts d'un pacient amb mutacions en *DGUOK*³¹². Un resultat addicional que recolza que la reducció del dGTP causa la depleció de l'ADNmt és que la reducció del dGTP correlaciona amb el grau de depleció en dos teixits diferents (fetge i cervell).

En aquests ratolins s'ha descrit l'augment de l'expressió de les subunitats RRM1 i RRM2 de la RNR (enzim regulador de la síntesi *de novo* dels dNTPs) com a possible mecanisme compensatori de l'alteració del metabolisme dels dNTPs²⁶⁷. Aquest mecanisme, però, no sembla suficient per corregir les alteracions en els dNTPs mitocondrials, o almenys, la caiguda de la quantitat del dGTP i en conseqüència la depleció de l'ADNmt. En canvi, no podem descartar que aquest mecanisme contribueixi a evitar el dèficit de dATP, almenys en el fetge, ja que, paradoxalment, en aquest òrgan els ratolins *Dguok*^{-/-} tenen quantitats de dATP més elevades que als animals *Dguok*^{+/+}.

En aquesta tesi hem assajat l'ús de dAdo + dGuo com a tractament pel dèficit de dGK en ratolins. El fet de que els ratolins *Dguok*^{-/-} tinguin només el dGTP reduït en fetge i cervell i que l'administració de només la dGuo en fibroblasts de pacients amb variants patogèniques en *DGUOK* hagi evitat la depleció⁸⁵ sembla indicar que només amb l'administració de dGuo es podria corregir el dèficit de dGK. El dèficit aïllat de dGTP (i no de dATP) *in vivo* es va observar per primer cop quan s'analitzaven les dades de ratolins tractats en paral·lel amb vehicle o dAdo + dGuo i no s'hi havia introduït en el disseny un tercer grup tractat només amb dGuo, cosa que valdria la pena explorar en el futur. Tot i que es tracta d'un organisme totalment diferent, és interessant esmentar que quan s'ha administrat dGuo sola en el

model de dèficit de dGK en peix zebra s'ha produït depleció de l'ADNmt en larves i quan s'ha administrat la combinació de dAdo + dGuo s'ha revertit la depleció només en el fetge de peixos adults. En aquest model, però, no s'han mesurat els dNTPs i no es sap quins es troben reduïts²⁶⁴. Tot això posa de manifest la complexitat de les xarxes de síntesi, salvament i degradació dels dNs en la seva regulació i interconnexions, i la dificultat de treure conclusions vàlides per a tots els òrgans i organismes.

L'administració de dAdo + dGuo en ratolins *Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-} no ha tingut cap impacte sobre l'ADNmt en cap dels òrgans analitzats (fetge, múscul esquelètic, cervell i cor), de manera que els animals amb dèficit de dGK seguien mostrant la mateixa depleció de l'ADNmt en els teixits que inicialment la mostraven (fetge, múscul esquelètic i cervell). Aquest va ser un resultat inesperat, ja que totes les dades obtingudes amb cèl·lules de pacients amb dèficit de dGK havien mostrat eficàcia del tractament amb dNs, tant en aquesta tesi com en estudis previs^{85,312}. Els animals WT tractats amb dAdo + dGuo, a diferència del que passa quan es tracta amb dNs de pirimidina³¹⁷, tampoc han augmentat la quantitat d'ADNmt.

Entre els factors que podrien contribuir a la manca d'efecte dels dNs purínics sobre l'ADNmt es troba la seva reduïda biodisponibilitat, molt inferior a la dels dNs pirimidínics, tal i com indiquen els nostres resultats en comparació amb els obtinguts per a pirimidines en experiments similars³¹⁷.

La baixa biodisponibilitat dels dNs de purina ha estat confirmada quan s'han mesurat les quantitats de dAdo + dGuo en plasma i fetge, després de la seva administració oral. Hem vist que les concentracions d'aquests són indetectables en el plasma d'ambdós genotips (*Dguok*^{+/+} i *Dguok*^{-/-}). Tot i que en fetge sí que els hem pogut detectar, no vam trobar un augment de la seva quantitat degut al tractament. De fet, l'impacte de la dAdo + dGuo exògena ha estat tan baix que el lleuger augment de dAdo observat en ratolins *Dguok*^{-/-} és el mateix siguin tractats o no tractats. A més, en el plasma dels animals tractats hem detectat un augment dels productes de degradació dIno en els dos genotips i de xantina i hipoxantina, en els animals *Dguok*^{-/-}, indicant que els dNs administrats s'estan degradant. En fetge, per contra, no hem observat un augment dels productes de degradació, suggerint que aquesta no es dona només a nivell hepàtic. De fet, experiments recents portats a terme en el nostre

laboratori on s'administra dAdo + dGuo per sonda oral a ratolins WT i es mesura una hora després la seva concentració en sang obtinguda de la vena porta (que representa la sang que conté el que s'ha absorbit a nivell intestinal abans de passar pel fetge) mostren que aquests compostos pateixen una ràpida degradació durant el procés d'absorció intestinal i/o en sang abans d'arribar al fetge.

Per tant, la baixa biodisponibilitat dels dNs purínics és molt probablement un factor determinant de la seva absència d'efecte *in vivo*. A més, un altre factor que cal tenir en compte i que pot tenir influència és que el tractament amb dNs de pirimidina d'estudis anteriors que va estimular la replicació de l'ADNmt es va administrar a una dosi de 400 mg/kg/dia³¹⁷, mentre que el tractament amb dNs de purina d'aquesta tesi s'ha administrat a una dosi de 200 mg/kg/dia, degut a la reduïda solubilitat d'aquests compostos en comparació amb els dNs pirimidínics.

De tota manera, la baixa biodisponibilitat no pot ser l'única causa de la manca d'efecte del tractament en aquest model, ja que el tractament amb dAdo + dGuo sí que va induir un augment de dGTP (però no pas de dATP) en el fetge dels ratolins *Dguok*^{+/+}. Aquest augment, però, no es va observar en ratolins *Dguok*^{-/-}, posant de manifest que l'activitat de dGK és necessària per l'expansió del dGTP observada en ratolins WT en resposta a l'administració de dAdo + dGuo. El fet que el dATP no hagi patit un augment (a diferència del dGTP) es pot deure a que la dGK (almenys la humana) té més afinitat per fosforilar la dGuo que la dAdo³³⁰.

En aquest punt, cal recordar que el mecanisme terapèutic dels dNs pirimidínics per al dèficit de TK2 té lloc mitjançant la fosforilació de dThd i dCtd a través de TK1 i dCK (enzims citosòlics equivalents de la TK2). En el cas del dèficit de dGK, els dNs purínics dAdo i dGuo administrats haurien de ser fosforilats per l'equivalent citosòlic de la dGK, la dCK. D'aquesta manera, s'obtingrien monofosfats de purina que serien addicionalment fosforilats cap a dNTPs, disponibles per a entrar com a nucleòtids, en els seus diferents graus de fosforilació, al mitocondri tot augmentant el contingut mitocondrial de dATP i dGTP, suplint la manca d'activitat de la dGK. Un mecanisme addicional que contribuiria a la manca d'efecte dels dNs de purina en el context del ratolí amb dèficit de dGK podria estar relacionat amb l'enzim implicat en el seu efecte terapèutic: la dCK. Una insuficiència de la dCK (degut a una baixa

expressió o a les seves propietats cinètiques), podria justificar que en el fetge dels ratolins *Dguok*^{-/-} el tractament no aconsegueixi expandir el dGTP, a diferència del que s'observa en els ratolins *Dguok*^{+/+}. Existeixen molt poques dades del grau d'expressió o cinètica enzimàtica de les formes murines d'aquests enzims. Pel que fa a les formes humanes, l'enzim dGK mostra una K_m inferior per la dGuo (K_m de 0,5 μ M) en comparació amb la dCK (K_m de 100 μ M)³³¹. Si assumim, amb totes les precaucions, que les formes murines presenten afinitats relatives similars a les formes humanes, podem suposar que la dGuo administrada és fosforilada principalment per la dGK en els animals *Dguok*^{+/+} causant l'augment del dGTP observat en fetge d'aquests animals. Per contra, en els ratolins *Dguok*^{-/-} la dGuo només pot ser fosforilada per la dCK, que té menys afinitat que la dGK per la dGuo, fet que pot explicar que no hi hagi un augment del dGTP en aquests animals. D'altra banda, les dades que podem trobar en el recurs *Human Protein Atlas* (proteintlas.org)³³², indiquen que dCK es troba molt poc expressada en fetge, en comparació amb altres teixits.

En conjunt, les dades obtingudes en el model de ratolí de dèficit de dGK semblen indicar que la depleció de l'ADNmt en els ratolins *Dguok*^{-/-} es deu a la depleció del dGTP, suggerint que només amb l'administració de dGuo es podria corregir aquesta, tot i que caldria comprovar-ho experimentalment. Per altra banda, l'administració de dAdo + dGuo ha resultat ineficaç en la reversió de la depleció manifestada en el model animal i entre els factors que podrien justificar la manca d'eficàcia es troben la seva baixa biodisponibilitat i la possible insuficiència de l'enzim citosòlic dCK. Així doncs, caldria buscar alguna alternativa per augmentar la biodisponibilitat dels dNs de purina, que a diferència dels de pirimidina³¹⁷, són molt inestables *in vivo*. Una forma seria la coadministració dels dos dNs amb inhibidors de la seva degradació (EHNA per a evitar la degradació de la dAdo per l'enzim ADA i immucilina H per evitar la degradació de la dGuo per l'enzim PNP). Aquesta estratègia cal explorar-la de forma cauta, ja que dèficits de l'activitat ADA i PNP donen lloc a greus immunodeficiències^{333,334}. Altres opcions podrien ser l'encapsulació dels dNs per evitar la seva ràpida degradació o l'ús de prodrogues que consisteix en l'ús del compost actiu amb alguna modificació química que li dona estabilitat, però que en entrar a la cèl·lula, els enzims d'aquesta modifiquen la molècula convertint-la en el compost actiu, en aquest cas els dNs.

De fet, s'ha vist que una prodroga del dGMP aconseguix rescatar la depleció de l'ADNmt en cèl·lules obtingudes de fetge de rata KO per *Dguok*, tot i que no s'ha provat *in vivo*³³⁵.

6.2. Seguretat gènica del tractament amb dNs

Tot i que l'ús de dNs i dNMPs s'ha assajat en múltiples línies cel·lulars amb mutacions en gens associats a MDDS, només dos treballs han explorat la seva seguretat gènica reportant absència d'inducció de mutacions sobre l'ADNmt²³³ o ADNn²⁵⁸. Com que en aquesta tesi s'ha avaluat l'eficàcia del tractament en múltiples models *in vitro* de MDDS causades per mutacions en diferents gens s'han pogut obtenir dades sobre la seguretat gènica dels dNs sobre l'ADNmt mitjançant NGS.

Tal com s'ha indicat en la introducció (Secció 2.2.5), l'augment de dNTPs pot resultar mutagènic per dos motius. El primer, per competició entre el dNTP complementari a la cadena motlle i la resta de dNTPs presents en excés que no són complementaris i el segon, per l'efecte de nucleòtid següent. Aquestes dues situacions només poden tenir lloc durant la replicació i/o reparació de l'ADN. Donat que el disseny experimental dels estudis d'eficàcia i seguretat gènica del tractament amb dNs *in vitro* s'han fet en condicions de quiescència on la divisió cel·lular i, per tant, la replicació de l'ADNn és nul·la, no s'espera que l'ADNn es vegi afectat per aquests mecanismes mutagènics derivats de l'excés de dNTPs, a excepció dels mecanismes de reparació de l'ADN. Per contra, com que l'ADNmt es replica independentment al cycle cel·lular³⁵, tant en condicions de proliferació com de quiescència, els dos mecanismes de mutagènesi per excés de dNTPs sí que poden tenir lloc en aquest genoma. És per aquest motiu que els estudis de seguretat gènica *in vitro* s'han limitat només a l'ADNmt.

Els nostres estudis de seguretat gènica *in vitro* sobre l'ADNmt utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt han mostrat que el BrEt no resulta mutagènic sobre l'ADNmt, almenys a la concentració utilitzada (25 ng/mL). Per altra banda, els estudis utilitzant el model de depleció espontània o induïda de l'ADNmt han mostrat que els dNs, tot i causar increments en les quantitats dels dNTPs d'acord amb treballs previs²³³, no indueixen deleccions múltiples ni mutacions noves sobre l'ADNmt. A més, observant els graus d'heteroplàsmia de les variants ja presents en les cèl·lules abans del tractament, tampoc s'han vist canvis en els

seus percentatges indicant que no s'expandeixen les variants preexistents en la mostra. Aquestes dades són d'especial interès en aquells casos on s'ha observat una estimulació de la replicació de l'ADNmt (cèl·lules amb mutacions en *DGUOK*, *MPV17*, *SUCLG1* (P31) i *OPA1* (P22)) i, per tant, una estimulació del replisoma pel seu substrat (els dNTPs), ja que l'augment de la seva activitat, ja sigui per la seva acceleració o per algun altre mecanisme, no compromet la seva fidelitat i/o activitat correctora.

Aquestes dades contrasten amb estudis *in vitro* previs on s'ha reportat que l'excés de dNTPs pot resultar genotòxic¹²⁶. Aquesta discrepància pot ser deguda a que, tot i que les concentracions dels dNs utilitzades en el nostre estudi són suficients per causar un augment dels dNTPs, aquest no és de suficient magnitud com per tenir un efecte deleteri en la replicació de l'ADNmt. D'aquesta manera, si s'utilitzessin concentracions més altes de dNs que causessin un impacte més gran en l'augment dels dNTPs potser sí que esperaríem inducció de mutacions sobre l'ADNmt i si les cèl·lules es trobessin en condicions de replicació, s'esperaria una aturada del cicle cel·lular³³⁶. Aquest podria ser el cas del treball que utilitza concentracions de dNs 4 vegades més altes (200 μ M) que en aquesta tesi (50 μ M), cosa que causa estimulació de la replicació de l'ADNmt, però també una reducció del potencial de membrana mitocondrial i més mortalitat cel·lular, és a dir, que resulten tòxics, encara que el mecanisme de la seva toxicitat no ha estat explorat³²⁸. En el mateix treball, utilitzant concentracions de 50 μ M, van desaparèixer els efectes tòxics, però es van mantenir els efectes estimuladors sobre la replicació de l'ADNmt, apuntant a l'eficàcia i seguretat gènica dels dNs a concentració 50 μ M en els models *in vitro*, que són les condicions emprades en aquesta tesi.

L'estudi de la seguretat gènica en els models *in vitro* també ha permès veure, que tot i que les mutacions en *TK2* presumiblement causen alteracions en els dNTPs i les mutacions en *DGUOK*³¹² o *RRM2B*³²¹ causen alteracions observades en els dNTPs, aquestes no s'associen a un increment de mutacions sobre l'ADNmt, almenys en els fibroblasts, de forma contrària al que passa en les cèl·lules portadores de mutacions en *TYMP* que causen MNGIE¹³³.

Els estudis *in vitro* realitzats en aquesta tesi presenten una limitació que és l'exposició curta al tractament amb dNs i que obre la porta a preguntar-se si una exposició contínua als dNs

durant períodes de temps més llargs podria donar lloc a mutacions sobre l'ADNmt. En el model de depleció espontània l'exposició màxima al tractament ha estat de només 30 dies, tot i que la qualitat de l'ADNmt s'ha estudiat als 20 dies d'exposició (t20), ja que als 30 dies (t30) algunes línies cel·lulars presentaven signes d'estrès i alta mortalitat (Figura 4.3). En el model d'inducció de depleció amb BrEt l'exposició màxima als dNs ha estat de 20 dies, però la qualitat de l'ADNmt s'ha estudiat als 10 dies d'exposició (t20) perquè als 20 dies d'exposició (t30) també hi havia signes d'estrès i mort cel·lular en algunes línies cel·lulars (Figura 4.2).

Fins on es tenen dades, l'associació entre l'excés de dNTPs i la seva mutagenicitat només s'ha estudiat àmpliament *in vitro* o *in vivo* utilitzant models unicel·lulars. L'efecte que pot tenir l'augment de dNTPs sobre la integritat o fidelitat de còpia de l'ADNmt en el context d'un organisme pluricel·lular ha estat menys estudiat i només coneixem dues situacions diferents. La primera, és el model de ratolí *Tk2*^{-/-} on s'ha introduït el transgèn que expressa la desoxinucleòsid kinasa de *Drosophila melanogaster* (*Dm-dNK*), ortòleg de *Tk2* en aquest organisme^{287,288}. La segona situació, són els pacients de MNGIE, on degut a mutacions en el gen *TYMP* hi ha un excés de dThd que resulta mutagènic¹³³. Donat el limitat nombre d'estudis en organismes pluricel·lulars vam aprofitar que en el laboratori on s'ha desenvolupat aquesta tesi s'havien tractat ratolins *Tk2*^{+/+} i *Tk2*^{-/-} amb dCtd + dThd per avaluar la seva eficàcia (Figura 4.5), en el context d'una tesi anterior³¹⁷. Com que disposàvem d'una col·lecció de teixits d'aquell estudi fet en ratolins, vam estudiar la integritat i la seqüència de l'ADNmt en aquestes mostres. Aquest model representa una aproximació més realista de l'exposició a dNs, ja que és en el context fisiològic i per via oral, que és la via d'administració utilitzada en els pacients amb dèficit de TK2³¹⁸. A més, utilitzant les mostres obtingudes en ratolins *Dguok*^{-/-} tractats amb dAdo + dGuo per als experiments d'eficàcia d'aquest tractament (Figura 4.6), també vam estudiar la seva possible genotoxicitat sobre l'ADNmt.

Quan es va estudiar l'eficàcia del tractament amb dCtd + dThd en el model *Tk2*^{-/-} es va veure un augment en la quantitat dels dNs en plasma i teixits, així com en l'ADNmt i en la supervivència³¹⁷. Com que aquestes dades confirmaven l'eficàcia del tractament no es van quantificar els dNTPs, tenint en compte que en altres estudis ja s'havia comprovat que l'administració oral de dNs indueix expansió dels dNTPs mitocondrials³⁰⁸. Els resultats

d'aquesta tesi indiquen que el tractament amb dCtd + dThd no indueix mutacions puntuals ni deleccions múltiples sobre l'ADNmt en fetge o múscul esquelètic de ratolins exposats al tractament durant 8 o 25 dies, independentment del seu genotip. Aquests resultats coincideixen amb els observats en aquest mateix model quan es sobreexpressa l'ortòleg de *Tk2* en *Drosophila melanogaster* (*Dm-dNK*)²⁸⁷. Aquest model, tot i presentar una clara asimetria entre els dNTPs en múscul esquelètic (increment de més de 100 vegades en les quantitats de dTTP, 5 vegades en les del dCTP i 2 vegades en les del dGTP i del dATP)²⁸⁸, no va mostrar deleccions múltiples sobre l'ADNmt ni tampoc un increment en la freqüència de mutacions puntuals sobre l'ADNmt, almenys en les dues regions analitzades: en el gen *Cytb* i la regió *D-loop*. En conjunt, tots aquests resultats semblen indicar que els organismes pluricel·lulars tenen molta tolerància als desequilibris en els dNTPs, ja que aquests no resulten mutagènics.

Pel cas dels ratolins amb dèficit en dGK, tampoc s'ha observat un efecte mutagènic sobre l'ADNmt per part dels dNs administrats. En aquest cas, tampoc sorprèn el resultat, ja que tal com s'ha indicat anteriorment (Secció 6.1) els dNs utilitzats en aquest estudi (dAdo + dGuo) són molt poc biodisponibles i només causen un lleuger increment en els dNTPs en ratolins WT on no estimulen la replicació de l'ADNmt. Així doncs, els dNs de purina tenen poc potencial mutagènic degut a la seva baixa biodisponibilitat.

L'estudi de les mutacions puntuals i deleccions múltiples en l'ADNmt en aquests models *in vivo* ens ha permès obtenir dades addicionals que no estan directament relacionades amb la possible mutagenicitat del tractament amb dNs. De la mateixa manera que hem discutit anteriorment sobre l'absència de mutacions en cèl·lules de pacients amb MDDS, els resultats obtinguts en models *in vivo* també apunten a una absència d'inducció de mutacions sobre l'ADNmt originades per la disfunció de la proteïna causant de la malaltia. D'aquesta manera, per al cas del ratolí KO per a *Tk2*, la pèrdua de funció de l'enzim, que teòricament resulta en un desequilibri en les quantitats dels dNTPs mitocondrials (demostrat en el model anàleg KI per *Tk2*²⁷⁸), no resulta en mutagènesi sobre l'ADNmt, tal com indiquen els nostres resultats i com s'ha reportat en la descripció del model animal²⁶⁷. En el cas del dèficit de dGK hem observat un lleu increment en el nombre de mutacions sobre l'ADNmt en el fetge de ratolins *Dguok*^{-/-}, però les peculiaritats de les mutacions trobades i la seva segregació amb les

ventrades dels animals suggereixen que la detecció d'aquests canvis són més aviat deguts a un artefacte causat per la profunda depleció de l'ADNmt que experimenten aquests ratolins, creant biaixos en l'heteroplàsmia i en el nombre de variants trobades. En conjunt, totes aquestes dades indiquen que les MDDS causades per mutacions en *TK2* i *DGUOK* cursen amb absència de mutacions puntuals sobre l'ADNmt, almenys en els models animals, i com s'ha discutit anteriorment, també en fibroblasts de pell. Caldria estudiar-ho en teixits afectats dels pacients, ja que hi ha clares diferències en la malaltia entre humans i ratolins. Un exemple d'aquestes diferències és que el model de ratolí *Tk2*^{-/-} no ha mostrat deleccions múltiples en múscul esquelètic mentre que els pacients sí que les manifesten³³⁷. De tota manera, els ratolins *Tk2*^{-/-} moren prematurament, la qual cosa no permet analitzar si el dèficit de TK2 podria generar deleccions múltiples en edats més avançades. La presència de deleccions múltiples tampoc no s'ha observat en el cervell o el fetge dels ratolins *Dguok*^{-/-} a les edats analitzades, tot i que en pacients amb dèficit de dGK només s'ha estudiat aquesta característica en múscul esquelètic¹⁹³.

La principal limitació de l'estudi de l'ADNmt en ratolins tractats amb dNs ha estat el temps d'exposició al tractament, que en el cas del model de dèficit de TK2 ha estat de 8 o 25 dies (Figura 4.5), mentre que en el model de dèficit de dGK ha estat de quasi 6 setmanes (Figura 4.6). Per al cas del dèficit de TK2, aquesta limitació deriva del model, ja que no és possible perllongar la vida dels ratolins *Tk2*^{-/-} molt més enllà de 30 dies. No obstant, podria tenir sentit ampliar l'estudi amb tractaments més perllongats en ratolins WT, en un disseny de tractament amb aquests compostos a llarg termini. Tot i això, el nostre estudi és el primer on s'explora aquest possible efecte del tractament *in vivo* en diferent teixits, cosa que resultaria impossible de portar a terme amb pacients. D'altra banda, l'estudi en aquests models s'ha limitat a l'ADNmt, però també tindria sentit estudiar l'ADNn, almenys pel tractament amb la biodisponibilitat més alta (dCtd + dThd) en el model *Tk2*^{-/-}.

A banda dels estudis de seguretat gènica a nivell preclínic, hem estudiat la seguretat gènica del tractament amb dCtd + dThd en pacients amb dèficit de TK2, ja que hem tingut accés a ADN de mostres de sang d'aquests pacients abans i després de rebre tractament. Aquest estudi presenta una gran avantatge enfront als estudis preclínic *in vitro* i *in vivo* realitzats en aquesta tesi i és que suposen un model d'exposició llarga al tractament real diari amb

dCtd + dThd que va des de 9 mesos fins a més de 6 anys. Per contra, té la limitació que s'ha estudiat en sang, que no és un teixit afectat en els pacients. L'obtenció d'una biòpsia de múscul (teixit afectat en els pacients) per extreure ADN i realitzar aquest estudi hauria resultat més informativa però es tracta d'un procediment molt més invasiu que l'obtenció de sang. Això hauria requerit una justificació molt més fonamentada davant els comitès ètics i, en tot cas, hauria reduït dràsticament el nombre de pacients estudiats, ja que en molts d'ells no es va fer biòpsia prèvia al tractament i d'altres potser no haurien volgut tornar a sotmetre's a aquest procediment. L'estudi de l'ADNmt en sang es veu limitat també pel fet que és un teixit molt replicatiu i en renovació constant, de manera que la via *de novo* estarà molt activa i l'impacte dels dNs administrats sobre les quantitats de dNTPs no serà tan alt com en un teixit amb una taxa de replicació baixa, com és el múscul esquelètic.

L'estudi de l'ADNmt de mostres de sang de pacients ha revelat que el tractament no causa delecions múltiples ni tampoc mutacions puntuals, aportant una evidència més de la seguretat gènica del tractament amb dCtd + dThd sobre l'ADNmt més a llarg termini. A més, el fet que l'ADNmt de sang de controls sans tingui un nombre de mutacions similar al dels pacients amb dèficit de TK2 no tractats indica que els desbalanços esperats en els dNTPs mitocondrials ocasionats pel dèficit de TK2 tampoc resulten genotòxics, tal com s'ha vist en els fibroblasts dels pacients i en el múscul esquelètic i en el fetge del model de ratolí de la malaltia. Cal indicar, però, que hi ha una gran variabilitat en l'edat de la cohort de pacients estudiada (Taula 4.2), en canvi, el rang d'edats dels controls sans dels quals s'ha pogut disposar està comprés entre uns 40 – 50 anys.

A part de l'estudi de l'ADNmt, aprofitant que la sang i, estrictament, el teixit hematopoètic dels pacients, ha estat exposat durant llargs períodes de temps als dNs s'ha estudiat la seguretat gènica sobre l'ADNn. Tot i que la situació ideal hagués estat utilitzar un exoma complet, la realitat és que, per limitació de pressupost, només hem pogut seqüenciar un panell que inclou gens associats a càncer (*Human Comprehensive Cancer Panel*), que seria una de les principals conseqüències i una de les més greus de tenir inestabilitat genòmica en el cas que fos causada pel tractament. A més, aquest panell cobreix un conjunt de gens que són més susceptibles de ser mutats i, per tant, seria més fàcil trobar-hi variants si el tractament fos mutagènic. La sang i, per extensió, el teixit hematopoètic del qual deriva, és

un teixit amb una alta taxa de renovació (i per tant de replicació). Això fa que sigui un bon model per estudiar l'efecte mutagènic de l'excés de dNTPs sobre l'ADNn, ja que els mecanismes de mutagenicitat per desequilibris en els dNTPs es donen, majoritàriament, durant el procés de replicació de l'ADN (amb menor contribució dels processos de reparació). Aquest estudi no ha mostrat cap indicatiu d'inducció de mutacions, ja sigui *de novo* o alterant les freqüències de les mutacions somàtiques presents en baix grau en els 275 gens inclosos en el *Human Comprehensive Cancer Panel*.

Fins aquest punt s'ha comentat que, en tots els sistemes estudiats (cèl·lules, ratolins i mostres de sang de pacients), el tractament amb dNs no causa alteracions qualitatives sobre l'ADNmt, és a dir, delecions múltiples o mutacions puntuals. Cal indicar també que el tractament amb dNs no ha causat alteracions quantitatives de l'ADNmt, és a dir, no ha afectat negativament a la seva quantitat i no ha causat depleció, tot i que el nombre de còpies no ha estat mesurat en l'ADNmt de sang dels pacients. Aquests resultats contrasten amb el que s'ha vist quan es tracten els fibroblasts en cultiu amb només dThd a concentració 40 μM ¹³⁰. En aquest cas, la depleció de l'ADNmt està causada perquè la dThd inhibeix competitivament la fosforilació de la dCtd per part de la TK2, causant depleció de dCTP. Quan s'administra la combinació de dCtd + dThd (igual que en els experiments d'aquesta tesi) no s'observa depleció.

Gràcies als estudis de seguretat gènica, s'evidencia que les concentracions assolides de dNTPs, si bé estimulen la replicació de l'ADNmt, no sembla que afectin a la fidelitat en la replicació i, per tant, no són genotòxics ja que no s'ha trobat un augment de mutacions sobre l'ADNmt o sobre l'ADNn en els diferents models estudiats.

6.3. Paper d'ENT1 en el fenotip del dèficit de TK2 i la resposta al tractament amb dNs

Un dels processos implicats de manera necessària en els mecanismes terapèutics dels dNs és el seu transport a través de les membranes cel·lulars. Aprofitant que disposàvem d'un ratolí KO per a *Ent1*¹¹⁶, transportador de nucleòsids que, a més, es localitza tant en la membrana plasmàtica⁹⁵ com en la membrana interna mitocondrial⁸⁷, el vam aparellar amb

el ratolí KO per *Tk2*²⁶⁶ que permet veure de forma clara l'efecte del tractament amb dCtd + dThd sobre la seva supervivència³¹⁷. Això ens va permetre comprovar si aquest transportador tenia algun rol en el fenotip del model i en l'efecte terapèutic dels dNs. La informació més notable i rellevant d'aquesta part de la tesi es va obtenir en els estudis de supervivència, que van revelar que l'absència de transportador ENT1 anul·lava virtualment l'efecte del tractament amb dNs, mentre que sense tractament, l'absència d'aquest transportador té un lleuger efecte protector. Discutirem, en primer lloc, les observacions associades a aquest petit efecte protector, i en segon lloc analitzarem i discutirem aquells factors relacionats amb el rol necessari d'ENT1 en el mecanisme terapèutic del tractament amb dNs.

Els experiments de supervivència portats a terme en aquesta tesi amb ratolins *Tk2*^{-/-} que expressen ENT1 van mostrar una supervivència mediana de 17 dies, similar als 16 dies que s'havien reportat prèviament^{266,317}. Tot i que la causa de la mort d'aquests ratolins no ha estat investigada en profunditat, alguns estudis i les nostres pròpies observacions semblen indicar que la mort està relacionada amb l'afectació cerebral i, en menor mesura, muscular (associades a una clara depleció de l'ADNmt en el cervell i més lleu en el múscul esquelètic)^{266,317}. D'altra banda, nosaltres no hem observat cap afectació en la supervivència del ratolí *Ent1*^{-/-}, tal com s'havia descrit prèviament¹¹⁶. Notablement, els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-} han viscut més (24 dies) que els ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-}, que sí que expressen ENT1 (17 dies). Això indica que, almenys en les soques de ratolins i les condicions que hem estudiat, l'absència d'ENT1 té un cert rol protector davant el dèficit de TK2.

Existeix la possibilitat que aquest rol protector estigui relacionat amb un increment del contingut tissular de dNs en els ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}. Als 12 dies d'edat i en condicions basals (sense tractament) les quantitats de dCtd i dThd en fetge i múscul esquelètic han resultat més altes en els ratolins que no expressen ENT1, possiblement perquè els dNs no es poden exportar a través d'aquest transportador. Aquesta explicació és coherent amb el fet que l'expressió dels transportadors ENT2 i ENT3 en aquests dos teixits és inferior a la d'ENT1¹⁰², de manera que aquests altres transportadors equilibratius difícilment podrien compensar l'absència d'ENT1. Alternativament, el contingut més elevat d'aquests dNs en els teixits

esmentats podria ser un reflex de l'increment d'aquests dos compostos en sang, també observat en el ratolí *Ent1*^{-/-}.

Sigui com sigui, en el context d'absència d'ENT1, el contingut més elevat d'aquests dos nucleòsids podria compensar parcialment el dèficit en dNTPs pirimidínics associats al dèficit de TK2. Això estimularia la replicació de l'ADNmt i revertiria la seva depleció associada al dèficit de TK2. Quan s'ha analitzat la quantitat d'ADNmt s'ha observat que el ratolí doble KO no mostra depleció en fetge i tampoc en múscul esquelètic (encara que es veu certa tendència a la depleció en l'últim teixit). L'absència de depleció també s'ha observat en els ratolins KO per *Tk2*. D'aquesta manera veiem que l'increment dels dNs associat a la falta d'ENT1 no ha causat una estimulació en la replicació de l'ADNmt en ratolins de 5 o 12 dies d'edat. Aquesta observació indica que la diferència de supervivència entre els dos genotips en absència de tractament no s'explica per una estimulació de la replicació de l'ADNmt en aquests teixits deguda a la major disponibilitat de dCtd i dThd, que no té cap efecte sobre el nombre de còpies d'ADNmt. El fet que l'augment dels dNs en els dos òrgans no hagi causat un augment en el nombre de còpies d'ADNmt no és estrany, tenint en compte que l'augment tissular de dNs degut a la falta d'ENT1 és molt inferior a l'augment aconseguit amb l'administració del tractament (dCtd + dThd) per via oral que té un impacte en la supervivència d'acord amb estudis anteriors³¹⁷ i als observats en aquesta tesi (discutit més endavant).

L'efecte de la manca d'ENT1 en la supervivència dels ratolins *Tk2*^{-/-} tampoc sembla associat a canvis en el cervell, ja que a diferència del fetge i múscul esquelètic, l'absència d'ENT1 no produeix alteracions en el contingut de dCtd i dThd en aquest òrgan. Això indica que ENT1 no és imprescindible per a mantenir l'homeòstasi dels dNs pirimidínics endògens en aquest òrgan. A més, quan s'ha mesurat el nombre de còpies d'ADNmt en aquest òrgan s'ha observat el mateix grau de depleció en ratolins *Tk2*^{-/-} tant si s'expressa o no *Ent1*.

Com que l'augment de supervivència dels ratolins deguda a l'absència d'ENT1 no sembla mitjançada per un increment del número de còpies d'ADNmt en aquesta edat (almenys en els teixits estudiats), l'explicació d'aquest efecte resta oberta. Es poden plantejar algunes hipòtesis que no han pogut ser explorades en aquesta tesi, però que val la pena considerar

en el futur. Una d'elles està relacionada amb l'alletament. Cal recordar que en el disseny dels aparellaments de ratolins per a aquests experiments, les mares de les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* sempre eren *Ent1^{-/-}*, mentre que les mares de les cries *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* sempre eren *Ent1^{+/+}*. Podria ser que les mares que no expressen *Ent1* sintetitzessin llet amb quantitats de dNs més altes, de manera que les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* ingeririen llet més rica en dNs. Això podria explicar l'augment dels dNs plasmàtics en les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* (que hem observat en aquesta tesi) i una estimulació de la replicació de l'ADNmt a edats molt primerenques. Tot i que en aquesta tesi no s'ha vist una estimulació de la replicació de l'ADNmt en cap dels teixits estudiats en cries de 5 o 12 dies que no expressen *Ent1*, podria ser que els dNs en la llet estimulessin la replicació de l'ADNmt durant un període de temps anterior als 5 dies, de manera que la depleció de l'ADNmt trigaria uns dies més a donar-se en les cries d'aquest genotip, allargant uns dies la seva supervivència. Una forma de comprovar aquesta hipòtesi seria mesurar els dNs presents en la llet de mares *Ent1^{+/+}* i *Ent1^{-/-}* o posar les cries *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* a alletar de mares *Ent1^{-/-}* i les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* a alletar de mares *Ent1^{+/+}* i analitzar-ne la supervivència.

Tampoc no podem descartar que l'efecte es pugui arrossegar des de les etapes embrionàries del desenvolupament. Els transportadors de nucleòsids s'expressen en la placenta³³⁸, entre ells ENT1³³⁹ i, de fet, els dNs poden creuar-la³⁴⁰. D'aquesta manera podria ser que la manca d'ENT1 fes que els dNs s'acumulessin en els embrions *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}*, donant lloc a l'estimulació de la replicació de l'ADNmt en estadis prenatals, cosa que no passaria en els embrions *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}*. En el moment del naixement, aquesta situació canviaria i la sobrecàrrega de dNs es podria moderar o desaparèixer i per tant es donaria la depleció de forma retardada en les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* conferint-les uns dies més de supervivència. Aquesta hipòtesi encaixa amb el fet que als 5 i 12 dies ja no s'apreciïn diferències en el nombre de còpies d'ADNmt i amb que les cries *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* tinguin una tendència a tenir el nombre de còpies d'ADNmt més alt en múscul esquelètic, tot i que caldria mesurar el contingut de dNs i d'ADNmt en embrions per confirmar-ho. També seria interessant analitzar la funcionalitat dels mitocondris, així com quantitat de proteïnes i ARN codificats per l'ADNmt, ja que poden ser un reflex de diferències prèvies en el nombre de còpies d'ADNmt.

Abans d'abordar la implicació d'ENT1 en els mecanismes terapèutics dels dNs pirimidínics (dThd i dCtd) sobre el dèficit de TK2, hem de parar atenció a algunes diferències en les supervivències observades en ratolins tractats en aquesta tesi, en comparació amb observacions prèvies d'estudis desenvolupats al nostre laboratori³¹⁷ i per un altre grup³¹⁶.

En els treballs d'aquesta tesi, el tractament amb dCtd + dThd ha incrementat la supervivència dels ratolins *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* dels 17 als 51 dies, la qual cosa contrasta amb les dades obtingudes prèviament en el laboratori utilitzant el mateix model animal³¹⁷, on el tractament va allargar la supervivència dels ratolins fins a 34 dies. Els nostres resultats també contrasten amb un altre treball que va utilitzar el model KI per *Tk2* tractat amb dues dosis diferents de dCtd i dThd³¹⁶ que va allargar la supervivència fins a 31 i 43 dies, depenent de la dosi. Les causes d'aquesta diferència en la supervivència amb el tractament no són clares, però podrien estar relacionades amb diversos factors. Un d'ells pot ser les condicions d'estabulació, ja que els dos estudis amb els ratolins KO per *Tk2*, tot i donar-se en el mateix centre de recerca, es van fer en dos estabularis diferents. Un altre factor pot ser l'hora d'administració del tractament. En el primer estudi³¹⁷ el tractament s'administrava a qualsevol hora al llarg del matí, mentre que en el segon experiment (realitzat en aquesta tesi) el tractament s'administrava sempre a primera hora del matí. Tot i que l'efecte terapèutic dels dNs pogués estar condicionat per l'hora d'administració, i per tant pels ritmes circadians, no es tenen dades sobre l'efecte d'aquests en transportadors involucrats en l'absorció intestinal o en l'activitat o expressió de TK1 i dCK (que són els enzims encarregats de l'efecte terapèutic dels dNs en aquest model). L'efecte de l'hora d'administració entre els dos estudis també es podria deure als hàbits alimentaris dels ratolins, ja que aquests ingereixen la majoria dels aliments durant les hores de nit³⁴¹ i, per tant, el contingut estomacal i l'absorció, no seran iguals a primera hora del matí que al llarg de tot el matí, fet que pot afectar l'absorció del tractament administrat per via oral. Finalment, un tercer factor, podria ser la deriva genètica. Tot i que tant el ratolins *Tk2^{-/-}* com els *Ent1^{-/-}* procedien del mateix fons genètic C57BL/6, aquests han estat mantinguts de forma independent en diferents estabularis i en aparellar les dues línies s'han pogut introduir variants genètiques que poden afectar l'absorció, distribució o eficàcia del tractament.

Passem ara a discutir la implicació d'ENT1 en els mecanismes terapèutics del tractament amb dNs de pirimidina. Si sense tractament l'efecte de l'absència d'ENT1 sobre la supervivència dels ratolins *Tk2*^{-/-} és positiu i relativament moderat (un increment de supervivència mediana de 7 dies, sense afectar la supervivència màxima), l'efecte de l'absència d'ENT1 sobre l'eficàcia del tractament amb dNs és negatiu i dràstic en ratolins *Tk2*^{-/-}. La manca d'ENT1 en ratolins *Tk2*^{-/-} ha reduït notablement l'eficàcia dels dNs, ja que els ratolins passen de tenir una supervivència de 24 dies sense tractar a 27 dies amb tractament (incrementant la supervivència només 3 dies). En canvi, els ratolins *Tk2*^{-/-} que sí que expressen *Ent1* responen al tractament i passen d'una supervivència de 17 dies sense tractament a 51 dies amb tractament (incrementant la supervivència 34 dies). Tot i que en aquest últim grup de ratolins s'allarga notablement la seva supervivència, aquesta no és com la d'un ratolí WT, ja que el tractament acaba perdent efecte. S'ha proposat que aquesta pèrdua de l'efecte del tractament es deu a canvis ontogènics que afecten la biodisponibilitat dels dNs a través de dos mecanismes. Per una banda, els enzims catabòlics de la dCtd i la dThd, CDA i TP, augmenten la seva expressió i activitat amb l'edat en l'intestí. Per altra banda, els enzims TK1 i dCK, encarregats de fosforilar a nivell citosòlic els dNs, disminueixen la seva expressió i activitat amb l'edat^{316,317}.

Per intentar explicar les diferències de supervivència degudes a ENT1 vam explorar l'absorció intestinal de la dCtd i dThd administrades per via oral mitjançant un estudi farmacocinètic en ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-}. Aquest estudi es va fer de forma independent a TK2, ja que els ratolins KO per a *Tk2* no arriben a adults (edat en que és més fàcil fer un estudi farmacocinètic) i de fet TK2 no juga cap paper en el transport de dNs. A nivell de l'enteròcit els transportadors de nucleòsids concentratius es troben a la part apical, en contacte amb el lumen de l'intestí, de manera que els dNs administrats per via oral poden entrar en l'enteròcit de forma independent als transportadors equilibratius, entre els quals es troba ENT1. En canvi, en la part basal de l'enteròcit es localitzen els transportadors equilibratius, entre ells, ENT1¹⁰¹. Quan vam comparar la farmacocinètica de dThd i dCtd en ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-} no vam veure que l'absència d'ENT1 impedís l'absorció d'aquests nucleòsids, la qual cosa indica que ENT1 no és un factor indispensable pel transport dels dNs des de l'enteròcit cap al torrent sanguini.

Donat que ENT1 no juga un paper clau en l'absorció intestinal de la dCtd i la dThd vam explorar el seu rol en el transport dels dos dNs en diferents òrgans de ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-}. De totes les mostres estudiades (plasma, fetge, múscul esquelètic i cervell), només en cervell vam observar un bloqueig clar de l'entrada del tractament en absència d'ENT1. Aquest bloqueig es veu en la manca de biodisponibilitat cerebral de dThd després del tractament. Addicionalment, quan s'estudien els productes de degradació dels dos dNs administrats (dUrd per al cas de la dCtd i Thy per al cas de la dThd) o la suma del producte administrat més el seu producte de degradació (com a indicador de la totalitat de compost que ha entrat) s'observa un clar bloqueig de l'entrada dels dos compostos en aquest òrgan quan no hi ha expressió d'*Ent1*.

En vista a les observacions fetes en ratolins *Ent1*^{+/+} i *Ent1*^{-/-} adults es va estudiar si aquests resultats replicaven en els ratolins amb el mateix genotip que en els estudis de supervivència i que, a més, tenien compromesa la seva supervivència (ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-} i ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}). El fet de treballar amb animals que tenien una supervivència de 17 dies (ratolins *Ent1*^{+/+}*Tk2*^{-/-}) i 24 dies (ratolins *Ent1*^{-/-}*Tk2*^{-/-}) en absència de tractament ens va obligar a utilitzar ratolins molt joves per aquest estudi (12 dies d'edat). La primera diferència que hem observat en comparar les concentracions entre els ratolins adults (8 – 10 setmanes d'edat) amb més joves (12 dies d'edat) ha estat que les concentracions basals de dCtd i dThd són més altes en tots els teixits estudiats de ratolins joves. A més, el tractament aconsegueix concentracions notablement més altes en ratolins més joves, ja que s'han descrit canvis ontogènics en ratolins adults que redueixen la biodisponibilitat dels dNs^{316,317}, tal com s'ha comentat anteriorment.

Tot i les diferències pel que fa a la biodisponibilitat general, les observacions en els ratolins més joves han mostrat els mateixos resultats que en els ratolins adults: en absència del transportador ENT1 la dCtd i dThd administrades veuen notablement bloquejada la seva entrada al cervell tal i com indiquen les seves quantitats, així com les dels seus productes de degradació, que són menors en aquest òrgan després del tractament. Aquesta observació no s'ha donat en fetge o múscul esquelètic, tal com passava en ratolins adults. Així doncs, les dades apunten a un rol primordial d'ENT1 per a l'entrada del tractament al cervell com a

pas necessari per al seu efecte terapèutic. De fet, això està d'acord amb l'observació que el cervell és potser l'òrgan més afectat en el model animal de dèficit de TK2.

Un experiment addicional per acabar de demostrar la importància d'ENT1 en l'entrada dels dNs en el cervell i el seu impacte sobre l'ADNmt seria mesurar el nombre de còpies d'ADNmt en ratolins amb en els genotips *Ent1^{+/+}Tk2^{-/-}* i *Ent1^{-/-}Tk2^{-/-}* tractats diàriament per comprovar si la supervivència i la quantitat de dNs correlaciona amb la quantitat d'ADNmt.

El fet que en estudis anteriors s'hagi vist que les concentracions dels dNs assolides en el plasma i la seva eficàcia en l'estimulació de la replicació de l'ADNmt canvien depenent de si s'administra dThd sola o en combinació amb dCtd³¹⁷ obliga a, en un futur, estudiar el paper d'ENT1 en el transport de la dCtd i dThd per separat, ja que aquests dos compostos podrien competir entre ells. Donat que ENT1 juga un paper molt important en el transport de nucleòsids, així com d'anàlegs de nucleòsids utilitzats per al tractament de càncer o infeccions víriques es coneixen bé les afinitats d'aquest transportador i dels ENT2 i ENT3 per molts d'aquests compostos i per a la dThd¹⁰¹, però no es tenen dades per a la dCtd. Disposar d'aquesta última K_m ens ajudaria a establir l'especificitat preferencial del transportador per un o altre dN. D'altra banda, podria ser que els transportadors de nucleòsids estiguessin afectats per canvis ontogenics similars als comentats anteriorment^{316,317}, contribuint als canvis en la biodisponibilitat, cosa que fins on tenim informació no ha estat estudiada.

En aquesta tesi, totes les mesures dels dNs s'han fet sempre en homogenat total de teixit. Donat que ENT1 s'expressa també en el mitocondri⁸⁷, de cara al futur valdria la pena explorar el seu rol en l'entrada de dNs al mitocondri. Explorar aquesta via no seria tan interessant pel dèficit de TK2 o de dGK, ja que en aquests casos els dNs administrats es fosforilen principalment en el citoplasma i entren com a nucleòtids monofosfat, difosfat o trifosfat en el mitocondri de forma independent a ENT1. Per contra, en els casos en que s'administren dNs i aquests entren i es poden fosforilar en el mitocondri (com el cas del dèficit de POLG o de MPV17, SUCLG1 i OPA1) estudiar el paper d'ENT1 en aquesta entrada té més rellevància, ja que afectaria a les quantitats de dNs mitocondrials i per extensió a les quantitats de dNTPs mitocondrials que estimularien la replicació de l'ADNmt, afectant així de forma indirecta l'eficàcia del tractament amb dNs per a les MDDS.

En conjunt, els experiments realitzats per estudiar la implicació d'ENT1 en el mecanisme terapèutic dels dNs administrats com a tractament del dèficit de TK2 indiquen que aquest transportador equilibratiu no resulta crucial per a l'absorció intestinal quan s'administra dCtd i dThd per via oral i tampoc resulta indispensable per al transport d'aquests dNs cap al fetge o múscul esquelètic, però sí que és imprescindible per a l'entrada d'aquests dos compostos en el cervell. Aquests resultats obren la porta a modular l'activitat d'ENT1 per poder augmentar la biodisponibilitat del tractament amb dNs.

7. CONCLUSIONS

1. Els dNs estimulen la replicació de l'ADNmt *in vitro* sempre que s'observa una incapacitat per mantenir el nombre de còpies d'aquesta molècula, amb l'excepció de les cèl·lules amb mutacions en *RNASEH1*. Aquesta estimulació s'ha observat en cèl·lules amb mutacions en diversos gens, incloent-hi alguns no implicats en el metabolisme de nucleòtids (*DGUOK*, *MPV17*, *SUCLG1* i *OPA1*). Per tant, el tractament amb dNs es podria ampliar a MDDS causades per mutacions en gens que no estan funcionalment relacionats amb el metabolisme de dNTPs.
2. El tractament oral amb dNs de purina no ha mostrat efectivitat per revertir la depleció de l'ADNmt observada en diversos òrgans del ratolí KO per *Dguok*. La baixa biodisponibilitat dels dNs de purina, així com la possible insuficiència de l'enzim dCK poden ser, almenys en part, responsables de la manca d'eficàcia del tractament, tot i que caldria fer més estudis per consolidar aquesta conclusió.
3. Els fibroblasts de pell dels pacients amb mutacions en *TWINK*, *DNA2*, *RNASEH1*, *RRM2B*, *TK2*, *DGUOK*, *OPA1*, *SPG7*, *MPV17*, *SUCLA2* i *SUCLG1* no presenten alteracions qualitatives sobre l'ADNmt (ni delecions múltiples ni mutacions puntuals). Els ratolins amb dèficit de TK2 o dGK tampoc mostren cap alteració sobre l'ADNmt en fetge i múscul esquelètic, en el primer cas, o fetge i cervell en el segon cas, a les edats estudiades. Aquests resultats indiquen que les disfuncions dels gens associats a MDDS que hem estudiat no causen mutacions puntuals somàtiques sobre l'ADNmt, a diferència del que s'ha observat en pacients amb MNGIE.
4. El tractament amb dNs, en les seves diferents combinacions, no resulta genotòxic sobre l'ADNmt en els models *in vitro* de MDDS. Els dNs de pirimidina i de purina administrats per via oral en els models *in vivo* de ratolins amb dèficit de TK2 i de dGK tampoc resulten genotòxics sobre el genoma mitocondrial. Els dNs de pirimidina tampoc han mostrat genotoxicitat sobre l'ADNmt o sobre l'ADNn de mostres de sang de pacients amb dèficit de TK2 tractats durant llargs períodes de temps. En conjunt, aquestes dades apunten a la seguretat gènica del tractament amb dNs a les dosis emprades.
5. L'absència del transportador de nucleòsids ENT1 té un impacte positiu en la supervivència dels ratolins amb dèficit de TK2, tot i que els mecanismes que hi estan implicats són encara desconeguts.

6. ENT1 és un mediador necessari per a l'efecte terapèutic dels dNs de pirimidina sobre la supervivència dels ratolins amb dèficit de TK2 i resulta imprescindible per a l'entrada de la dCtd i dThd al cervell d'aquests animals. Aquesta associació dona suport a la idea que l'efecte del tractament sobre el sistema nerviós central és crucial per a l'eficàcia d'aquesta teràpia sobre la supervivència en ratolins. A més, en conjunt, els resultats sobre el rol d'ENT1 obren la porta a considerar la modulació de la seva activitat com a nova diana terapèutica en les MDDS.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lang, B. F., Gray, M. W. & Burger, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* **33**, 351–397 (1999).
2. Schon, E. A., Dimauro, S. & Hirano, M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* **13**, 878–890 (2012).
3. McBride, H. M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* **16**, (2006).
4. Hajnóczky, G. *et al.* Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* **40**, 553–560 (2006).
5. Breda, C. N. de S., Davanzo, G. G., Basso, P. J., Saraiva Câmara, N. O. & Moraes-Vieira, P. M. M. Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol* **26**, (2019).
6. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* **148**, 1145–1159 (2012).
7. Kühlbrandt, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* **13**, (2015).
8. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341–360 (2018).
9. Pickles, S., Vigié, P. & Youle, R. J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology* **28**, R170–R185 (2018).
10. Zheng, Y. R., Zhang, X. N. & Chen, Z. Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders. *CNS Neurosci Ther* **25**, 876–886 (2019).
11. Rath, S. *et al.* MitoCarta3.0: An updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res* **49**, D1541–D1547 (2021).
12. Chinnery, P. F. & Hudson, G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* **106**, 135–159 (2013).
13. Harris, D. A. & Das, A. M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J* **280**, 561–573 (1991).
14. Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett* **595**, 1062–1106 (2021).

15. Protasoni, M. & Zeviani, Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
16. Anderson S *et al.* Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
17. Bayona-Bafaluy, M. P. *et al.* Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence. *Nucleic Acids Res* **31**, 5349–5355 (2003).
18. Alexeyev, M. Mitochondrial DNA: the common confusions. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* **31**, 45–47 (2020).
19. Shokolenko, I. N. & Alexeyev, M. F. Mitochondrial DNA: A disposable genome? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1852**, 1805–1809 (2015).
20. Sbis, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G. & Saccone, C. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**, 125–140 (1997).
21. Sandra, E. C., Erin Munkácsy & Pickering, A. M. Cause or Casualty: The Role of Mitochondrial DNA in Aging and Age-Associated Disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 285–297 (2018).
22. Holt, I. J. *et al.* Mammalian mitochondrial nucleoids: Organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* **7**, 311–321 (2007).
23. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13534–13539 (2011).
24. Iborra, F. J., Kimura, H. & Cook, P. R. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* **24**, (2004).
25. Alam, T. I. *et al.* Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* **31**, 1640–1645 (2003).
26. Maniura-Weber, K., Goffart, S., Garstka, H. L., Montoya, J. & Wiesner, R. J. Transient overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. *Nucleic Acids Res* **32**, 6015–6027 (2004).
27. Garrido, N. *et al.* Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* **14**, 1583–1596 (2003).

28. Wang, Y. & Bogenhagen, D. F. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 25791–25802 (2006).
29. O'Hara, R. *et al.* Quantitative mitochondrial DNA copy number determination using droplet digital PCR with single-cell resolution. *Genome Res* **29**, 1878–1888 (2019).
30. Gabriel, M. S., Chan, S. W., Alhathal, N., Chen, J. Z. & Zini, A. Influence of microsurgical varicocelectomy on human sperm mitochondrial DNA copy number: A pilot study. *J Assist Reprod Genet* **29**, 759–764 (2012).
31. Reynier, P. *et al.* Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* **7**, 425–429 (2001).
32. Pereira, C. V., Gitschlag, B. L. & Patel, M. R. Cellular mechanisms of mtDNA heteroplasmy dynamics. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **56**, 510–525 (2021).
33. Zhang, H., Burr, S. P. & Chinnery, P. F. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: Inheritance and beyond. *Essays Biochem* **62**, 225–234 (2018).
34. Stewart, J. B. & Chinnery, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* **16**, 530–542 (2015).
35. Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* **88**, 41–56 (2003).
36. Robberson, D. L., Kasamatsu, H. & Vinogradt, J. Replication of Mitochondrial DNA. Circular Replicative Intermediates in Mouse L Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **69**, 737–741 (1972).
37. Clayton, D. A. Replication of Animal Mitochondrial DNA Review. *Cell* **28**, 693 (1982).
38. Misisic, J. *et al.* Mammalian RNase H1 directs RNA primer formation for mtDNA replication initiation and is also necessary for mtDNA replication completion. *Nucleic Acids Res* **50**, 8749–8766 (2022).
39. Miralles Fusté, J. *et al.* In Vivo Occupancy of Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein Supports the Strand Displacement Mode of DNA Replication. *PLoS Genet* **10**, (2014).

40. Uhler, J. P. & Falkenberg, M. Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. *DNA Repair (Amst)* **34**, 28–38 (2015).
41. Uhler, J. P. *et al.* MGME1 processes flaps into ligatable nicks in concert with DNA polymerase γ during mtDNA replication. *Nucleic Acids Res* **44**, 5861–5871 (2016).
42. Lakshmipathy, U. & Campbell, C. The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Molecular and cellular biology* **19**, 3869–3876 (2009).
43. Nicholls, T. J. *et al.* Topoisomerase 3 α Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. *Mol Cell* **69**, 9-23.e6 (2018).
44. Falkenberg, M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway. *Essays Biochem* **62**, 287–296 (2018).
45. Yasukawa, T. *et al.* Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO Journal* **25**, 5358–5371 (2006).
46. Reyes, A. *et al.* Mitochondrial DNA replication proceeds via a ‘bootlace’ mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic Acids Res* **41**, 5837–5850 (2013).
47. Holt, I. J., Lorimer, H. E. & Jacobs, H. T. Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515–524 (2000).
48. Bowmaker, M. *et al.* Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50961–50969 (2003).
49. Zinovkina, L. A. DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochemistry* **84**, 884–895 (2019).
50. Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. I. & Alexeyev, M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **37**, 2539–2548 (2009).
51. Ballard, J. W. O. & Whitlock, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol* **13**, 729–744 (2004).
52. Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G. & LeDoux, S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity - Critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).

53. Zheng, L. *et al.* Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. *Mol Cell* **32**, 325–336 (2008).
54. Kornblum, C. *et al.* Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nat Genet* **45**, 214–219 (2013).
55. Sharma, P. & Sampath, H. Mitochondrial DNA integrity: Role in health and disease. *Cells* **8**, (2019).
56. Wang, L. Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **35**, 578–594 (2016).
57. Ferraro, P. *et al.* Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: A possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Journal of Biological Chemistry* **280**, 24472–24480 (2005).
58. Ipata, P. & Balestri, F. The Regulation of Brain Nucleoside Utilization. *Curr Metabolomics* **2**, 144–154 (2014).
59. Nakano, K., Va Baâ Lint, E. Â., Ashcroft, M. & Vousden, K. H. A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* **19**, 4283–4289 (2000).
60. Tanaka, H. *et al.* A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42–49 (2000).
61. Håkansson, P., Hofer, A. & Thelander, L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 7834–7841 (2006).
62. Ke, P.-Y. & Chang, Z.-F. Mitotic Degradation of Human Thymidine Kinase 1 Is Dependent on the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome–Cdh1-Mediated Pathway. *Mol Cell Biol* **24**, 514–526 (2004).
63. Hu, C. M. *et al.* Tumor Cells Require Thymidylate Kinase to Prevent dUTP Incorporation during DNA Repair. *Cancer Cell* **22**, 36–50 (2012).
64. Sherleys, J. L. & Kelly, T. J. Human Cytosolic Thymidine Kinase purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells. *J Biol Chem* **263**, 375–382 (1988).

65. Johansson, M. & Karlsson, A. Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8454–8458 (1997).
66. Chottiner, E. G. *et al.* Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **88**, 1531–1535 (1991).
67. Johansson, M. & Karlsson, A. Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA. *FEBS Lett* **93**, 7258–7262 (1996).
68. Kowluru, A., Tannous, M. & Chen, H. Q. Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic β cell: Evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. *Arch Biochem Biophys* **398**, 160–169 (2002).
69. Besse, A. *et al.* The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell Metab* **21**, 417–427 (2015).
70. El-Hattab, A. W., Craigen, W. J. & Scaglia, F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 1539–1555 (2017).
71. El-Hattab, A. W. & Scaglia, F. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. *Neurotherapeutics* **10**, 186–198 (2013).
72. Ramón, J. *et al.* Therapy prospects for mitochondrial dna maintenance disorders. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
73. Bianchi, V. & Spychala, J. Mammalian 5'-Nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 46195–46198 (2003).
74. Rampazzo, C. *et al.* A deoxyribonucleotidase in mitochondria: Involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **18**, 8239–8244 (2000).
75. Franzolin, E., Salata, C., Bianchi, V. & Rampazzo, C. The deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase activity of SAMHD1 protein contributes to the mitochondrial DNA depletion associated with genetic deficiency of deoxyguanosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 25986–25996 (2015).

76. Stillman, B. Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) synthesis and destruction regulate the replication of both cell and virus genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 14120–14121 (2013).
77. Requena, C. E., Pérez-Moreno, G., Ruiz-PÉREZ, L. M., Vidal, A. E. & González-Pacanowska, D. The NTP pyrophosphatase DCTPP1 contributes to the homeostasis and cleansing of the dNTP pool in human cells. *Biochemical Journal* **459**, 171–180 (2014).
78. Martínez-Arribas, B. *et al.* DCTPP1 prevents a mutator phenotype through the modulation of dCTP, dTTP and dUTP pools. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 1645–1660 (2020).
79. Carter, C. W. The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: Structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution. *Biochimie* **77**, 92–98 (1995).
80. Rampazzo, C. *et al.* Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **703**, 2–10 (2010).
81. Ferraro, P., Nicolosi, L., Bernardi, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **103**, (2006).
82. Pontarin, G., Gallinaro, L., Ferraro, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12159–12164 (2003).
83. Di Noia, M. A. *et al.* The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 33137–33148 (2014).
84. Franzolin, E. *et al.* The pyrimidine nucleotide carrier PNC1 and mitochondrial trafficking of thymidine phosphates in cultured human cells. *Exp Cell Res* **318**, 2226–2236 (2012).
85. Cámara, Y. *et al.* Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet* **23**, 2459–2467 (2014).

86. Peterson, L. W. & McKenna, C. E. Prodrug approaches to improving the oral absorption of antiviral nucleotide analogues. *Expert Opin Drug Deliv* **6**, 405–420 (2009).
87. Lee, E. W., Lai, Y., Zhang, H. & Unadkat, J. D. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): Implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 16700–16706 (2006).
88. Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E. & Baldwin, S. A. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* **34**, 529–547 (2013).
89. Smith, K. M. *et al.* Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Mol Membr Biol* **24**, 53–64 (2007).
90. Pastor-Anglada, M., Mata-Ventosa, A. & Pérez-Torras, S. Inborn Errors of Nucleoside Transporter (NT)-Encoding Genes (SLC28 and SLC29). *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
91. L Ritzel, M. W. *et al.* Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* **272**, 707–714 (1997).
92. Ritzel, M. W. L. *et al.* Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* **15**, 203–211 (1998).
93. Ritzel, M. W. L. *et al.* Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (System cib). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 2914–2927 (2001).
94. Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Cass, C. E., Baldwin, S. A. & Young, J. D. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 32552–32562 (2011).
95. Yoshio, E. *et al.* Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer Sci* **98**, 1633–1637 (2007).

96. Govindarajan, R. *et al.* Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, 910–922 (2009).
97. Duan, H. & Wang, J. Impaired monoamine and organic cation uptake in choroid plexus in mice with targeted disruption of the plasma membrane monoamine transporter (Slc29a4) gene. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 3535–3544 (2013).
98. Engel, K. & Wang, J. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol* **68**, 1397–1407 (2005).
99. Grañé-Boladeras, N., Spring, C. M., Hanna, W. J. B., Pastor-Anglada, M. & Coe, I. R. Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 4559–4575 (2016).
100. Baldwin, S. A. *et al.* Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15880–15887 (2005).
101. Pastor-Anglada, M., Urtasun, N. & Pérez-Torras, S. Intestinal nucleoside transporters: Function, expression, and regulation. *Compr Physiol* **8**, 1003–1017 (2018).
102. Lu, H., Chen, C. & Klaassen, C. Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition* **32**, 1455–1461 (2004).
103. Errasti-murugarren, E., Pastor-Anglada, M. & Casado, F. J. Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *Journal of Physiology* **582**, 1249–1260 (2007).
104. Daniels, G. *et al.* Lack of the nucleoside transporter ENT1 results in the Augustine-null blood type and ectopic mineralization. *Blood* **125**, 3651–3654 (2015).
105. Huber-Ruano, I. *et al.* Functional outcome of a novel SLC29A3 mutation identified in a patient with H syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **428**, 532–537 (2012).

106. Molho-Pessach, V. *et al.* The H Syndrome Is Caused by Mutations in the Nucleoside Transporter hENT3. *Am J Hum Genet* **83**, 529–534 (2008).
107. Pérez-Torras, S. *et al.* Deficiency of perforin and hCNT1, a novel inborn error of pyrimidine metabolism, associated with a rapidly developing lethal phenotype due to multi-organ failure. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 1182–1191 (2019).
108. Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol* **6**, (2015).
109. Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F. & Dumontet, C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 447–464 (2013).
110. Oliver, J. M. & Patersbn, A. R. Nucleoside Transport. I. A Mediated Process in Human Erythrocytes. *Can J Biochem* **49**, 262–270 (1970).
111. Endres, C. J., Moss, A. M., Govindarajan, R., Choi, D. S. & Unadkat, J. D. The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1(-/-) mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **331**, 287–296 (2009).
112. Endres, C. J. *et al.* The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or ent1(-/-) mouse erythrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **329**, 387–398 (2009).
113. Mikdar, M. *et al.* The equilibrative nucleoside transporter ENT1 is critical for nucleotide homeostasis and optimal erythropoiesis. *Blood* **137**, 3548–3562 (2021).
114. Gellerman, M. M., McCreary, J., Yedinak, E. & Stroup, M. Six additional examples of Anti-Ata. *Transfusion (Paris)* **13**, 225–230 (1973).
115. Osato, D. H. *et al.* Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics* **13**, 297–301 (2003).
116. Choi, D. S. *et al.* The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci* **7**, 855–861 (2004).

117. Liu, Y. J. *et al.* Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther* **25**, 899–910 (2019).
118. He, W. & Cronstein, B. The roles of adenosine and adenosine receptors in bone remodeling. *Frontiers in Bioscience* **3**, 888–895 (2011).
119. Mubagwa, K. & Flameng, W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: An updated overview. *Cardiovasc Res* **52**, 25–39 (2001).
120. Nagy, L. E., Diamond, I., Casso, D. J., Franklin, C. & Gordon, A. S. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 1946–1951 (1990).
121. Chen, J. *et al.* The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates anxiety-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* **6**, 776–783 (2007).
122. Warraich, S. *et al.* Loss of equilibrative nucleoside transporter 1 in mice leads to progressive ectopic mineralization of spinal tissues resembling diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in humans. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 1135–1149 (2013).
123. Fournier, D. E. *et al.* Ectopic mineralisation of the mandibular symphysis in ENT1 knockout mice: A model of dystrophic calcification. *Bone Rep* **15**, (2021).
124. Hinton, D. J. *et al.* Aberrant bone density in aging mice lacking the adenosine transporter ENT1. *PLoS One* **9**, (2014).
125. Rose, J. B. *et al.* Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, 771–777 (2010).
126. Kunz, B. A. *et al.* Deoxyribonucleoside triphosphate levels: A critical factor in the maintenance of genetic stability. *Reviews in Genetic Toxicology* B.A. Kunz *et al.*/ *Mutation Research* **318**, 1–64 (1994).
127. Meuth, M. The Molecular Basis of Mutations induced by Deoxyribonucleoside Triphosphate Pool Imbalances in Mammalian Cells. *Exp Cell Res* **181**, 305–316 (1989).
128. Nishino I, Spinazzola A & Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* (1979) **283**, (1999).

129. Spinazzola, A. *et al.* Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 4128–4133 (2002).
130. González-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A. L. & Martí, R. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet* **7**, (2011).
131. Papadimitriou, A. *et al.* Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology* **51**, 1086–1092 (1998).
132. Nishigaki, Y., Martí, R. & Hirano, M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* **13**, 91–101 (2004).
133. Nishigaki, Y., Martí, R., Copeland, W. C. & Hirano, M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 1913–1921 (2003).
134. Nishino, I., Spinazzola, A. & Hirano, M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscular disorders* **11**, 7–10 (2000).
135. López, L. C. *et al.* Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* **18**, 714–722 (2009).
136. Garone, C., Tadesse, S. & Hirano, M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* **134**, 3326–3332 (2011).
137. DiMauro, S. Mitochondrial DNA medicine. *Biosci Rep* **27**, 5–9 (2007).
138. Gorman, G. S. *et al.* Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* **2**, (2016).
139. Grier, J., Hirano, M., Karaa, A., Shepard, E. & Thompson, J. L. P. Diagnostic odyssey of patients with mitochondrial disease Results of a survey. *Neurol Genet* **4**, (2018).
140. Thorburn, D. R. Mitochondrial disorders: Prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis* **27**, 349–362 (2004).
141. Gorman, G. S. *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* **77**, 753–759 (2015).

142. Bellusci, M. *et al.* The genetic landscape of mitochondrial diseases in Spain: A nationwide call. *Genes* **12**, (2021).
143. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J* **370**, 751–762 (2003).
144. Chinnery PF. *Primary Mitochondrial Disorders Overview*. GeneReviews (2000).
145. Shin-ichi Usami & Shi-ya Nishio. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial. GeneReviews (2004).
146. Dubowitz, V. & Sewry, C. A. Muscle Biopsy Metabolic Myopathies II: Lipid-Related Disorders and Mitochondrial Myopathies. 469–492 (2007). doi:10.1016/B978-1-4160-2593-1.50023-1.
147. Thompson, K. *et al.* Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* **43**, 36–50 (2020).
148. Zeviani, M. & Viscomi, C. Mitochondrial Neurodegeneration. *Cells* **11**, (2022).
149. Spinazzola, A. & Zeviani, M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci Rep* **27**, 39–51 (2007).
150. Moraes, C. T. *et al.* mtDNA Depletion with Variable Tissue Expression: A Novel Genetic Abnormality in Mitochondrial Diseases. *Am J Hum Genet* **48**, 492–501 (1991).
151. Ahmed, N., Ronchi, D. & Comi, G. Pietro. Genes and pathways involved in adult onset disorders featuring muscle mitochondrial DNA instability. *Int J Mol Sci* **16**, 18054–18076 (2015).
152. Zeviani Massimo *et al.* An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* **339**, 309–311 (1989).
153. Suomalainen, A. & Isohanni, P. Mitochondrial DNA depletion syndromes - Many genes, common mechanisms. *Neuromuscular Disorders* **20**, 429–437 (2010).
154. El-Hattab AW *et al.* *Mitochondrial DNA Maintenance Defects Overview*. GeneReviews (2018). PMID: 29517884.
155. Viscomi, C. & Zeviani, M. MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J Inherit Metab Dis* **40**, 587–599 (2017).

156. Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. & Falkenberg, M. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO Journal* **23**, 2423–2429 (2004).
157. Young, M. J. & Copeland, W. C. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr Opin Genet Dev* **38**, 52–62 (2016).
158. Rahman, S. & Copeland, W. C. POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nat Rev Neurol* **15**, 40–52 (2019).
159. Longley, M. J. *et al.* Mutant POLG2 Disrupts DNA Polymerase γ Subunits and Causes Progressive External Ophthalmoplegia. *The American Journal of Human Genetics* **78**, 1026–1034 (2006).
160. Young, M. J. *et al.* Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* **20**, 3052–3066 (2011).
161. Urban, D. L., Scholle, L. M., Alt, K., Ludolph, A. C. & Rosenbohm, A. Camptocormia as a novel phenotype in a heterozygous POLG2 mutation. *Diagnostics* **10**, (2020).
162. Hoff, K. E. *et al.* Characterization of the human homozygous R182W POLG2 mutation in mitochondrial DNA depletion syndrome. *PLoS One* **13**, (2018).
163. Hikmat, O. *et al.* Simplifying the clinical classification of polymerase gamma (POLG) disease based on age of onset; studies using a cohort of 155 cases. *J Inherit Metab Dis* **43**, 726–736 (2020).
164. Korhonen, J. A., Gaspari, M. & Falkenberg, M. TWINKLE has 5' → 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48627–48632 (2003).
165. Goffart, S. *et al.* Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum Mol Genet* **18**, 328–340 (2009).
166. Nikali, K. *et al.* Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* **14**, 2981–2990 (2005).
167. Morino, H. *et al.* Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. *Neurology* **83**, 2054–2061 (2014).

168. Wanrooij, S. *et al.* Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res* **32**, 3053–3064 (2004).
169. Del Bo, R. *et al.* Remarkable infidelity of polymerase γ A associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. *Neurology* **61**, 903–908 (2003).
170. Jurkute, N. *et al.* SSBP1 mutations in dominant optic atrophy with variable retinal degeneration. *Ann Neurol* **86**, 368–383 (2019).
171. Stiles, A. R. *et al.* Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion. *Mol Genet Metab* **119**, 91–99 (2016).
172. Martin, C. A. *et al.* Mutations in TOP3A Cause a Bloom Syndrome-like Disorder. *Am J Hum Genet* **103**, 221–231 (2018).
173. Ronchi, D. *et al.* Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *Am J Hum Genet* **92**, 293–300 (2013).
174. Reyes, A. *et al.* RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* **97**, 186–193 (2015).
175. Bonora, E. *et al.* Biallelic variants in LIG3 cause a novel mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain* **144**, 1451–1466 (2021).
176. Nasca, A. *et al.* Biallelic Variants in ENDOG Associated with Mitochondrial Myopathy and Multiple mtDNA Deletions. *Cells* **11**, (2022).
177. Wiehe, R. S. *et al.* Endonuclease G promotes mitochondrial genome cleavage and replication. *Oncotarget* **9**, 18309–18326 (2018).
178. Van Goethem, G., Deraut, B., Löfgren, A., Martin, J. & Van Broeckhoven, C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* **28**, 211–213 (2001).
179. Johannes N. Spelbrink *et al.* Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* **28**, 223–231 (2001).
180. Shintaku, J. *et al.* RRM1 variants cause a mitochondrial DNA maintenance disorder via impaired de novo nucleotide synthesis. *Journal of Clinical Investigation* **132**, (2022).

181. Bourdon, A. *et al.* Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* **39**, 776–780 (2007).
182. Restrepo-Vera, J. L. *et al.* Identification of two novel RRM2B variants associated with autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia in a family with pseudodominant inheritance pattern. *J Hum Genet* **68**, 527–532 (2023).
183. C. Fratter MPhil *et al.* RRM2B mutations are frequent in familial PEO with multiple mtDNA deletions. *Neurology* **76**, 2032–2034 (2011).
184. Horga, A. *et al.* Peripheral neuropathy predicts nuclear gene defect in patients with mitochondrial ophthalmoplegia. *Brain* **137**, 3200–3212 (2014).
185. Pitceathly, R. D. S. *et al.* Adults with RRM2B-related mitochondrial disease have distinct clinical and molecular characteristics. *Brain* **135**, 3392–3403 (2012).
186. Tyynismaa, H. *et al.* A Heterozygous Truncating Mutation in RRM2B Causes Autosomal-Dominant Progressive External Ophthalmoplegia with Multiple mtDNA Deletions. *Am J Hum Genet* **85**, 290–295 (2009).
187. Shaibani, A. *et al.* Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Arch Neurol* **66**, 1028–1032 (2009).
188. Saada, A. *et al.* Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* **29**, 342–344 (2001).
189. Béhin, A. *et al.* Adult cases of mitochondrial DNA depletion due to TK2 defect An expanding spectrum. *Neurology* **78**, 644–648 (2012).
190. Chanprasert, S. *et al.* Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Mol Genet Metab* **110**, 153–161 (2013).
191. Garone, C. *et al.* Retrospective natural history of thymidine kinase 2 deficiency. *J Med Genet* **55**, 515–521 (2018).
192. Mandel, H. *et al.* The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* **29**, 337–341 (2001).

193. Ronchi, D. *et al.* Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain* **135**, 3404–3415 (2012).
194. Dimmock, D. P. *et al.* Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum Mutat* **29**, 330–331 (2008).
195. Caporali, L. *et al.* DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions. *Brain* **141**, e3 (2018).
196. Sommerville, E. W. *et al.* Identification of a novel heterozygous guanosine monophosphate reductase (GMPR) variant in a patient with a late-onset disorder of mitochondrial DNA maintenance. *Clin Genet* **97**, 276–286 (2020).
197. Hudson, G. *et al.* Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: A novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* **131**, 329–337 (2008).
198. Rouzier, C. *et al.* The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy ‘plus’ phenotype. *Brain* **135**, 23–34 (2012).
199. Wedding, I. M. *et al.* Spastic paraplegia type 7 is associated with multiple mitochondrial DNA deletions. *PLoS One* **9**, (2014).
200. Gorman, G. S. *et al.* Clonal expansion of secondary mitochondrial DNA deletions associated with spinocerebellar ataxia type 28. *JAMA Neurol* **72**, 106–111 (2015).
201. Nasca, A. *et al.* Recessive mutations in MSTO1 cause mitochondrial dynamics impairment, leading to myopathy and ataxia. *Hum Mutat* **38**, 970–977 (2017).
202. Russell, B. E. *et al.* Expanding and Underscoring the Hepato-Encephalopathic Phenotype of QIL1/MIC13. *Hepatology* **70**, 1066–1070 (2019).
203. El-Hattab, A. W., Suleiman, J., Almannai, M. & Scaglia, F. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Mol Genet Metab* **125**, 315–321 (2018).
204. Yapa, N. M. B., Lisnyak, V., Reljic, B. & Ryan, M. T. Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett* **595**, 1184–1204 (2021).

205. Elachouri, G. *et al.* OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* **21**, 12–20 (2011).
206. Kimura, M. & Okano, Y. Human Misato regulates mitochondrial distribution and morphology. *Exp Cell Res* **313**, 1393–1404 (2007).
207. Donkervoort, S. *et al.* MSTO1 mutations cause mtDNA depletion, manifesting as muscular dystrophy with cerebellar involvement. *Acta Neuropathol* **138**, 1013–1031 (2019).
208. Anand, R., Strecker, V., Urbach, J., Wittig, I. & Reichert, A. S. Mic13 is essential for formation of crista junctions in mammalian cells. *PLoS One* **11**, (2016).
209. Kishita, Y. *et al.* A novel homozygous variant in MICOS13/QIL1 causes hepato-encephalopathy with mitochondrial DNA depletion syndrome. *Mol Genet Genomic Med* **8**, (2020).
210. Guarani, V. *et al.* QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *Elife* (2016) doi:10.7554/eLife.17163.
211. Cagnoli, C. *et al.* Missense mutations in the AFG3L2 proteolytic domain account for ~1.5% of European autosomal dominant cerebellar ataxias. *Hum Mutat* **31**, 1117–1124 (2010).
212. Baderna, V. *et al.* A novel AFG3L2 mutation close to AAA domain leads to aberrant OMA1 and OPA1 processing in a family with optic atrophy. *Acta Neuropathol Commun* **8**, (2020).
213. Pfeffer, G. *et al.* Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain* **137**, 1323–1336 (2014).
214. Kaukonen Jyrki *et al.* Role of Adenine Nucleotide Translocator 1 in mtDNA Maintenance. *Science (1979)* **289**, 782–785 (2000).
215. Antonenkov, V. D. *et al.* The human mitochondrial DNA depletion syndrome gene MPV17 encodes a non-selective channel that modulates membrane potential. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 13840–13861 (2015).
216. Alonzo, J. R., Venkataraman, C., Field, M. S. & Stover, P. J. The mitochondrial inner membrane protein MPV17 prevents uracil accumulation in mitochondrial DNA. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 20285–20294 (2018).

217. Dalla Rosa, I. *et al.* MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA Replication in Mitochondria. *PLoS Genet* **12**, (2016).
218. Spinazzola, A. *et al.* MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* **38**, 570–576 (2006).
219. Löllgen, S. & Weiher, H. The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): Lessons from homologs in different species. *Biol Chem* **396**, 13–25 (2015).
220. Blakely, E. L. *et al.* MPV17 mutation causes neuropathy and leukoencephalopathy with multiple mtDNA deletions in muscle. *Neuromuscular Disorders* **22**, 587–591 (2012).
221. Garone, C. *et al.* MPV17 mutations causing adult-onset multisystemic disorder with multiple mitochondrial DNA deletions. *Arch Neurol* **69**, 1648–1651 (2012).
222. Boczonadi, V. *et al.* Mitochondrial oxodicarboxylate carrier deficiency is associated with mitochondrial DNA depletion and spinal muscular atrophy-like disease. *Genetics in Medicine* **20**, 1224–1235 (2018).
223. Fiermonte, G. *et al.* Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem. J* **344**, 953–960 (1999).
224. Punzi, G. *et al.* SLC25A10 biallelic mutations in intractable epileptic encephalopathy with complex I deficiency. *Hum Mol Genet* **27**, 499–504 (2018).
225. Lancaster, M. S. & Graham, B. H. Succinyl-CoA Synthetase Dysfunction as a Mechanism of Mitochondrial Encephalomyopathy: More than Just an Oxidative Energy Deficit. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
226. Almudhry, M. *et al.* Methylmalonic aciduria as a biochemical marker for mitochondrial DNA depletion syndrome in patients with developmental delay and movement disorders: a case series. *Front Neurol* **14**, (2023).
227. Ostergaard, E. *et al.* Deficiency of the α subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* **81**, 383–387 (2007).

228. Elpeleg, O. *et al.* Deficiency of the ADP-Forming Succinyl-CoA Synthase Activity Is Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial DNA Depletion. *Am J Hum Genet* **76**, 1081–1086 (2005).
229. El-Hattab AW & Scaglia F. *SUCLG1-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria*. GeneReviews (2017).
230. Miller, C., Wang, L., Ostergaard, E., Dan, P. & Saada, A. The interplay between SUCLA2, SUCLG2, and mitochondrial DNA depletion. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1812**, 625–629 (2011).
231. Gut, P. *et al.* SUCLA2 mutations cause global protein succinylation contributing to the pathomechanism of a hereditary mitochondrial disease. *Nat Commun* **11**, (2020).
232. Medina-Kauwe, L. K. *et al.* 4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA-transaminase) deficiency. *J Inherit Metab Dis* **22**, 414–427 (1999).
233. Blázquez-Bermejo, C. *et al.* Increased dNTP pools rescue mtDNA depletion in human POLG-deficient fibroblasts. *FASEB Journal* **33**, 7168–7179 (2019).
234. Daithankar, V. N., Farrell, S. R. & Thorpe, C. Augmenter of liver regeneration: Substrate specificity of a flavin-dependent oxidoreductase from the mitochondrial intermembrane space. *Biochemistry* **48**, 4828–4837 (2009).
235. Di Fonzo, A. *et al.* The Mitochondrial Disulfide Relay System Protein GFER Is Mutated in Autosomal-Recessive Myopathy with Cataract and Combined Respiratory-Chain Deficiency. *Am J Hum Genet* **84**, 594–604 (2009).
236. Nambot, S. *et al.* Further delineation of a rare recessive encephalomyopathy linked to mutations in GFER thanks to data sharing of whole exome sequencing data. *Clin Genet* **92**, 188–198 (2017).
237. Bektas, M. *et al.* A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *Journal of Cell Biology* **169**, 801–811 (2005).
238. Klingenberg, M. Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1788**, 2048–2058 (2009).
239. Epand, R. M., Epand, R. F., Berno, B., Pelosi, L. & Brandolin, G. Association of phosphatidic acid with the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochemistry* **48**, 12358–12364 (2009).

240. Calvo, S. E. *et al.* Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med* **4**, (2012).
241. Mayr, J. A. *et al.* Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes sengers syndrome. *Am J Hum Genet* **90**, 314–320 (2012).
242. Cenciarelli, C. *et al.* Identification of a family of human F-box proteins. *Current Biology* **9**, 1177–1179 (1999).
243. Winston, J. T. *et al.* A family of mammalian F-box proteins. *Current Biology* **9**, 1180–1182 (1999).
244. Alsina, D. *et al.* FBXL 4 deficiency increases mitochondrial removal by autophagy. *EMBO Mol Med* **12**, (2020).
245. Bonnen, P. E. *et al.* Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. *Am J Hum Genet* **93**, 471–481 (2013).
246. Huemer, M. *et al.* Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations. *J Inherit Metab Dis* **38**, 905–914 (2015).
247. Garone, C. *et al.* Defective mitochondrial rRNA methyltransferase MRM2 causes MELAS-like clinical syndrome. *Hum Mol Genet* **26**, 4257–4266 (2017).
248. Feichtinger, R. G. *et al.* Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies. *Am J Hum Genet* **101**, 525–538 (2017).
249. Marchet, S. *et al.* Homozygous mutations in C1QBP as cause of progressive external ophthalmoplegia (PEO) and mitochondrial myopathy with multiple mtDNA deletions. *Hum Mutat* **41**, 1745–1750 (2020).
250. Nass, M. M. K. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* **72**, 21–222 (1972).
251. Moraes, C. T., Kenyon, L. & Hao, H. Mechanisms of Human Mitochondrial DNA Maintenance: The Determining Role of Primary Sequence and Length over Function. *Mol Biol Cell* **10**, 3345–3356 (1999).
252. Kristiansen, C. K. *et al.* Deoxyribonucleoside treatment rescues EtBr-induced mtDNA depletion in iPSC-derived neural stem cells with POLG mutations. *FASEB Journal* **37**, (2023).

253. Leibowitz, R. D. The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *Journal of cell biology* **51**, 116–122 (1971).
254. Seidel-Rogol, B. L. & Shadel, G. S. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **30**, (2002).
255. Stewart, J. D. *et al.* POLG mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1812**, 321–325 (2011).
256. King, M. P. & Attardi, G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in enzymology* **264**, 304–313 (1996).
257. Nelson, I., Hanna, M. G., Wood, N. W. & Harding, A. E. Depletion of Mitochondrial DNA by ddC in Untransformed Human Cell Lines. *Somatic Cell and Molecular Genetics. Dd* **23**, 287–290 (1997).
258. Bulst, S. *et al.* In vitro supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndromes. *Hum Mol Genet* **18**, 1590–1599 (2009).
259. Bulst, S. *et al.* In vitro supplementation with deoxynucleoside monophosphates rescues mitochondrial DNA depletion. *Mol Genet Metab* **107**, 95–103 (2012).
260. Haroon, S. *et al.* Multiple Molecular Mechanisms Rescue mtDNA Disease in *C. elegans*. *Cell Rep* **22**, 3115–3125 (2018).
261. Rahn, J. J., Bestman, J. E., Stackley, K. D. & Chan, S. S. L. Zebrafish lacking functional DNA polymerase gamma survive to juvenile stage, despite rapid and sustained mitochondrial DNA depletion, altered energetics and growth. *Nucleic Acids Res* **43**, 10338–10352 (2015).
262. D’Agati, G. *et al.* A defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent casper zebrafish. *Dev Biol* **430**, 11–17 (2017).
263. Krauss, J., Astrinides, P., Frohnhöfer, H. G., Walderich, B. & Nüsslein-Volhard, C. Transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biol Open* **2**, 703–710 (2013).

264. Munro, B., Horvath, R. & Müller, J. S. Nucleoside supplementation modulates mitochondrial DNA copy number in the dguok^{-/-} zebrafish. *Hum Mol Genet* **28**, 796–803 (2019).
265. Bennett, B. *et al.* Potentially diagnostic electron paramagnetic resonance spectra elucidate the underlying mechanism of mitochondrial dysfunction in the deoxyguanosine kinase deficient rat model of a genetic mitochondrial DNA depletion syndrome. *Free Radic Biol Med* **92**, 141–151 (2016).
266. Zhou, X. *et al.* Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice. *Hum Mol Genet* **17**, 2329–2335 (2008).
267. Zhou, X. *et al.* Severe mtDNA depletion and dependency on catabolic lipid metabolism in DGUOK knockout mice. *Hum Mol Genet* **28**, 2874–2884 (2019).
268. Lewis, W. *et al.* Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase γ *. *Laboratory investigation* **87**, 326–335 (2007).
269. Hance, N., Ekstrand, M. I. & Trifunovic, A. Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet* **14**, 1775–1783 (2005).
270. Aleksandra Trifunovic *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).
271. Humble, M. M. *et al.* Polg2 is essential for mammalian embryogenesis and is required for mtDNA maintenance. *Hum Mol Genet* **22**, 1017–1025 (2013).
272. Tynismaa, H. *et al.* Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **102**, 17687–17692 (2005).
273. Cerritelli, S. M. *et al.* Failure to Produce Mitochondrial DNA Results in Embryonic Lethality in Rnaseh1 Null Mice. *Mol Cell* **11**, 807–815 (2003).
274. Matic, S. *et al.* Mice lacking the mitochondrial exonuclease MGME1 accumulate mtDNA deletions without developing progeria. *Nat Commun* **9**, (2018).
275. Kimura, T. *et al.* Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet* **34**, 440–445 (2003).

276. Zhao, Q., Zhou, X., Kuiper, R., Curbo, S. & Karlsson, A. Mitochondrial dysfunction is associated with lipid metabolism disorder and upregulation of angiotensin-converting enzyme 2. *PLoS One* **17**, (2022).
277. Zhao, Q. *et al.* Long term survival and abnormal liver fat accumulation in mice with specific thymidine kinase 2 deficiency in liver tissue. *PLoS One* **18**, (2023).
278. Akman, H. O. *et al.* Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Hum Mol Genet* **17**, 2433–2440 (2008).
279. Borreguero, C. F. *et al.* Deoxyguanosine kinase mutation F180S is associated with a lean phenotype in mice. *Int J Obes* **47**, 215–223 (2023).
280. Alavi, M. V. *et al.* A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* **130**, 1029–1042 (2007).
281. Weiher, H., Noda, T., Gray, D. A., Sharpe, A. H. & Jaenisch, R. Transgenic Mouse Model of Kidney Disease: Insertional Inactivation of Ubiquitously Expressed Gene Leads to Nephrotic Syndrome. *Cell* **62**, 425–434 (1990).
282. Viscomi, C. *et al.* Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in Mpv17 knockout mice. *Hum Mol Genet* **18**, 12–26 (2009).
283. Graham, B. H. *et al.* A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* **16**, 226–234 (1997).
284. Donti, T. R. *et al.* Screen for abnormal mitochondrial phenotypes in mouse embryonic stem cells identifies a model for succinyl-CoA ligase deficiency and mtDNA depletion. *Dis Model Mech* **7**, 271–280 (2014).
285. Kacso, G. *et al.* Two transgenic mouse models for beta subunit components of succinate-CoA ligase yielding pleiotropic metabolic alterations. *Biochemical Journal* **473**, 3463–3485 (2016).
286. Paredes, J. A., Zhou, X., Höglund, S. & Karlsson, A. Gene Expression Deregulation in Postnatal Skeletal Muscle of TK2 Deficient Mice Reveals a Lower Pool of Proliferating Myogenic Progenitor Cells. *PLoS One* **8**, (2013).

287. Krishnan, S. *et al.* Transgene expression of *Drosophila melanogaster* nucleoside kinase reverses mitochondrial thymidine kinase 2 deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 5072–5079 (2013).
288. Krishnan, S. *et al.* Long term expression of *Drosophila melanogaster* nucleoside kinase in thymidine kinase 2-deficient mice with no lethal effects caused by nucleotide pool imbalances. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 32835–32844 (2014).
289. Zhou, X. *et al.* Coordinated pyruvate kinase activity is crucial for metabolic adaptation and cell survival during mitochondrial dysfunction. *Hum Mol Genet* **30**, 2012–2026 (2021).
290. Stephan, K., Brandner, S., Kleinle, S., Liechti, S. & Straumann, D. Mitochondrial diseases represent a risk factor for valproate-induced fulminant liver failure. *Liver* **20**, 345–348 (2000).
291. Kuszak, A. J. *et al.* Nutritional Interventions for Mitochondrial OXPHOS Deficiencies: Mechanisms and Model Systems. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **13**, 163–191 (2018).
292. Kaji, S. *et al.* Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex II. *Mol Genet Metab* **97**, 292–296 (2009).
293. Rodriguez, M. C. *et al.* Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* **35**, 235–242 (2007).
294. Hirano, M., Emmanuele, V. & Quinzii, C. M. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem* **62**, 467–481 (2018).
295. Moran, N. F., Bain, M. D., Muqit, M. M. K. & Bax, B. E. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy for mngie. *Neurology* **71**, 686–688 (2008).
296. Bax, B. E. *et al.* Clinical and biochemical improvements in a patient with MNGIE following enzyme replacement. *Neurology* 1269–1271 (2013) doi:10.1212/WNL.0b013e3182a6cb4b.
297. Levene, M. *et al.* Safety and efficacy of erythrocyte encapsulated thymidine phosphorylase in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Clin Med* **8**, (2019).

298. Desgranges, C., Razaka, G., Rabaud, M. & Bricaud, H. Catabolism of thymidine in human blood platelets purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* **654**, 218 (1981).
299. Yoshimura, A. *et al.* Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 107–113 (1990) doi:10.1016/0304-4165(90)90160-x.
300. Hirano, M. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* **67**, 1458–1460 (2006).
301. Boschetti, E. *et al.* Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS One* **9**, (2014).
302. Hirano, M. *et al.* Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): Position paper on diagnosis, prognosis, and treatment by the MNGIE International Network. *J Inherit Metab Dis* **44**, 376–387 (2021).
303. Parikh, S. *et al.* Solid organ transplantation in primary mitochondrial disease: Proceed with caution. *Mol Genet Metab* **118**, 178–184 (2016).
304. Flierl, A., Chen, Y., Samulski, R. J. & Wallace, D. C. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/ muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* **12**, 570–578 (2005).
305. Bottani, E. *et al.* AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtdna levels and prevents diet-induced liver failure. *Molecular Therapy* **22**, 10–17 (2014).
306. Torres-Torronteras, J. *et al.* Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther* **18**, 795–806 (2011).
307. Torres-Torronteras, J. *et al.* Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Molecular Therapy* **22**, 901–907 (2014).
308. Vila-Julà, F. *et al.* Efficacy of adeno-associated virus gene therapy in a MNGIE murine model enhanced by chronic exposure to nucleosides. *EBioMedicine* **62**, (2020).
309. Taanman, J. W., Muddle, J. R. & Muntau, A. C. Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture

- of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* **12**, 1839–1845 (2003).
310. Buchaklian, A. H., Helbling, D., Ware, S. M. & Dimmock, D. P. Recessive deoxyguanosine kinase deficiency causes juvenile onset mitochondrial myopathy. *Mol Genet Metab* **107**, 92–94 (2012).
 311. Hecker, S. J. & Erion, M. D. Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J Med Chem* **51**, 2328–2345 (2008).
 312. Saada, A. Mitochondrial deoxyribonucleotide pools in deoxyguanosine kinase deficiency. *Mol Genet Metab* **95**, 169–173 (2008).
 313. Garone, C. *et al.* Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO Mol Med* **6**, 1016–1027 (2014).
 314. Kamath, V. G., Hsiung, C. H., Lizenby, Z. J. & McKee, E. E. Heart mitochondrial TTP synthesis and the compartmentalization of TMP. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 2034–2041 (2015).
 315. Lopez-Gomez, C. *et al.* Deoxycytidine and Deoxythymidine Treatment for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Ann Neurol* **81**, 641–652 (2017).
 316. Lopez-Gomez, C. *et al.* Bioavailability and cytosolic kinases modulate response to deoxynucleoside therapy in TK2 deficiency. *EBioMedicine* **46**, 356–367 (2019).
 317. Blázquez-Bermejo, C. *et al.* Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in thymidine kinase 2-deficient mice. *EBioMedicine* **46**, 342–355 (2019).
 318. Domínguez-González, C. *et al.* Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2–Deficient Myopathy. *Ann Neurol* **86**, 293–303 (2019).
 319. Hernandez-Voth, A. *et al.* Deoxynucleoside therapy for respiratory involvement in adult patients with thymidine kinase 2-deficient myopathy. *BMJ Open Respir Res* **7**, (2020).
 320. Lopez-Gomez, C. *et al.* Synergistic Deoxynucleoside and Gene Therapies for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Ann Neurol* **90**, 640–652 (2021).
 321. Pontarin, G., Ferraro, P., Bee, L., Reichard, P. & Bianchi, V. Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13302–13307 (2012).

322. Castells-Sarret, N. *et al.* Comparative genomic hybridisation as a first option in genetic diagnosis: 1,000 cases and a cost-benefit analysis. *An Pediatr (Engl Ed)* **89**, 3–11 (2018).
323. Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium Held in Washington, DC, in April 2015. (2015) doi:10.1128/AAMCol.Apr.2015.
324. Molina-Granada, D. *et al.* Most mitochondrial dGTP is tightly bound to respiratory complex I through the NDUFA10 subunit. *Commun Biol* **5**, (2022).
325. Landoni, J. C., Wang, L. & Suomalainen, A. Quantitative solid-phase assay to measure deoxynucleoside triphosphate pools. *Biol Methods Protoc* **3**, (2018).
326. Midway, S., Robertson, M., Flinn, S. & Kaller, M. Comparing multiple comparisons: practical guidance for choosing the best multiple comparisons test. *PeerJ* **8**, (2020).
327. Sullivan, G. M. & Feinn, R. S. Facts and Fictions About Handling Multiple Comparisons. *J Grad Med Educ* **13**, 457–460 (2021).
328. Dombi, E. *et al.* Nucleoside supplements as treatments for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Front Cell Dev Biol* **12**, (2024).
329. Carreño-Gago, L. *et al.* Identification and characterization of new RNASEH1 mutations associated with PEO syndrome and multiple mitochondrial DNA deletions. *Front Genet* **10**, (2019).
330. Herrström Sjöberg, A., Wang, L. & Eriksson, S. Substrate Specificity of Human Recombinant Mitochondrial Deoxyguanosine Kinase with Cytostatic and Antiviral Purine and Pyrimidine Analogs. *Molecular Pharmacology* **53**, 270–273 (1997).
331. Leanza, L., Ferraro, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 16437–16445 (2008).
332. Uhlén, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science* (1979) **347**, (2015).
333. Flinn, A. M. & Gennery, A. R. Adenosine deaminase deficiency: A review. *Orphanet J Rare Dis* **13**, (2018).

334. Korycka, A., Boski, J. Z. & Robak, T. Forodesine (BCX-1777, Immucillin H) – A New Purine Nucleoside Analogue: Mechanism of Action and Potential Clinical Application. *Minireviews in medicinal chemistry* **7**, 976–983 (2007).
335. Vanden Avond, M. A. *et al.* The nucleotide prodrug CERC-913 improves mtDNA content in primary hepatocytes from DGUOK-deficient rats. *J Inherit Metab Dis* **44**, 492–501 (2021).
336. Pai, C. C. & Kearsey, S. E. A critical balance: dNTPs and the maintenance of genome stability. *Genes (Basel)* **8**, (2017).
337. Berardo, A., Domínguez-González, C., Engelstad, K. & Hirano, M. Advances in Thymidine Kinase 2 Deficiency: Clinical Aspects, Translational Progress, and Emerging Therapies. *J Neuromuscul Dis* **9**, 225–235 (2022).
338. Barros, L. E. *et al.* Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms. *Pfligers Arch-European Journal of Physiology* **429**, 394–399 (1995).
339. Nishimura, T. *et al.* Quantification of ENT1 and ENT2 Proteins at the Placental Barrier and Contribution of These Transporters to Ribavirin Uptake. *J Pharm Sci* **108**, 3917–3922 (2019).
340. Nishimura, T. *et al.* Mechanism of nucleoside uptake in rat placenta and induction of placental CNT2 in experimental diabetes. *Drug Metab Pharmacokinet* **27**, 439–446 (2012).
341. Ellacott, K. L. J., Morton, G. J., Woods, S. C., Tso, P. & Schwartz, M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab* **12**, 10–17 (2010).

9. FIGURES SUPLEMENTÀRIES

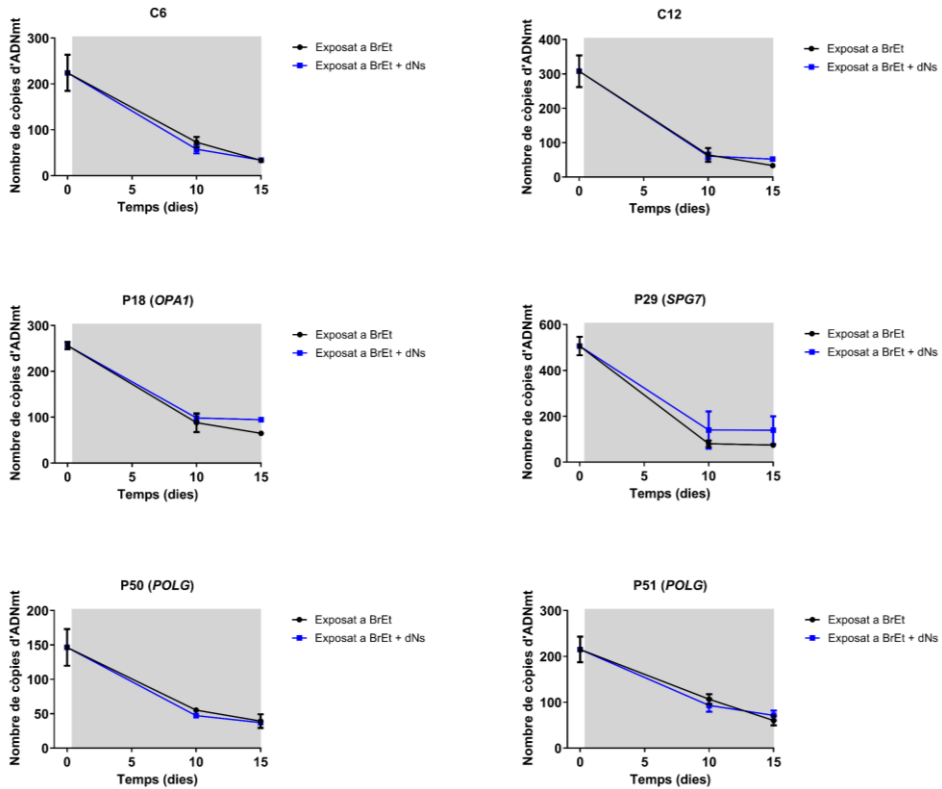


Figura Suplementària 1. Nombre de còpies d'ADNmT per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en OPA1, SPG7 i POLG quan s'incuben a la vegada amb BrEt i els 4 dNs. La línia representa la quantitat d'ADNmT en els fibroblasts de controls sans (C6 i C12) i en fibroblasts de pacients amb mutacions en gens associats a MDDS (P18, P29, P50 i P51) exposades a BrEt 25 ng/mL durant 15 dies per induir la depleció de l'ADNmT (regió marcada en gris) incubat en presència (en blau) o absència (en negre) del tractament amb els 4 dNs (dAdo, dGuo, dCtd, dThd) a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. En l'experiment s'han inclòs quatre línies cel·lulars que, gràcies a experiments previs, es sap que reverteixen la depleció de l'ADNmT en retirar el BrEt sense tractament amb dNs (cèl·lules C6, C12, P18 i P29) i dues línies cel·lulars que no reverteixen la depleció en retirar el BrEt sense el tractament amb dNs (cèl·lules amb les mutacions p.[Leu623Trp];[Lys755Glu] en POLG (P50) i cèl·lules amb les mutacions p.[Tyr955Cys];[Y955Cys] en POLG (P51).

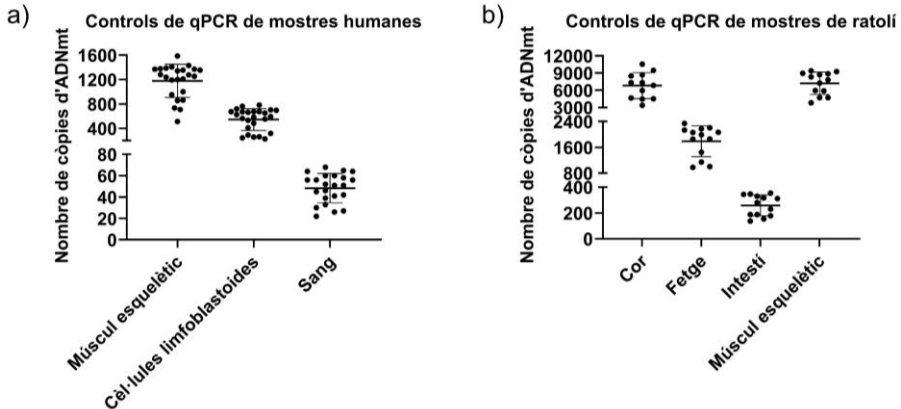


Figura Suplementària 2. Valors del control de mètode de la qPCR. Nombre de còpies d'ADNmt en els controls de precisió del mètode de les qPCR de mostres humanes (a) o de mostres de ratolí (b). Els punts mostren els valors de cada determinació independent en una placa de qPCR diferent, la línia horitzontal representa la mitjana i les barres d'error la desviació estàndard.

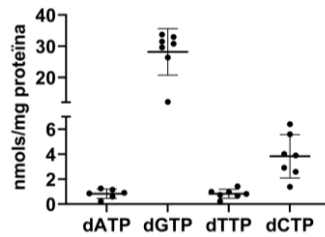


Figura Suplementària 3. Valors del control de mètode de la determinació enzimàtica dels dNTPs. Quantitat de cada dNTP (nmols/mg proteïna) mesurat en la mostra de fetge que serveix com a control de precisió de la determinació de dNTPs. Els punts mostren els valors de cada determinació independent, la línia horitzontal representa la mitjana i les barres d'error la desviació estàndard.

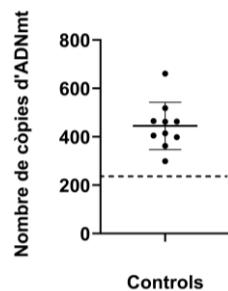


Figura Suplementària 4. Nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts dels controls sans a t0. Nombre de còpies d'ADNmt de cada un dels controls (punts) amb la seva mitjana i desviació estàndard. La línia discontinua marca el llindar a partir del qual s'ha considerat que unes cèl·lules presenten depleció espontània de l'ADNmt (dues desviacions estàndard inferiors a la mitjana).

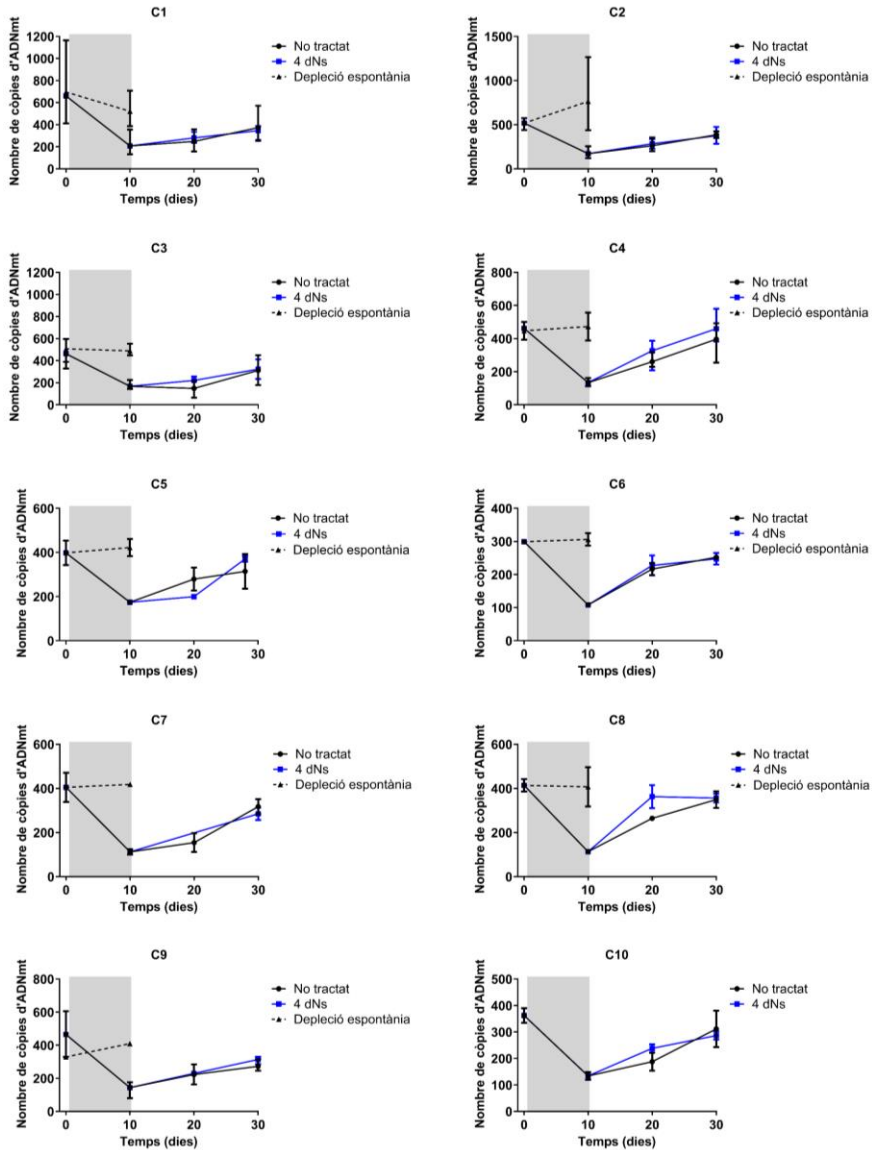


Figura Suplementària 5. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans (C1-C10) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia discontinua representa el nombre de còpies d'ADNmt en les cèl·lules que no s'han incubat amb BrEt per veure si hi ha depleció espontània de l'ADNmt. La línia contínua representa la quantitat d'ADNmt en les cèl·lules exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb els 4 dNs a concentració de 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M. Els valors són la mitjana i el rang de diferents experiments (C1-C4, C6, C9, C10) o la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment (C5, C7, C8). Les cèl·lules del C5 es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

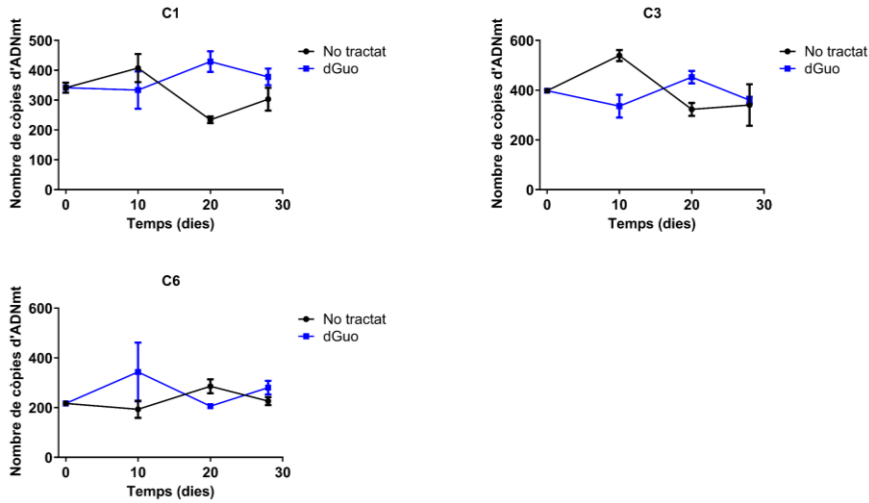


Figura Suplementària 6. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans (C1, C3, C6) tractats amb dGuo utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb dGuo 50 µM. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

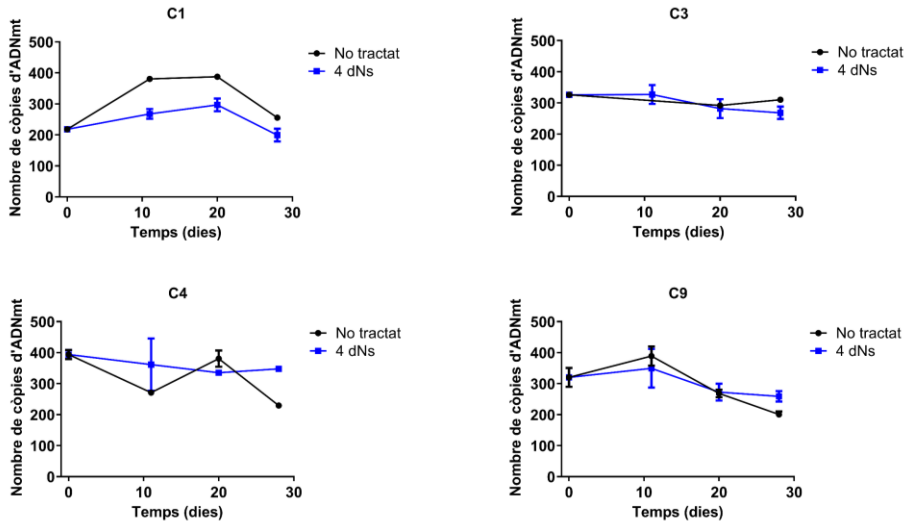


Figura Suplementària 7. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans (C1, C3, C4, C9) tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La línia en negre mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts no tractats i la línia en blau mostra el nombre de còpies d'ADNmt en fibroblasts tractats amb els 4 dNs 50 µM i EHNA 5 µM. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment. Les cèl·lules es van recollir en l'últim punt experimental a dia 28 (en comptes de dia 30) perquè hi havia molta mortalitat.

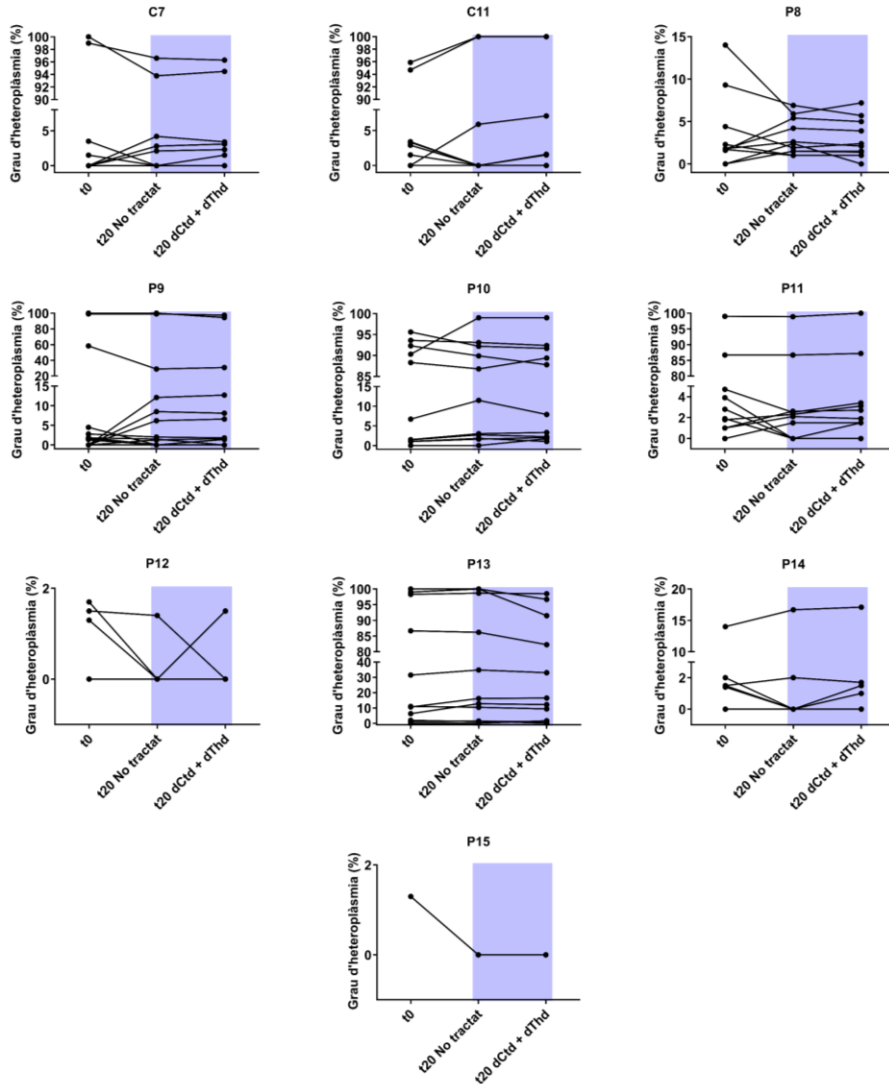


Figura Suplementària 8. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en TK2 tractats amb dCtd + dThd utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb dCtd i dThd 50 µM cada un (t20 dCtd + dThd) en els fibroblasts de controls sans (C7, C11) i de pacients amb mutacions en TK2 (P8 – P15) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt amb BrEt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan n>2), negatiu en tots els casos, excepte en el P11, que va mostrar un increment en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre t20 sense tractament i t20 amb tractament (p=0,0469) i P13, que va mostrar una davallada en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre t20 sense tractament i t20 amb tractament (p=0,0342).

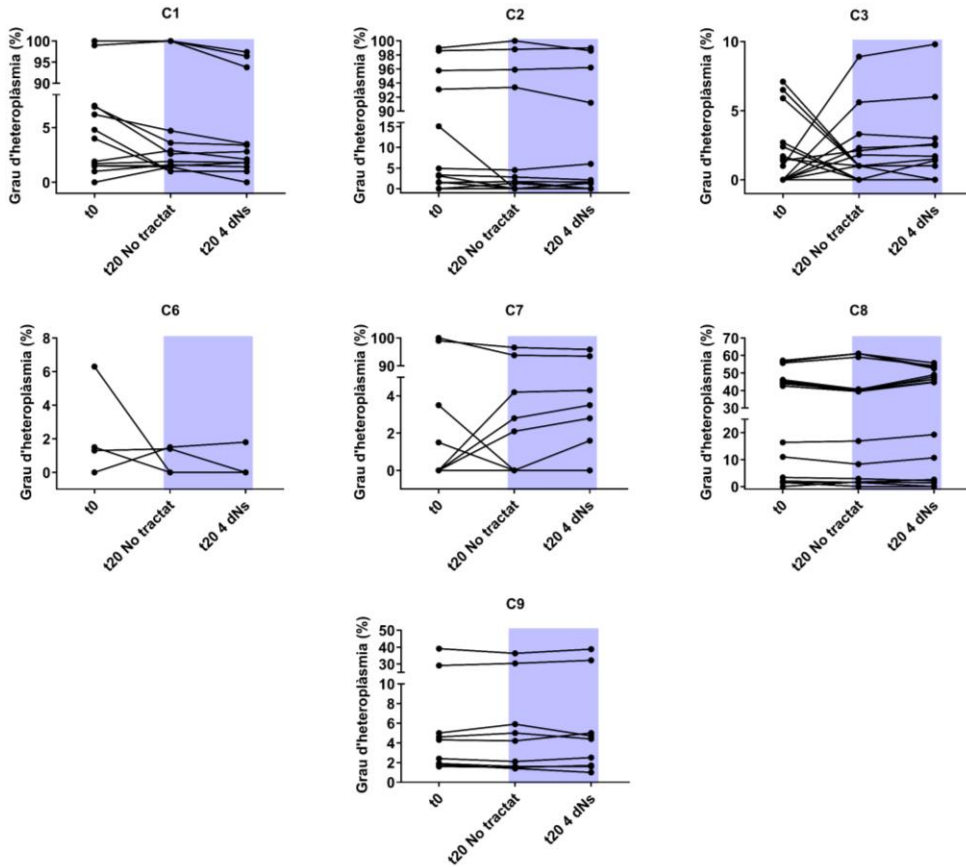


Figura Suplementària 9. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans (C1 – C3, C6 – C9) a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i a dia 20 amb tractament amb els 4 dNs 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M (t20 4 dNs) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt amb BrEt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos, excepte en el C1, que va mostrar una davallada en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 amb tractament ($p=0,0105$) i entre t20 sense i amb tractament ($p=0,0112$).

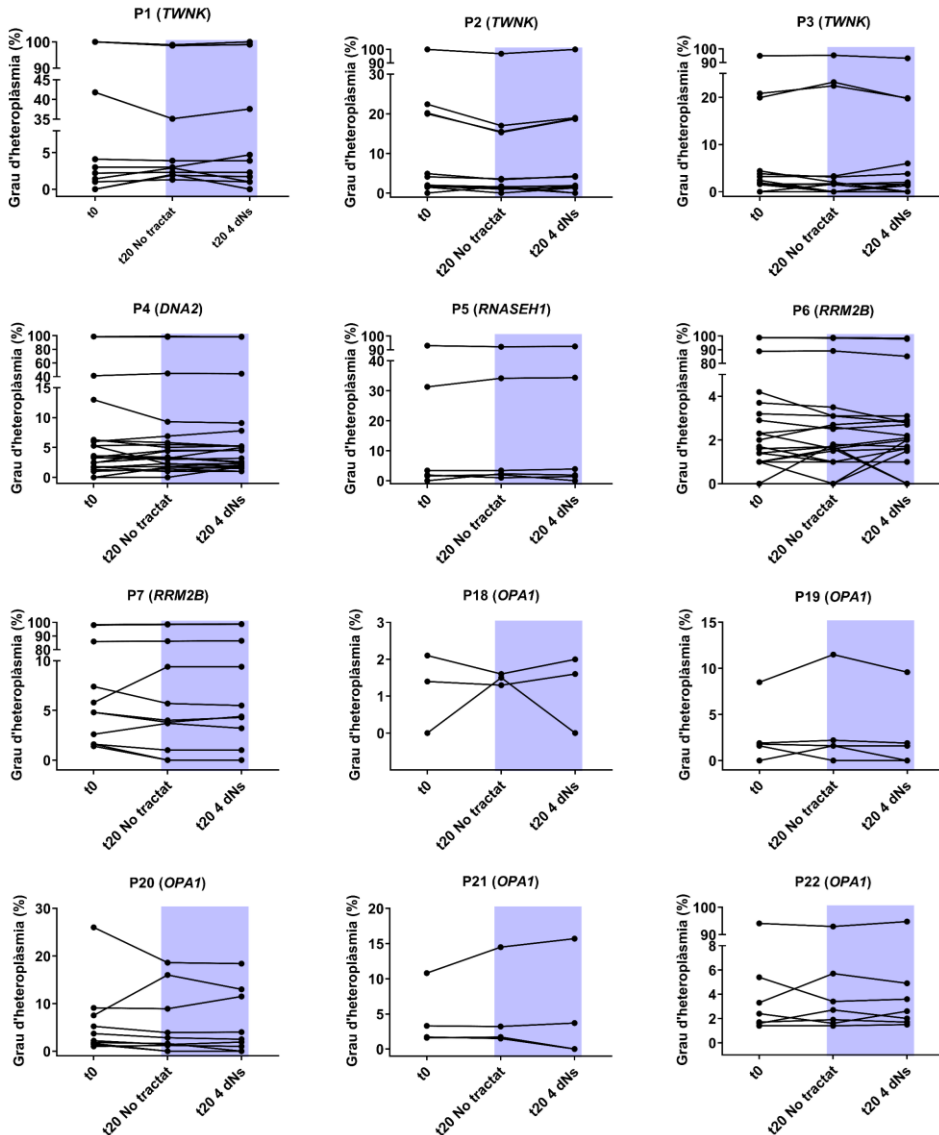
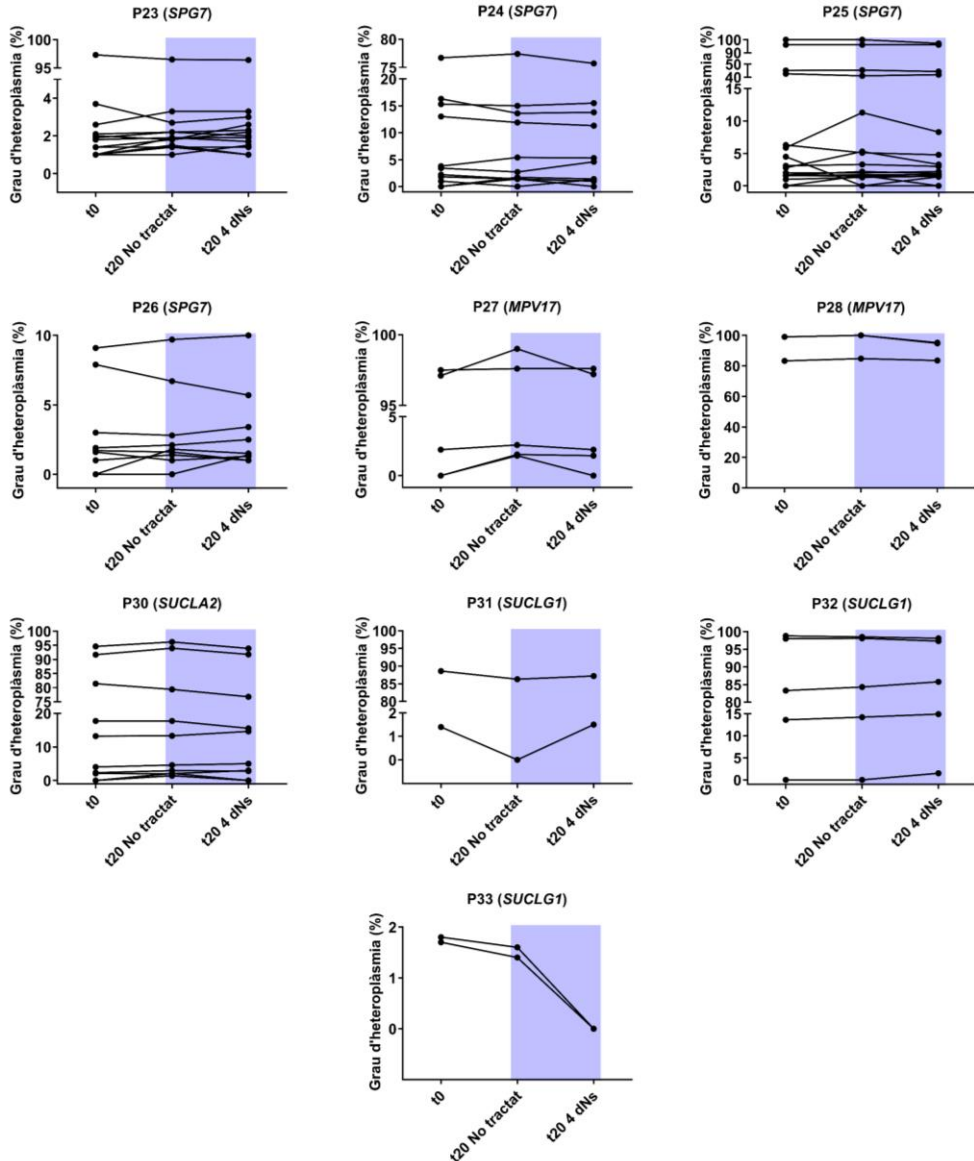


Figura Suplementària 10. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció induïda de l'ADNmt. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS (P1 – P7, P18 – P22) a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb els 4 dNs 50 μ M cada un i EHNA 5 μ M (t20 4 dNs) utilitzant el model de depleció de l'ADNmt amb BrEt. La regió marcada en blau indica els canvis a dia 20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos, excepte en el P2, que va mostrar una davallada en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 sense tractament ($p = 0,0122$) i entre t0 i t20 amb tractament ($p = 0,0039$).



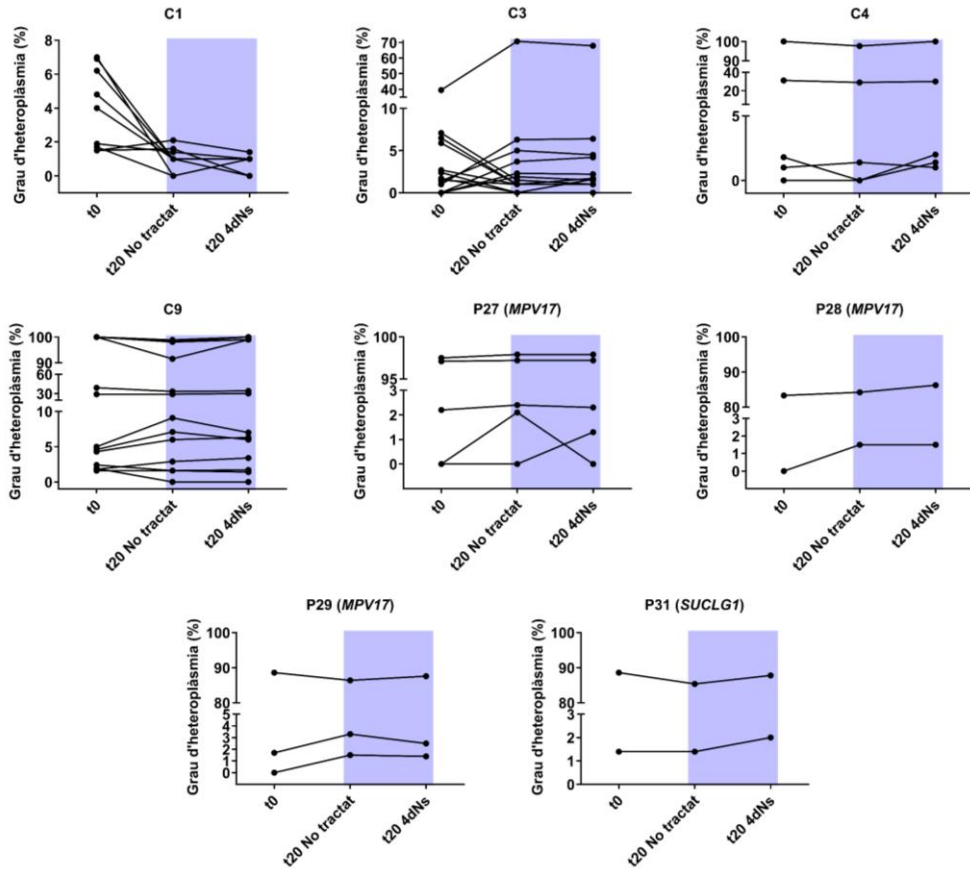


Figura Suplementària 12. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en diferents gens associats a MDDS tractats amb els 4 dNs utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans (C1, C3, C4, C9) i de pacients amb mutacions en MPV17 (P27, P28, P29) i SUCLG1 (P31) a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb els 4 dNs 50 μ M i EHNA 5 μ M (t20 4 dNs) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La regió marcada en blau indica els canvis a t20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos, excepte en el C1, que va mostrar un descens en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 sense tractament ($p=0,0273$) i entre t0 i t20 amb tractament ($p=0,0039$).

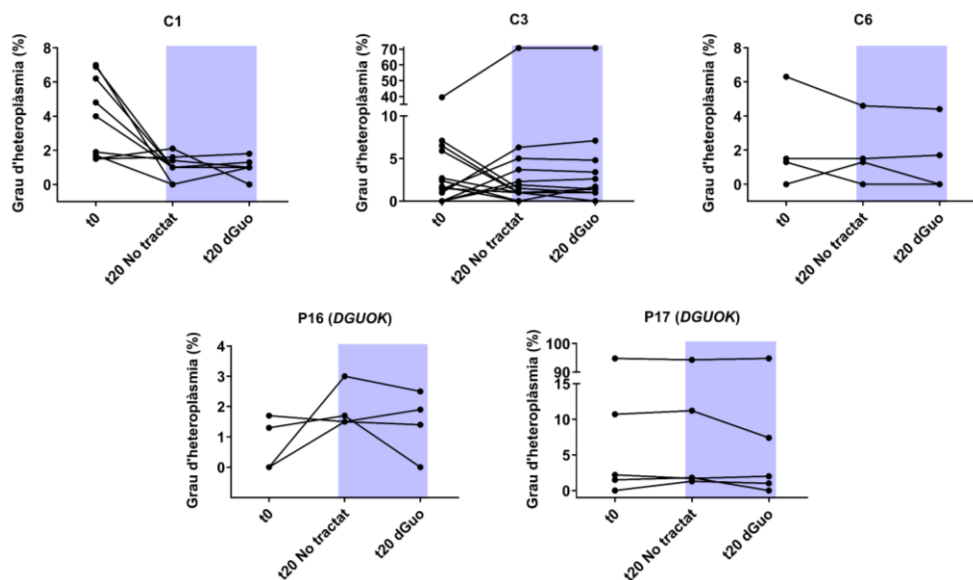


Figura Suplementària 13. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en DGUOK tractats amb dGuo utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. Grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt en fibroblasts de controls sans (C1, C3, C6) i de pacients amb mutacions en DGUOK (P16, P17) a dia 0 (t0), dia 20 sense tractament (t20 No tractat) i dia 20 amb tractament amb dGuo 50 μ M (t20 dGuo) utilitzant el model de depleció espontània de l'ADNmt. La regió marcada en blau indica els canvis a t20 sense tractament i amb tractament i, per tant, mostra l'efecte dels dNs sobre el grau d'heteroplàsmia de les mutacions trobades sobre l'ADNmt. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos, excepte en el C1, que va mostrar un descens en alguns percentatges d'heteroplàsmia entre el t0 i t20 sense tractament ($p=0,0273$) i entre t0 i t20 amb tractament ($p=0,0078$).

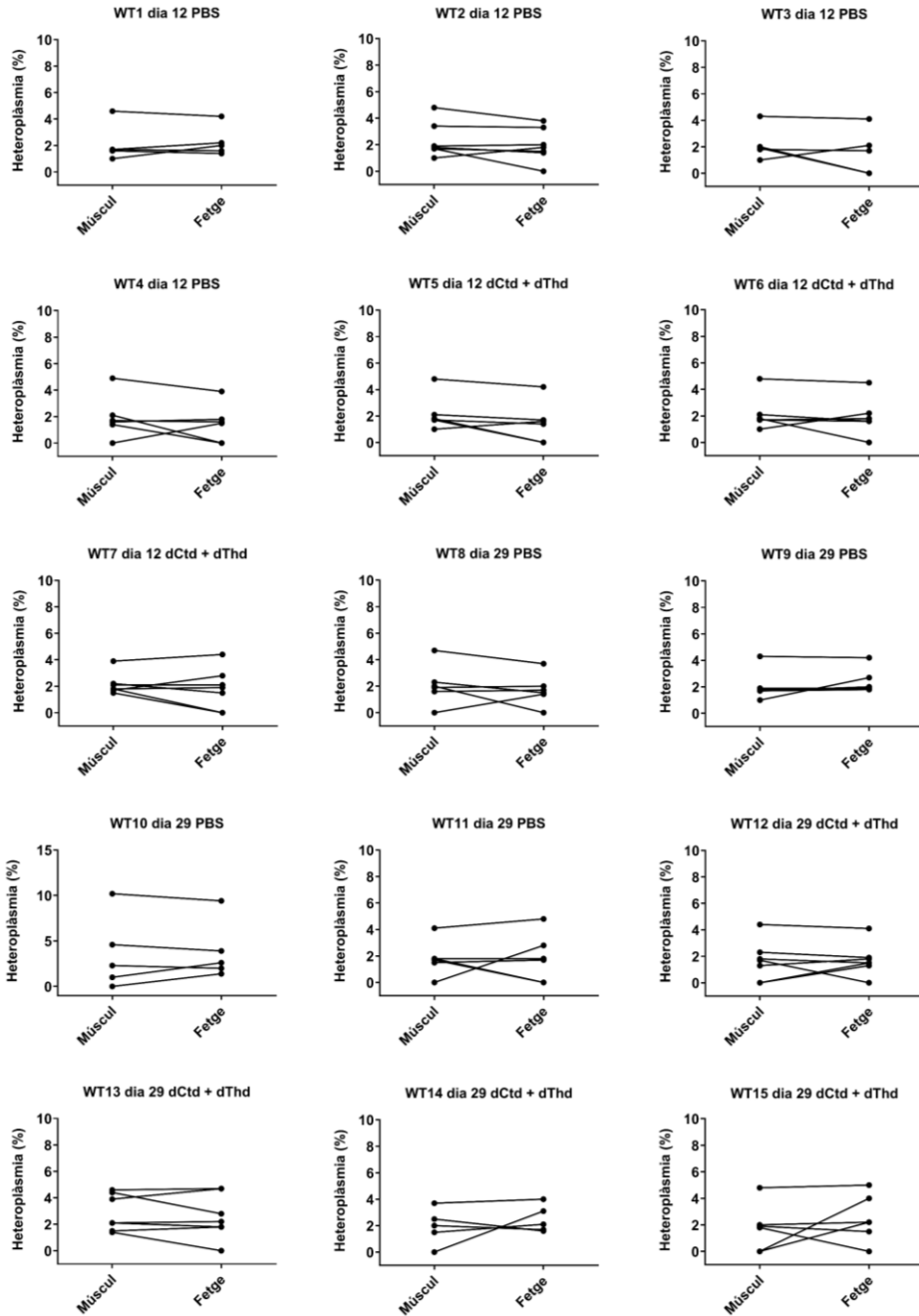


Figura Suplementària 14. Grau d'heteroplàsmia en múscul i fetge de ratolins WT per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Comparació del grau d'heteroplàsmia de les variants trobades sobre l'ADNmt en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge de ratolins Tk2^{+/-} (WT) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat per via oral amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. Test estadístic: Wilcoxon test (quan n>2), negatiu en tots els casos.

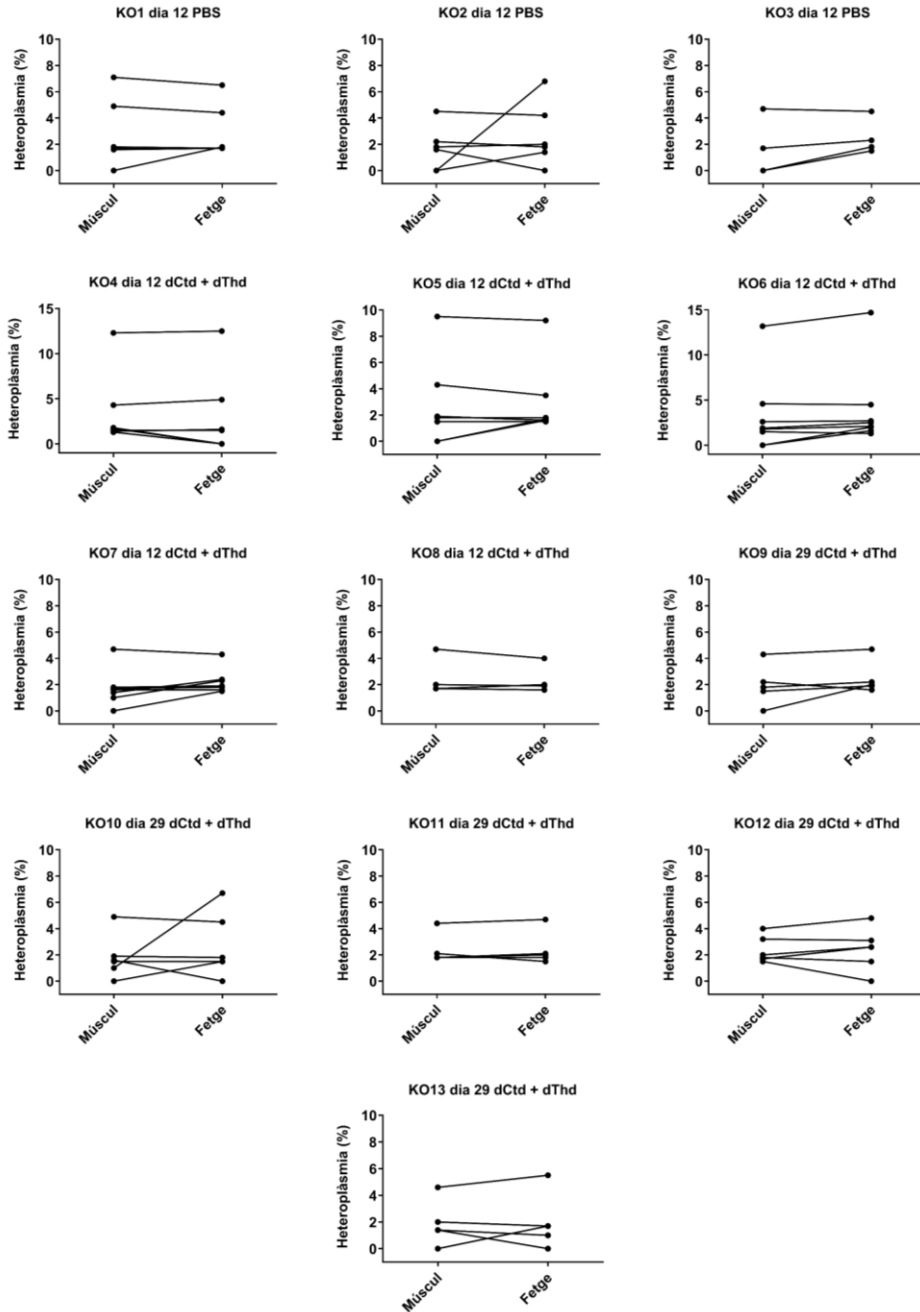


Figura Suplementària 15. Grau d'heteroplàsmia en múscul i fetge de ratolins KO per Tk2 tractats amb PBS o dCtd + dThd. Comparació del grau d'heteroplàsmia de les variants trobades sobre l'ADNmt en múscul esquelètic (gastrocnemi + soli) i fetge de ratolins Tk2^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 4 d'edat per via oral amb PBS o dCtd + dThd 400 mg/kg/dia fins al dia 12 o 29. Test estadístic: Wilcoxon test (quan n>2), negatiu en tots els casos.

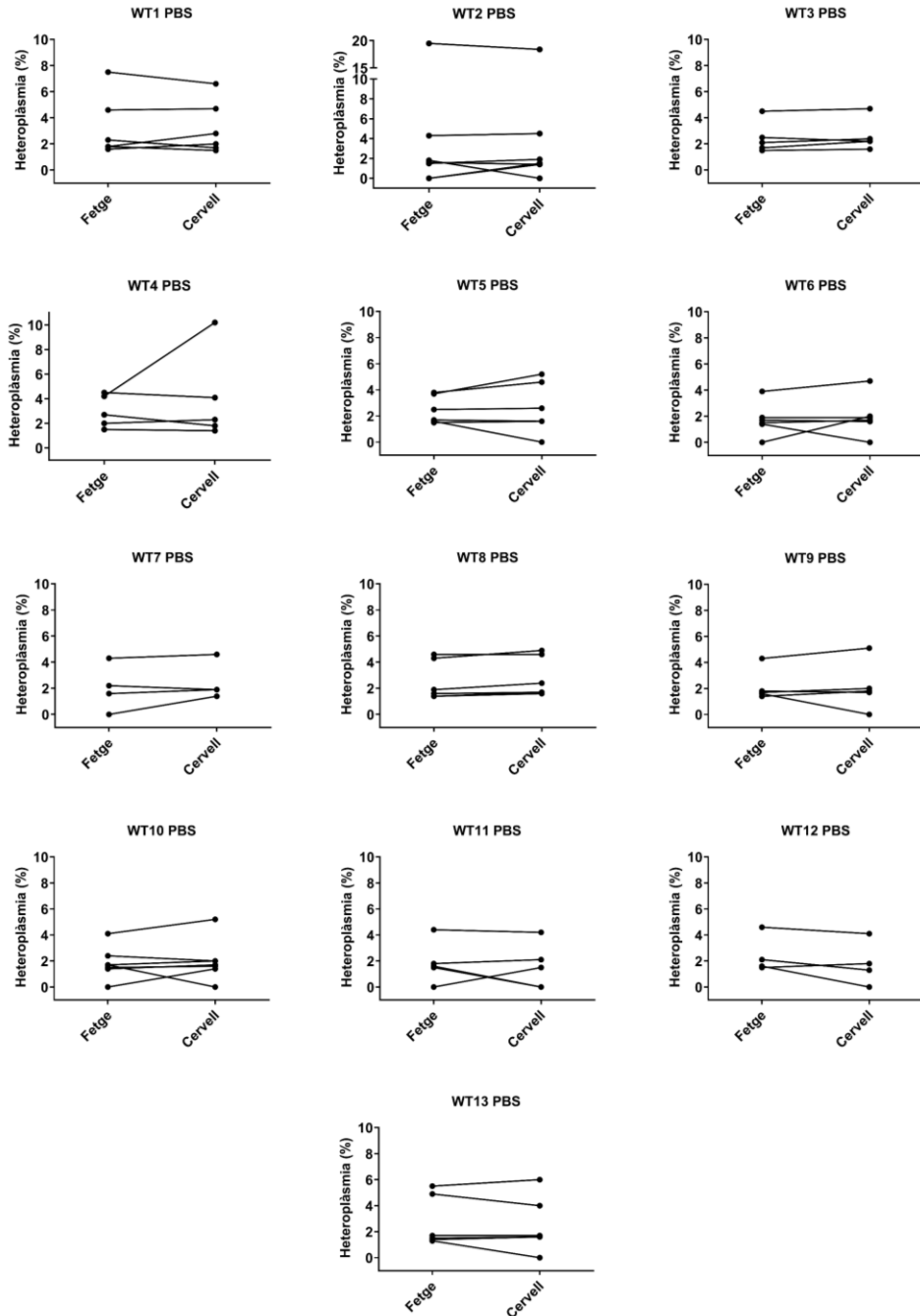
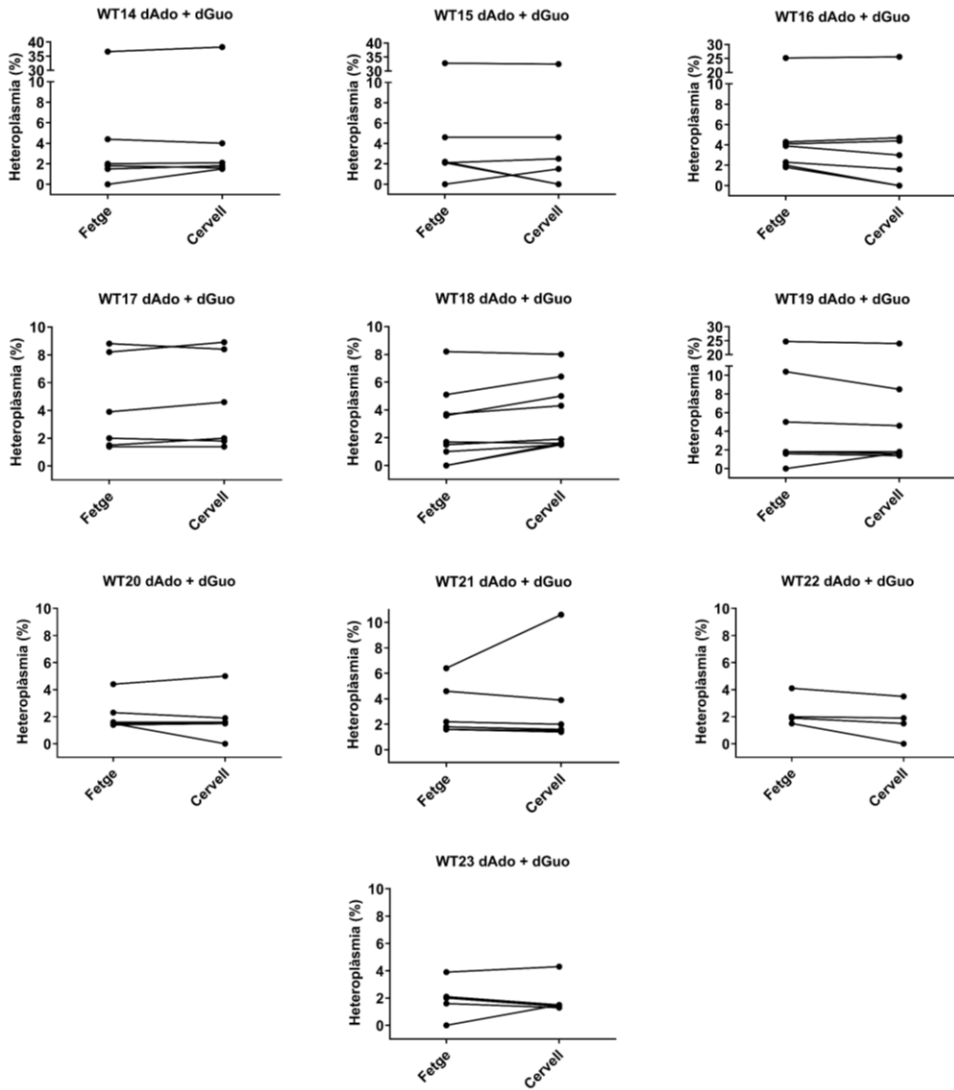


Figura Suplementària 16. Grau d'heteroplàsmia en fetge i cervell de ratolins WT per Dguok tractats amb PBS. Comparació del grau d'heteroplàsmia de les variants trobades sobre l'ADNmt en fetge i cervell de ratolins Dguok^{+/+} (WT) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS per via oral fins a les 6 setmanes d'edat. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.



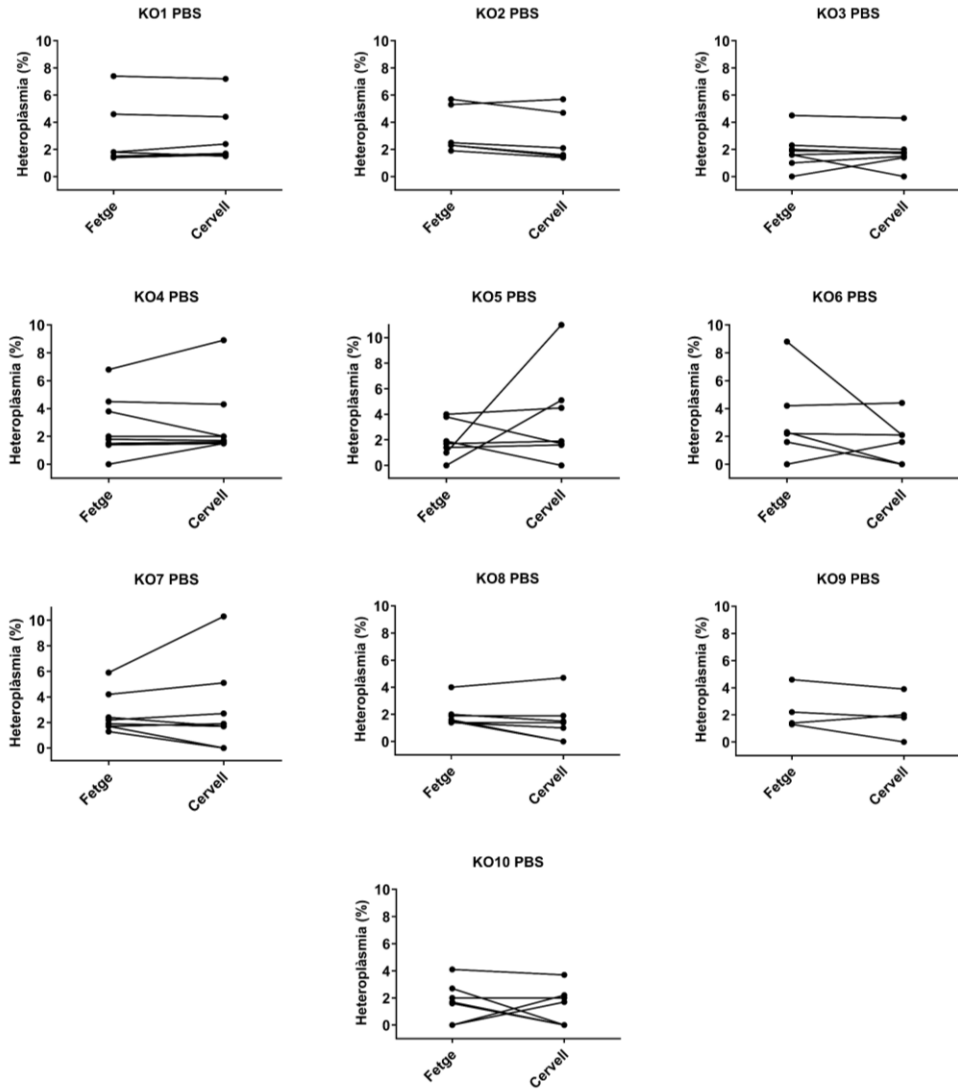
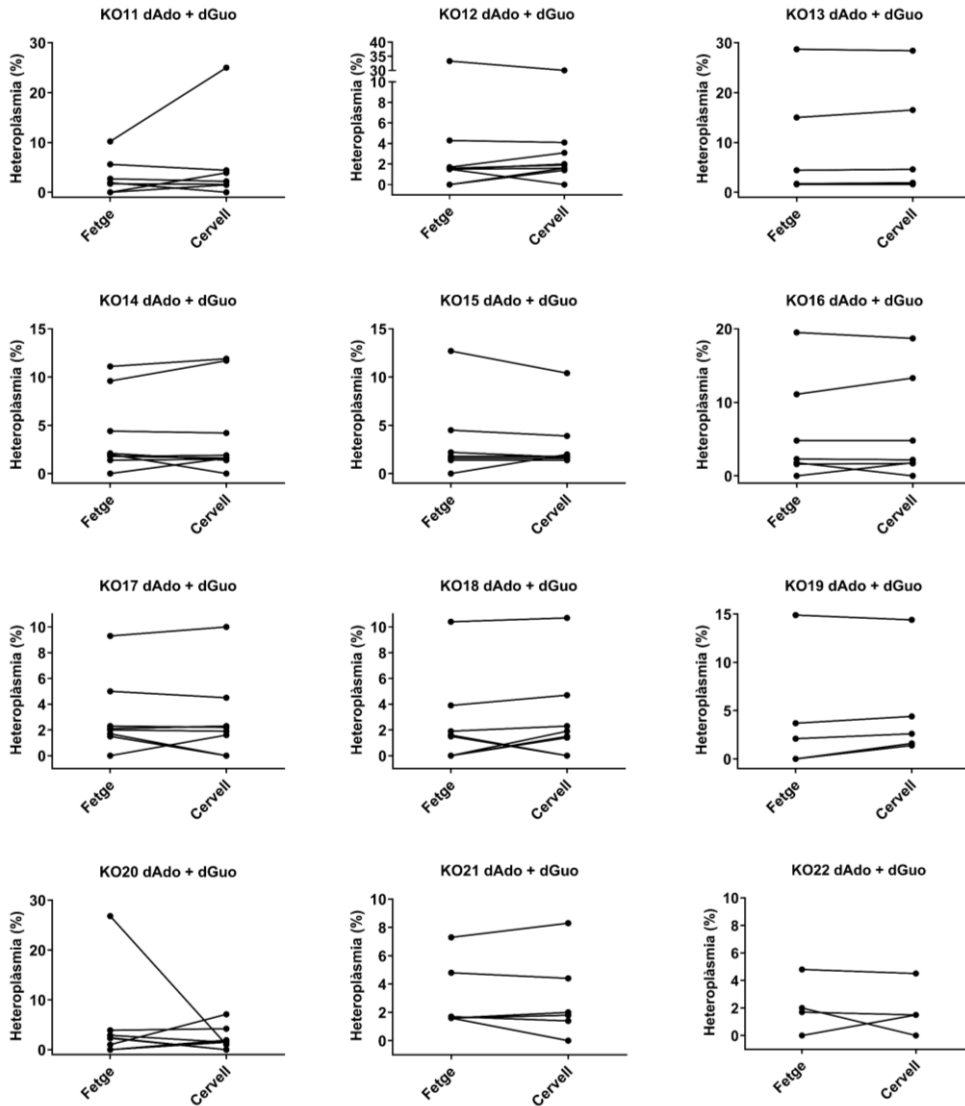


Figura Suplementària 18. Grau d'heteroplàsmia en fetge i cervell de ratolins KO per Dguok tractats amb PBS. Comparació del grau d'heteroplàsmia de les variants trobades sobre l'ADNmt en fetge i cervell de ratolins Dguok^{-/-} (KO) tractats diàriament a partir del dia 8 d'edat amb PBS per via oral fins a les 6 setmanes d'edat. Test estadístic: Wilcoxon test (quan $n > 2$), negatiu en tots els casos.



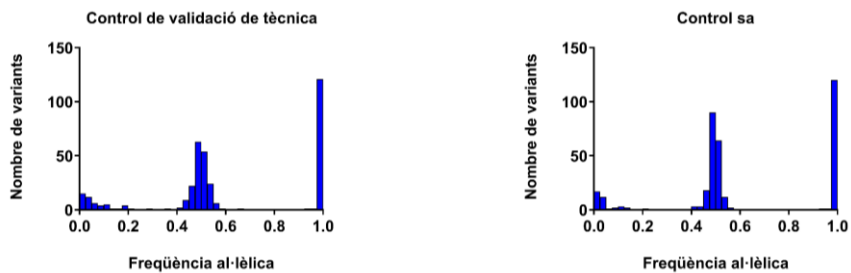


Figura Suplementària 20. Distribució del nombre de variants trobades amb el Human Comprehensive Cancer Panel amb la seva freqüència al·lèlica en el control de validació de la tècnica i en el control sa. Les variants representades tenen una freqüència entre el 1% i el 100% i s’han analitzat en ADN de sang.

Taula Suplementària 1. Resultat del test estadístic Mantel-Cox de les corbes de supervivència per veure el paper d’ENT1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$, ns: no significatiu.

	♂ i ♀	♂	♀
Ent1 WT Tk2 KO vs. Ent1 KO Tk2 KO No Tractats	0,008 (*)	0,2152 (ns)	0,0014 (**)
Ent1 WT Tk2 KO vs. Ent1 KO Tk2 KO dCtd + dThd	<0,0001 (****)	0,0025 (**)	<0,0001 (****)
Ent1 WT Tk2 KO No tractats vs. Ent1 WT Tk2 KO dCtd + dThd	<0,0001 (****)	0,0051 (*)	<0,0001 (****)
Ent1 KO Tk2 KO No tractats vs. Ent1 KO Tk2 KO dCtd + dThd	<0,0001 (****)	0,0018 (**)	<0,0001 (****)

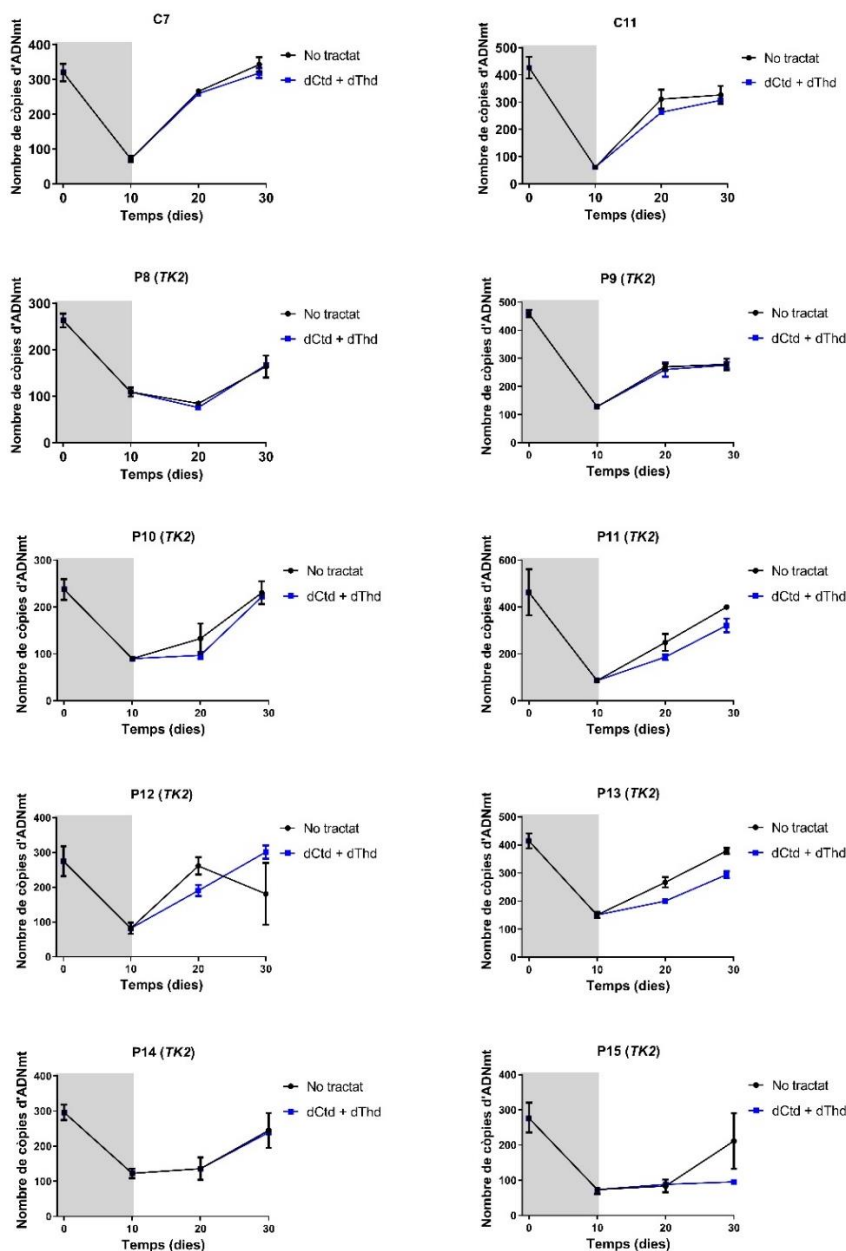


Figura Suplementària 21. Nombre de còpies d'ADNmt per cèl·lula al llarg del temps en fibroblasts de controls sans i de pacients amb mutacions en TK2 utilitzant el model de depleció de l'ADNmt induïda amb BrEt. La línia representa el nombre de còpies d'ADNmt en els fibroblasts de controls sans (C7 i C11) i en fibroblasts de pacients amb mutacions en TK2 (P8 – P15) exposades a BrEt durant 10 dies per induir la depleció de l'ADNmt (regió marcada en gris) i la quantitat d'ADNmt en absència (en negre) o presència (en blau) del tractament amb dCtd i dThd a concentració de 50 μ M cada un. Els valors són la mitjana i el rang de les dues rèpliques del mateix experiment.