

Estudis experimentals sobre els efectes fisiopatològics de la depleció del DNA mitocondrial

Joan Villarroya i Terrade

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Estudis experimentals sobre els efectes fisiopatològics de la depleció del DNA mitocondrial

Joan Villarroya i Terrade, 2010

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Programa de doctorat de Biomedicina
Bienni 2005-2007

Estudis experimentals sobre els efectes fisiopatològics de la depleció del DNA mitocondrial

Memòria presentada per

Joan Villarroya i Terrade

Per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau dels directors

Dr. Francesc Villarroya i Gombau

Dra. Maya Vilà i Iglesias

Són molts ja els anys que porto vinculat al món de la recerca i, per tant, moltes persones que d'alguna manera o altra s'han creuat al meu camí i que d'alguna manera o altra hauran contribuït o afectat a la meua vida científica.

En primer lloc m'agradaria fer una especial menció als meus codirectors i mentors, la Maya i el Francesc. Maya, merci per haver-me ensenyat a desenvolupar-me independentment en un laboratori amb la teua especial capacitat de combinar rigor experimental amb bon rotllo i bones maneres. Tots dos sabem que no cal ser un dèspota per imprimir bones i mínimament disciplinades maneres a l'hora de treballar en una poiana. Quan em va caure el teu projecte de mitocòndria a les mans, me'l vaig aprendre de pe a pa, i de fet, els dos anys i pico que vam estar treballant-hi, no em preguntis com, però em van donar un coneixement del metabolisme dels nucleòtids en relació al DNA mitocondrial molt consistent que m'ha servit com a punt de partida del meu coneixement científic especialitzat. Així doncs, reitero el meu agraïment per la confiança dipositada en mi, les oportunitats que m'has donat i, no menys important, per la gran amistat i qualitat humana que sempre m'has demostrat. Respecte el meu altre director i que ha portat la càrrega intel·lectual de la segona part de d'aquesta tesi, bé, ens uneix una relació no precisament distant. Suposo que en certa mesura m'he dedicat a la ciència experimental perquè molts conceptes, idees i sobretot el morbo per la biologia se'm va despertar ben jovenet a la Floresta. L'entusiasme vocacional de mon pare per aquest ofici es obvi per a tothom qui el coneix, així doncs no és d'estranyar que converses sobre dinosaures, el univers i les seves fronteres i coses per l'estil fos quelcom no poc habitual quan jo era un nen. Bé, doncs aquesta emoció per la ciència va ser transmesa, i en cap cas imposada, i ha esdevingut, després, amb el temps i també la confiança mútua, en el que ara és també el meu ofici. Moltes gràcies, sobretot per la paciència!

Si faig un recorregut mental sobre el meu desenvolupament en el pensament científic, m'hauria de remuntat molt en darrera, i potser no caldria tan. Així doncs, el cas és que em vaig matricular a la facultat de Biologia de l'Autònoma, i allà vaig fer un grapat de grans amics que, de la mateixa manera que jo, ens apassionava la biologia molecular, la fisiologia i especialment la neurobiologia, tot i que la nostra manera de manifestar-ho potser no era gaire acadèmica. Què voleu? Teníem 18 anys! Així, l'Alex, la Sabina, el Gerard, la Judith, el Miquel, etc. passàvem hores al bar de ciències prenent cafès amb llet acompanyats de cigarrets i "cigarrets" jugant a cartes i també, sovint, discutint sobre ciència. Sí, sí, de tant en tant anàvem a classe, i potser sí que podríem haver aprofitat més el temps, però no me'n penedeixo gens ni mica del que es va generar allà, combinació de gran amistat i gran interès per la biologia experimental. Concretant més,

Alex!! Ets un grande!! Merci per tot, tu n'has fet algo de la biologia i t'estàs, poc a poc convertint en un tio important a la teva empresa i lo més important, t'agrada. Bé, que t'he de dir, no ens queda molt de veïns, sembla... Sabi!! Tu sí que arribaràs lluny, amb l'ambició que tens. Ves venint a visitar-nos des de Viena, que s'agraeix, i molta sort amb la tesi. Judith!! que ya terminas coño tu también, venga, que esto ya está hecho. Se que no ha sido precisamente un camino de rosas, pero seguro que acaba bien, jeje. Aquí, m'agradaria fer una menció especial al Gerard, que va fer els seus pinitos en el mon de la neurofisiologia però no li va sentar gens bé experimentar amb les rates, pobretes. Res, Gerard, que ens en recordem molt de tu, tenies molta força, passaves desapercebut i sobretot, eres un amic de puta mare. Se't troba a faltar.

Al 2005 vaig anar a parar a la planta 14 de l'edifici materno-infantil de la Vall d'Hebron, on vaig començar la tesi oficialment amb la Maya en el projecte de TK2. Van ser uns anys de puta mare on vaig conèixer molta gent i també vaig fer grans amistats. Marta, ja ets tota una marassa, jeje, ja apuntaves maneres. Molta sort per Girona. Neus, Guillermo, tenim pendants unes birres, com sempre! Thaïs, ja deus veure la llum al final del túnel. Sento el incident amb les mostres dels -20. Joan, segueix tan de puta mare com sempre però et perdís en els mars de taques dels 2D. Anna, gràcies pel tracte, per acollir-me al teu grup i donar-me sortides quan tenia alguns problemilles. També tinc bons records de molta gent del IRB, Valentí, com va per los madriles? En Pep, que és un biòleg-músic com jo, una espècie en perill d'extinció, en Tomàs i les nostres discussions interessants sobre actualitat cinematogràfica, la Lide, que la vaig retrobar al Institut de Recerca i ara nos vemos muy a menudo, no?? Bé, i molta més gent del centre, com per exemple tothom del grup de patologia mitocondrial, la M^aCarmen, la Gisela, en Tòfol, el Ramon, el Toni, l'Elena, el Marc, el Javi, el Ramiro, gent tots ells que m'ha acollit de forma fantàstica en múltiples col·laboracions científiques al llarg de molts anys.

També m'agradaria fer menció especial a un seguit de gent, especial per mi, que m'ha acollit amb els braços oberts en els meu no poc habituals desplaçaments a NY. Àlex, tens el privilegi de ser segurament la única persona no vinculada al món científic de qui vull parlar perquè indirectament has intervingut a que es pogués realitzar aquesta tesi. Moltes gràcies per l'acolliment i la companyia a Park Slope. Crec que tornaré en breu, com ho tenim? Jeje. També m'he sentit molt a gust amb tota la gent del grup de l'Hirano. Thanks for everything Michio. Vull fer menció als meus mentors quan he viatjat sol, com són principalment la Bea, l'Isern i la Estela, que han fet que pogués viure una mica Manhattan com si visqués allà i m'ha ofert casa seva mostrant una confiança fora de lo

habitual. Bea i Estela, creo que nos veremos pronto, y ya nos pondremos al día. Joan, quan torni pels USA et truco fijo. Al final he aconseguit muntar la meva banda!

Bé, finalment vull parlar una mica del TAM, que és indissociable de mi com a investigador. Ja fa molts anys, als estius em deixava caure pel lab, i feia els meus primers pinitos en una poiata. Va ser aquesta època quan vaig conèixer a vella gent del grup. La Pilar em va ensenyar a treballar amb DNA, la Marisa a fer els primers westerns, la Ela una infinitat de coses que no puc ni recordar. També hi havia la Neus, la Yoli, que ja ha tornat de Suècia, el Laurent, i després la Carine, l'Emmanuel, l'Alberto. Després de la meva estada a la Vall d'Hebron vaig acabar tornant al TAM on em vaig trobar amb vells amics de l'etapa anterior, com l'Ela, l'Albert, el Ramon, la Txell, el Guallar, l'Armengol i gent amb qui no em va costar connectar, l'Aleix, el Josemi, la Julie i al cap de poc l'Anna, l'Isis, el Francesc i el Rubén. Ramon!! Ja ets a NY, espero que trobis el teu lloc allà, segur que sí. A disfrutar! Txeell!!! L'altre desplaçada, tu a London, ni més ni menys. Bueno, ja ens hem vist per allà i suposo que en breu ens trobem al PS. Guallar, vigila amb les teves curses rollo D. Meca, que les aigües estan molt infestades de merda, jeje. Armengol, no deixis que la Maya es posi molt mandona...Passant a la gent que tinc més a mà ara mateix, Ela, t'escric en català perquè si no em renyen! Em falten les paraules per dir-te com valoro la teva qualitat humana i científica, realment és embriagadora. Mil gràcies per tot aquest temps, hi ha poca gent amb tanta paciència com tu. Julie, sigue poniendo un poco de orden que así compensas el caos que a veces se genera. Albert, merci per l'amistat, ja se que l'amistat no s'agraeix, però no se com es diu aleshores. Tot i que em queixi molt sobre els mongolos en realitat he de reconèixer que m'agraden una mica, jeje. Per SIRT o per desgràcia veure't cada dia m'actualitza musicalment a un ritme que a vegades no puc ni tolerar. Ja estàs terminal, suposo que seràs el pròxim, ànims. Aleix, el gegant del TAM que es baralla amb els ANTs. Ets un tio de puta mare, molt col·laborador, i excel·lent fiestero quan t'hi poses. Merci per l'ajut editant aquest document, per posar un exemple i sort amb el que et queda de tesi, espero ser per aquí encara. Josemi, gracias por darle una dimensión bien curiosa la dinámica de un laboratorio, y, como tu siempre reivindicas, por no esconder nunca lo que piensas. Isis, sort que algú ha arribat al lab per posar ordre, el que no sabíem és que també hi afegiria aquesta rialla constant. Això ja és de collita pròpia. Anna, la meva companya de cigarrets i ànima bessona pel què fa a els matins grisos. És encoratjador saber que no estic sòl. Francesc i Rubén, mola molt veure com s'incorpora gent i poc a poc es van fent el seu lloc al TAM, tots hi hem passat. Per acabar no em vull oblidar dels sèniors del TAM, la Teresa, l'Octavi, la Roser, sempre molt

col·laboradors en tot, i especialment la Marta amb qui hem treballat més conjuntament i que ens coneixem de ja fa molt de temps.

Amb tota la gent del TAM, aquests últims temps, hem fet moltes rises i el cert és que, en aquest sentit, no ha resultat complicat anar a treballar cada dia. Bé, llevar-se i les primeres hores del matí sí, ja em coneixeu...

Ara sí, per acabar de veritat, m'agradaria disculpar-me per no esmentar a tota aquella gent que no està vinculada a la recerca, com ma mare, que un dia em va parir, família, amics, amigues, més que amigues, coneguts, i en definitiva, tot l'entorn social que m'ha acompanyat durant aquests anys de desenvolupament personal i professional i qui, indirectament han contribuït a que tingués unes condicions, experiències, emocions, etc. compatibles amb desenvolupar aquest treball.

En serio, moltíssimes gràcies a tots.

Contingut

La present Tesi doctoral s'estructura segons la normativa vigent pel què fa al format de tesi per "compendi de publicacions" establert per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, i per tant consta de la següent estructura:

1. Introducció general

- a. Revisió: Mitochondrial DNA, an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology

2. Objectius

3. Informe dels codirectors de Tesi sobre els articles publicats

4. Resum i discussió global

5. Conclusions

6. Bibliografia

7. Resultats i publicacions:

- a. Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency
- b. Altered gene transcription profiles in fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations indicate compensatory mechanisms
- c. An *in vitro* model of mitochondrial DNA depletion by down-regulation of thymidine kinase 2 expression
- d. Effects of thymidine kinase 2 loss-of-function and mitochondrial DNA depletion on brown adipose tissue development in mice
- e. HIV-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: towards a rodent model of HIV-1 lipodystrophy
- f. *In vivo* effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrially driven apoptosis

8. Apèndix:

- a. Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression

- b. HIV-1-infected long-term non-progressors have milder mitochondrial impairment and lower mitochondrially-driven apoptosis in peripheral blood mononuclear cells than typical progressors

Introducció general

Introducció general

1. Biologia de la mitocondria

1.1. Producció d'energia. El sistema de la fosforilació oxidativa (OXPHOS)

El principal lloc de producció d'energia química en forma útil per a processos metabòlics (síntesi d'ATP) a la cèl·lula de mamífer, i en condicions aeròbiques, és la mitocondria. Aquests orgànuls subcel·lulars estan especialitzats en la conversió d'energia química procedent de l'oxidació de substrats en energia química en forma d'enllaç fosfat, i per dur a terme aquest procés utilitzen un complex sistema enzimàtic configurat per la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Aquest sistema consta de cinc complexos multienzimàtics localitzats a la membrana mitocondrial interna (MIM) i organitzats segons el seu potencial redox, un lípid (coenzim Q), i una proteïna soluble (citocrom c) (Figura 1): complex I, també anomenat NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH-dehidrogenasa; complex II o succinat-deshidrogenasa; complex III, ubiquinona-citocrom c oxidoreductasa; complex IV o citocrom oxidasa; complex V, també conegut com F_0F_1 -ATP sintasa (ATPasa).

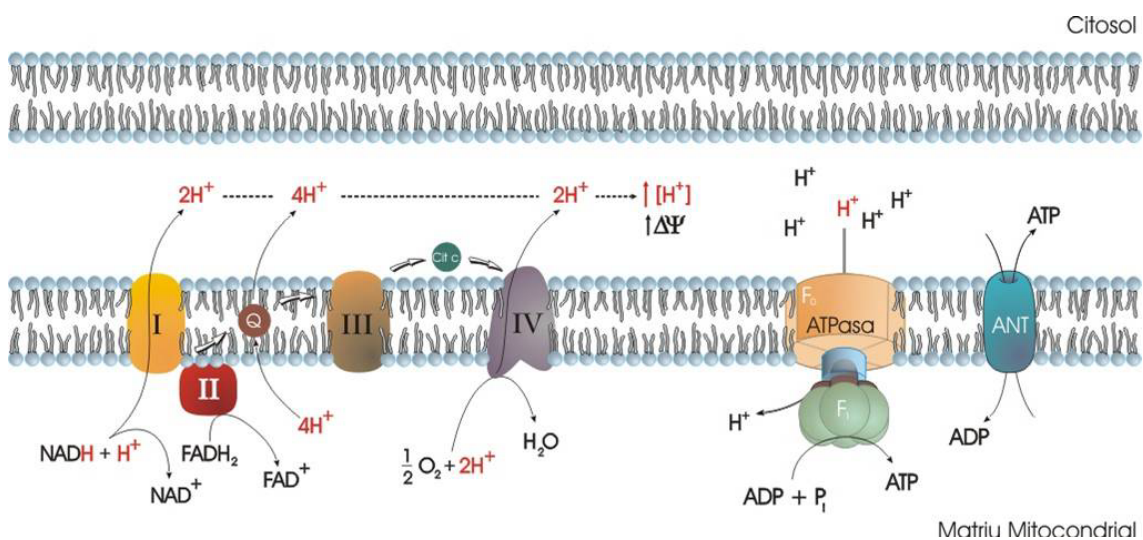


Figura 1. Esquema representatiu dels complexos proteics que configuren el sistema OXPHOS i d'altres proteïnes associades. *Extret de la tesi doctoral del Dr. Jordi Armengol i Mansilla.*

Durant la respiració, els electrons cedits a la cadena respiratòria per molècules reductores derivades del metabolisme oxidatiu (NAD(P)H i FADH₂) són transferits d'un complex al següent, amb potencial redox inferior. El complex I catalitza la transferència d'electrons des del NADH, derivat principalment de l'oxidació de glúcids i lípids, cap al coenzim Q (o ubiquinona). Aquest flux d'electrons desencadena un bombeig de protons cap a l'espai intermembrana de la mitocòndria. El coenzim Q és també l'acceptor d'electrons que provenen de l'oxidació del succinat en el cicle dels àcids tricarboxílics, i que li són cedits pel complex II. En aquest cas, però, no es genera cap flux de protons com succeïa anteriorment. El coenzim Q reduït cedeix els electrons al complex III, i aquest els cedeix al citocrom c, generant altre vegada un flux de protons en direcció a l'espai intermembrana. La tercera bomba de protons es el complex IV que oxida el citocrom c i cedeix els electrons a l'O₂ per donar H₂O (1).

Així, la matriu mitocondrial es va basificant mentre que l'espai intermembrana i l'espai extramitocondrial s'acidifiquen. Degut a la impermeabilitat de la MIM, es crea una diferència de potencial electroquímic de protons, també anomenada força protomotriu ($\Delta\mu\text{H}^+$) que és emprada pel complex V o ATP sintasa en un procés anomenat fosforilació oxidativa (2). Aquest complex acobla la difusió facilitada dels H⁺ a través de la MIM (domini transmembrana o F₀) a la síntesi d'ATP (domini hidrosoluble o F₁). Aquest fenomen, anomenat acoblament de la fosforilació oxidativa amb l'oxidació de substrats, garanteix la coordinació entre les necessitats energètiques del sistema i el consum d'aquests.

A més a més de sintetitzar ATP, les mitocòndries realitzen altres funcions per les quals és indispensable un flux metabòlic o un intercanvi de metabòlits entre el citosol i la matriu mitocondrial (cicle dels àcids tricarboxílics, β -oxidació dels àcids grassos, entre d'altres). La MIM és una barrera impermeable per a la majoria d'aquests metabòlits, així que el flux es manté gràcies a la presència de diversos transportadors, com són el transportador de P_i, o el translocador de nucleòtids d'adenina (ANT), que juntament amb els components de la cadena respiratòria constitueixen el sistema OXPHOS (3).

Igualment, les UCPs (proteïnes desacobladores) poden ser incloses com a part del sistema OXPHOS, ja que són responsables del desacoblament d'aquest amb l'objectiu de

generar calor com a resposta a determinades situacions fisiològiques, o bé amb altres finalitats.

1.2. La funció mitocondrial. Els gens OXPHOS

La funció mitocondrial en les cèl·lules de mamífer consta d'una característica única respecte altres funcions: la participació d'un sistema genètic diferent que codifica per proteïnes mitocondrials, l'anomenat genoma mitocondrial o DNA mitocondrial. L'expressió coordinada dels gens del mtDNA i del genoma nuclear és essencial per a la correcta síntesi d'un sistema OXPHOS funcional. La immensa majoria de proteïnes del sistema OXPHOS corresponen a gens nuclears i únicament tretze de les proteïnes del sistema estan codificades pel DNA mitocondrial. Independentment de les implicacions derivades de la diferent ubicació subcel·lular dels dos genomes, cal esmentar que es tracta de dos sistemes d'organització genètica molt diferents, cadascun amb una disposició particular dels gens i amb sistemes de transcripció i traducció independents (4).

Els gens OXPHOS presents en el DNA nuclear presenten aquelles característiques típiques dels gens transcrits per la RNA polimerasa II, amb els introns i exons en nombre i distribució particular de cada gen. Un bon nombre han estat clonats i caracteritzats amb detall, inclosa la regió promotora, que presenta una gran variabilitat entre els diferents gens, fet que fa pensar en diferències importants pel què fa a la seva regulació. Dins d'aquest grup de gens hi podem trobar, per exemple, algunes subunitats de la citocrom oxidasa (IV, Vb i VIc), el citocrom c del complex III, les subunitats α , β i γ del complex V, les tres isoformes de la translocasa ATP/ADP (ANT1, 2 i 3) o els gens de la família UCP.

El DNA mitocondrial és un sistema genètic amb unes característiques molt diferents del DNA nuclear. Consta d'un nombre variable de còpies de DNA circular (entre 10^3 i 10^4 per cèl·lula) transmeses de generació en generació, en mamífers, per herència materna. El mtDNA és replicat independentment del DNA nuclear, però els components enzimàtics necessaris per a dur a terme la replicació, així com la transcripció i la traducció dels gens que codifica, són d'origen nuclear (veure capítol 2) (4-6).

1.3. Regulació de la biogènesi mitocondrial

1.3.1. Introducció

La biogènesi mitocondrial en mamífers està subjecte a un estricte control fisiològic. Per exemple, un augment de la massa mitocondrial és potenciada en el múscul d'adults en resposta a l'exercici (7), presumiblement com a adaptació a facilitar una major capacitat d'utilitzar l'augment d'oxigen que es produeix. La senyalització depenent de calci també ha estat associada a una via transcripcional de la biogènesi mitocondrial en múscul esquelètic (8-9). La proliferació mitocondrial es dona també en el teixit adipós de rosegadors durant la termogènesi adaptativa, coincidint amb la inducció i activació d'UCP-1, la proteïna desacoblant que dissipa el gradient de protons per a produir calor com a resposta a l'exposició al fred (10-11). Durant les primeres fases del desenvolupament del ratolí, el contingut de mtDNA roman constant des de la fertilització fins a la fase de blastocist, després de la qual la replicació del DNA i la divisió d'òrgànuls torna a començar (12). Una proliferació mitocondrial subsequënt va augmentant progressivament durant el desenvolupament, i es creu que existeixen factors específics de teixit que acabaran per determinar l'equipament mitocondrial, sobretot pel què fa a mtDNA, corresponent a cada teixit en l'organisme adult (13).

Aquests exemples posen de manifest la importància de la biologia dels mecanismes reguladors que coordinen la correcta resposta cel·lular a les diferents demandes energètiques dels teixits.

1.3.2. Factors implicats en la biogènesi mitocondrial

1.3.2.1. Factors de transcripció nuclears

NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) és un factor nuclear que indueix la transcripció de gens nuclears que participen de la funció respiratòria mitocondrial (14). Aquests gens, que comprenen un grup extens on hi trobem la immensa majoria de gens nuclears que codifiquen per subunitats dels cinc complexos de la cadena respiratòria, presenten elements de resposta a NRF-1 en els seus respectius promotors. NRF-1 també coordina l'expressió de gens que formen part de la maquinària de transcripció del mtDNA, com ara TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), TFB1M (*mitochondrial transcription factor B1*) i TFB2M (*mitochondrial transcription factor B2*) (15-16). A més a més de regular l'expressió

de gens implicats en l'activitat respiratòria i l'expressió del genoma mitocondrial NRF-1 també regula l'expressió de factors implicats en el import de proteïnes a dins la mitocòndria, com es el cas de TOMM20, una subunitat receptora clau del complex TOMM involucrada en la interacció inicial de proteïnes precursors dirigides a la mitocòndria. S'ha associat una elevada presència del mRNA de NRF-1 o de la seva capacitat per a unir-se al DNA amb un augment de la biogènesi mitocondrial i en determinades situacions fisiològiques de demanda energètica. Per altra banda, també cal esmentar que en situacions d'estrès oxidatiu, NRF-1, NRF-2 (veure al capítol següent) i TFAM són sobreexpressats com a resposta de l'organisme. Finalment, els gens diana de NRF-1 no només són gens implicats en la funció mitocondrial directament. Entre aquests, podem trobar gens que codifiquen per enzims del metabolisme, components de vies de senyalització, factors implicats en el manteniment dels cromosomes i del metabolisme dels àcids nucleics, entre d'altres.

NRF-2 (GABP) activa la transcripció de COIV (subunitat IV de la citocrom oxidasa) i COXVb, suggerint que NRF-2 es un regulador general de les subunitats de la citocrom oxidasa (17). A més a més, també s'han trobat llocs d'unió als promotors d'altres gens involucrats en l'expressió de components de la cadena respiratòria (14), com ara TFAM, TFB1M, TFB2M. Tres dels 4 gens humans que codifiquen per subunitats de la succinat deshidrogenasa (complex II) presenten també els elements de resposta de NRF-1 i NRF-2 en els seus promotors. En molts casos, els llocs d'unió a NRF-1 són també presents en promotors dependents de NRF-2, però no és una norma general ja que, per exemple, varis promotors de subunitats de la citocrom oxidasa i els promotors de TFAM i TFBMs en rosegadors no presenten llocs d'unió consens obvis per a NRF-1, al contrari que en humans, on la presència de tots dos factors en aquests promotors és necessària per a la seva activitat.

ERR α (*estrogen-related receptor α*) és un receptor de la família dels receptors nuclears orfes i ha estat vinculat amb la regulació del metabolisme oxidatiu. L'abundància d'ERR α en teixits oxidatius com el ronyó, el cor i el teixit adipós marró és elevada, ja que actua com a regulador de la β -oxidació dels àcids grassos controlant l'activitat del promotor de la acil CoA deshidrogenasa de cadena mitjana (MCAD) (18). Estudis recents han implicat també ERR α en la biogènesi mitocondrial induïda per PGC-1 α (*PPAR γ coactivator-1 α*) (19-20) i també és important remarcar que aquest factor podria estar

jugant un paper important coordinant l'expressió de la via respiratòria i la via d'oxidació d'àcids grassos.

S'han descrit altres factors nuclears, que s'ha observat que també estarien activant promotors de gens relacionats amb la biogènesi mitocondrial. Un d'ells és CREB, que s'uneix en *cis* al promotor del citocrom c, és fosforilat a l'hora que NRF-1 i sembla que intervindria en la inducció ràpida de l'expressió del gen, en resposta al creixement cel·lular induït per sèrum (21). L'activitat màxima del promotor del citocrom c també depèn d'una sinèrgia entre els llocs de reconeixement del factor de transcripció general Sp1 (22).

1.3.2.2. Coactivadors i correpressors nuclears

PGC-1 α és un coactivador transcripcional que en associació amb PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) s'uneix a varis receptors d'hormones nuclears i *trans*-activa l'expressió de UCP-1 dependent de PPAR γ i la hormona tiroidea β en el teixit adipós marró. L'augment exacerbat del mRNA de PGC-1 α en el teixit adipós marró en situació d'exposició al fred confirma la importància d'aquest factor en el procés termogènic (23-24). Una part important del programa termogènic recau en la inducció de la biogènesi mitocondrial, i PGC-1 α és un potent activador d'aquest procés. NRF-1 ha estat identificat com una diana important de PGC-1 α en la inducció de la biogènesi mitocondrial i a l'hora, aquest factor podria estar connectant els processos de regulació al nucli amb la maquinària transcripcional mitocondrial, a través de l'activació transcripcional de l'expressió de TFAM, TFB1M i TFB2M (15).

ERR α també ha estat associat amb la biogènesi mitocondrial induïda per PGC-1 α . De fet, els llocs de reconeixement d'ERR α i GABP α (NRF-2 α) estan conservats en els promotors d'un bon nombre de gens de la fosforilació oxidativa, inclosos els del citocrom c i el de la β -ATP sintasa, i PGC-1 α és capaç de promoure'n l'expressió a través d'aquests llocs d'unió (19-20).

PGC-1 β presenta una expressió basal equiparable a la de PGC-1 α , amb els nivells més elevats al teixit adipós marró, cor i múscul esquelètic, teixits tots ells amb un contingut mitocondrial elevat i una elevada capacitat oxidativa. Principalment difereixen

però en que PGC-1 β no s'indueix al teixit adipós marró en resposta al fred, i tampoc és capaç d'induir l'expressió de gens gluconeogènics al fetge, mentre que PGC-1 α sí (25). Malgrat les diferències que presenten, PGC-1 β és també un potent activador de la biogènesi mitocondrial unint-se a NRF-1 i activant gens mitocondriogènics diana d'aquest (26).

RIP140 és un corepressor dependent de lligand de molts receptors nuclears que intervé en diferents processos relacionats amb la homeostasi energètica en el múscul esquelètic, l'adipòcit, l'hepatòcit i en la reproducció. En absència de RIP140, els gens que regulen processos tals com la biogènesi i la funció mitocondrials, la β -oxidació d'àcids grassos, el consum d'oxigen, la termogènesi i la captació de glucosa dependent d'insulina, es troben sobreexpressats en el teixit adipós. RIP140 comparteix molts gens diana amb els coactivadors PGC-1 α i PGC-1 β , jugant un paper antagònic a l'hora d'activar-ne o reprimir-ne l'expressió i regulant així un conjunt de processos metabòlics (27).

1.4. Apoptosi dependent de mitocòndria. Via intracel·lular de senyalització

Juntament amb els processos propis del sistema OXPHOS i el metabolisme energètic, les funcions biològiques de la mitocòndria impliquen també l'apoptosi. La maquinària intracel·lular responsable de l'apoptosi és similar a totes les cèl·lules animals. Depèn d'una família de proteases, les caspases, que contenen una cisteïna en el seu lloc actiu i que escindeixen les seves proteïnes diana sobre residus específics d'àcid aspàrtic. Les caspases es sintetitzen a la cèl·lula com a precursors inactius o procaspases, les quals són activades generalment per escissió del polièptid després d'un residu d'àcid aspàrtic per part d'altres caspases. Un cop activades, aquestes processen altres procaspases, generant així una cascada proteolítica amplificadora.

L'activació de la via intracel·lular de l'apoptosi es desencadena generalment a través d'un mecanisme del tipus del tot o res. La cascada de proteases no només és destructiva i autoamplificant si no també irreversible, de manera que quan la cèl·lula ha arribat a un punt crític de la via de destrucció ja no pot tornar enrere.

La hipòtesi més acceptada per a l'activació de les procaspases és que aquesta es produeix a través de les proteïnes adaptadores que mantenen varies còpies de determinades procaspases, denominades procaspases iniciadores, en contacte molt proper, formant un complex o agregat. Quan la cèl·lula es troba danyada o estressada pot activar el programa de mort cel·lular i així autoeliminar-se induint la agregació i activació de les procaspases des de l'interior de la cèl·lula. Quan arriba l'estímul apoptòtic, Bcl-2 i Bax promouen l'alliberació del citocrom c fora la mitocòndria mitjançant algun mecanisme que encara es desconeix. Aquest s'uneix a la proteïna citoplasmàtica Apaf-1 oligomeritzant-la i constituint així l'apoptosoma, que reclutarà i activarà la procaspasa-9 per proteolització en *trans*. La caspasa-9 activa processarà les procaspases-3,6 i 7 (la caspasa-3 activa és l'executora). Aquesta via mitocondrial d'activació de procaspases està activa en la majoria de les formes d'apoptosi, bé iniciant, accelerant o amplificant la cascada de caspases. Per exemple, el dany en el DNA pot desencadenar apoptosi, i aquesta resposta és depenent de p53, la qual pot activar la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes que estimulen l'alliberació del citocrom c de les mitocòndries a l'espai citosòlic.

En aquest mecanisme hi juguen un paper important també factors antiapoptòtics, com és el cas de la proteïna Bcl-2 i d'altres proteïnes de la mateixa família. Aquesta família de proteïnes inclou factors proapoptòtics i antiapoptòtics. Quan la cèl·lula rep l'estímul d'estrès, factors proapoptòtics de la família Bcl-2 (Bax, Bak) són els efectors de la despolarització de la membrana externa mitocondrial, que permet l'alliberació de proteïnes de l'espai intermembrana al citosol, entre elles el citocrom c, que interaccionant amb Apaf iniciarà la cascada proteolítica de caspases. Bcl-2, que fou la primera descrita de la família, junt amb d'altres elements (Bcl-xL, Mcl-1, i d'altres) actua a la inversa, inhibint aquest procés. Fins el moment, s'ha pensat que es determinava l'entrada a apoptosi en funció del balanç entre proteïnes pro i antiapoptòtiques, però més recentment s'ha posat de manifest la intervenció d'un altre grup de proteïnes de la família Bcl-2, anomenades *BH3-only* (només comparteixen homologia amb la regió BH3 respecte la resta de la família). Algunes proteïnes *BH3-only* (Bid, Bim) actuen com a inhibidors d'algunes proteïnes antiapoptòtiques de la família, i per tant estarien activant l'apoptosi. En qualsevol cas, no està clar fins a quin punt aquests factors són determinants per a l'activació del procés, o quin paper juga, a nivell d'interacció entre elles, tota la xarxa de proteïnes d'aquesta família (28).

2. El DNA mitocondrial

2.1. Estructura i organització genòmica

El DNA mitocondrial (mtDNA) va ser seqüenciat l'any 1981 i està constituït, en mamífers, per una doble cadena de DNA circular, d'aproximadament 16.6 Kb. Les dues cadenes es diferencien en funció del seu contingut de G+T, podent distingir així la cadena pesada H (*heavy*) i la cadena lleugera L (*light*). La majoria de la informació genètica està codificada per la cadena pesada H (12 polipèptids, 14 tRNAs i els dos rRNAs) (Figura 2). La cadena lleugera L codifica per un sol polipèptid i 8 tRNAs. Els tretze polipèptids codificats pel mtDNA formen part dels complexos multiproteics del sistema OXPHOS, excepte el complex II que està íntegrament codificat pel DNA nuclear (1, 6).

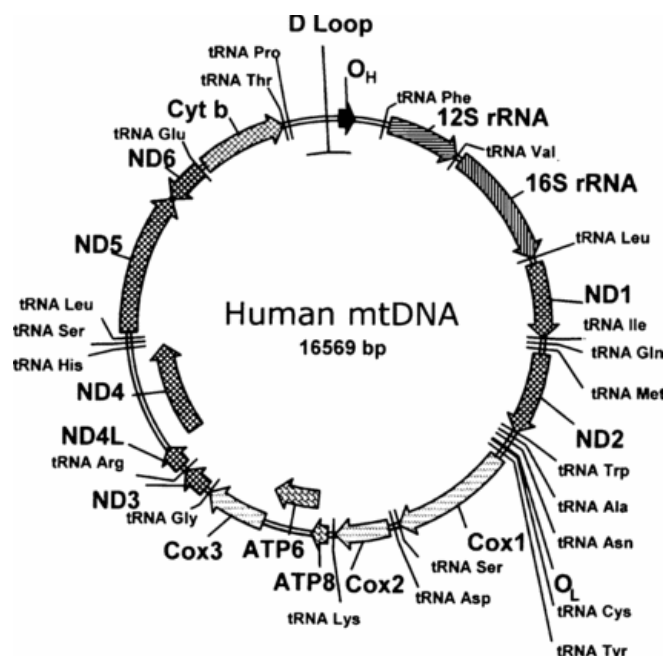


Figura 2. Representació esquemàtica de la doble cadena del DNA mitocondrial humà, on hi ha especificades les posicions de cada gen, junt amb els orígens de replicació de les cadenes pesada (OH) i lleugera (OL). Alexeyev et al. *Clinical Science*. 2004.

L'organització genòmica del mtDNA és molt compacta ja que està altament especialitzada en economitzar l'espai. Els gens no presenten introns i tant els tRNAs com els rRNAs són inusualment petits. Alguns dels gens es solapen i en alguns casos no existeixen codons de finalització de la traducció, determinant-se aquesta a nivell postranscripcional (6). Existeix una petita regió no codificant, coneguda com el *D-loop*

(*displacement loop*), que presenta una estructura peculiar: es tracta d'una triple cadena de DNA formada per les dues cadenes de mtDNA més un petit segment de DNA complementari a la cadena H i que desplaça la cadena L. Aquest segment curt de DNA apareix al iniciar-se la replicació de la cadena H i aturar-se poc després, però l'estructura es manté un temps. Aquesta regió conté els orígens de transcripció d'ambdues cadenes (HSP i LSP), així com l'origen de replicació de la cadena pesada (O_H) i podria considerar-se la regió promotora de la transcripció, ja que en ella s'ha identificat un seguit de seqüències que semblen estar involucrades en aquest procés (6).

2.2. Transcripció dels gens mitocondrials

Les peculiars característiques d'organització i estructura del mtDNA a mamífers condiciona també la forma d'expressar-se d'aquests. Les dues cadenes del mtDNA es transcriuen senceres i de forma simètrica, generant un seguit de productes: els dos rRNAs (12S i 16S) més un rRNA precursor que conté ambdós rRNAs, els 22 tRNAs i 18 RNAs poliadenilats (29). La majoria de RNAs madurs poliadenilats corresponen a un sol gen, menys dos d'ells, concretament el mRNA de les subunitats ND4 i ND4L, i el de les subunitats ATPasa 6 i ATPasa 8 estan configurats per dues pautes de lectura solapades. Els tres RNAs més llargs (RNAs 1, 2 i 3) junt amb el més curt (RNA 18) i vuit tRNAs són els productes de la transcripció de la cadena lleugera L, tota la resta es transcriuen a partir de la pesada H (30).

Els tRNAs mitocondrials juguen un paper molt important en el processament del mRNAs policistrònics per a poder obtenir els mRNAs madurs. Aquests mRNAs comencen directament en el codó de iniciació o a vegades presenten una regió terminal 5' no codificant extremadament curta (1-3 nucleòtids) i una cua poly(A) d'uns 55 residus immediatament després del codó de finalització de la traducció. Així doncs, presenten una estructura força diferent de les característiques clàssiques del mRNA citosòlics com ara les regions 5' i 3' no codificants, les senyals de poliadenilació en 3', o l'estructura "cap" en 5' (31).

Els factors de transcripció mitocondrials

La transcripció del mtDNA requereix de quatre factors bàsics, una RNA polimerasa específica de la mitocòndria (mtRNAPol) (32), tres factors de transcripció que són TFAM

(33) combinat amb TFB1M o TFB2M, alternativament, per a la iniciació (34-35), i mTERF per a la finalització de la transcripció. En absència de factors de transcripció la mtRNApol és incapaç de reconèixer els promotors mitocondrials i així només presenta una mica d'activitat no específica (36).

TFAM va ser el primer factor de transcripció mitocondrial descrit en mamífers, i es coneix que confereix activitat catalítica *in vitro* a la mtRNApol. Pertany a la família de proteïnes HMG (*high mobility group*) i, de la mateixa manera que altres proteïnes d'aquesta família, presenta la capacitat de doblegar i desenrotllar el DNA *in vitro* sense especificitat de seqüència (37). La informació obtinguda fins al moment sembla indicar que TFAM forma un complex amb el mtDNA a través dels seus dos dominis HMG, induint un canvi estructural específic a la regió del promotor que permet que la mtRNApol iniciï la transcripció (38). Tant TFB1M com TFB2M poden formar un complex heterodimèric amb la mtRNApol. Aquests dos factors tenen activitat dual, ja que a més a més de participar en la transcripció del mtDNA *in vitro* tenen activitat rRNA metiltransferasa *in vivo* (39), sent aquesta activitat no absolutament necessària per a la funció transcripcional, ja que si es provoquen canvis en alguns aminoàcids que determinen la activitat metiltransferasa de TFB1M no s'afecta la seva capacitat d'iniciar la transcripció *in vitro* (40). Experiments *in vitro* han demostrat que en mamífers TFB2M és, com a mínim, dos ordres de magnitud més actiu que TFB1M pel que fa a l'activació de la iniciació de la transcripció basal del mtDNA. Aquestes dades semblen indicar que TFB2M podria haver evolucionat per especialitzar-se com a factor de transcripció mentre que TFB1M seguiria tenint un paper rellevant en la metilació del rRNA (41) i, de fet, estudis recents han demostrat que TFB1M estaria regulant la síntesi de proteïnes a la matriu mitocondrial estabilitzant els ribosomes en el procés de traducció (42).

Encara no s'entén completament de quina manera la maquinaria de transcripció mitocondrial en mamífers reconeix les seqüències del promotor. La mtRNApol, formant un complex amb TFB1M o TFB2M, no pot iniciar la transcripció en absència de TFAM, probablement per la capacitat que té aquesta proteïna d'alterar la topologia de la doble cadena de DNA. Aquest fet fa que la distància entre el lloc d'unió específic de TFAM i la seqüència del promotor sigui crítica per a que el procés es pugui iniciar (43). També s'ha observat que existeix interacció directa entre TFAM i tant TFBM1 com TFBM2 i que aquests contactes proteïna-proteïna deuen estar contribuint a la captació del complex TFBM-mtRNApol sobre el promotor.

TFAM podria estar jugant un paper estructural d'empaquetament del mtDNA, més enllà de la seva participació en la activació transcripcional, ja que la seva abundància és del ordre d'una molècula per cada 15-20 parells de bases de mtDNA i s'ha descrit que és capaç d'embolcallar el mtDNA (44). Aquesta evidència funcional de TFAM com a proteïna estructural implicada en el manteniment del mtDNA sembla evidenciar que el reconeixement del promotor deu ser tasca específica dels factors TFB1M i TFB2M, de forma directa, o indirecta interaccionant amb TFAM .

2.3. Replicació del DNA mitocondrial

La replicació del DNA mitocondrial és realitzada per l'acció concertada de la DNA polimerasa γ , una subunitat accessòria p55, codificada pel gen *POLG2*, i factors de replicació implicats, com són les SSBPs mitocondrials (*mitochondrial single-stranded DNA binding proteins*) i la helicasa *Twinkle*. La DNA polimerasa γ és l'única DNA polimerasa present en mitocòndria de mamífer i apleix les funcions tant de replicació com de reparació del mtDNA (45). El procés de replicació està regulat i controlat pel nucli cel·lular, ja que tots els enzims implicats són codificats per gens nuclears i importats posteriorment a dins la matriu mitocondrial. La replicació i la transcripció del mtDNA estan acoblades en mamífers, ja que els transcrits iniciats al LSP (*ligh-strand promoter*) seran processats i emprats com a encebador per a la replicació del mtDNA iniciant-se en l'origen O_H (38).

L'anàlisi de intermediaris replicatius del mtDNA de mamífer ha constituït un model generalment acceptat on la replicació es donaria de forma unidireccional i independent des dels dos orígens de replicació de forma asincrònica. La síntesi comença a l'origen de la cadena pesada O_H , localitzat *downstream* del LSP a la regió del *D-loop*, i continua seguint la cadena lleugera L parental sintetitzant una cadena pesada H circular. Quan la replicació de la cadena pesada H arriba a l'origen de la cadena lleugera O_L , la cadena pesada H parental és desplaçada i el lloc d'inici per a la síntesi de la cadena lleugera L queda exposat, i així comença la seva replicació procedint en la direcció oposada i generant una cadena lleugera L nova (38).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la replicació del mtDNA requereix d'un encebador de RNA conseqüència del processament d'un transcrit originat al promotor de

la cadena lleugera L. La regió del *D-loop* (Figura 3) conté seqüències que participen en el procés de replicació, anomenades CBSs i TASs. Les seqüències CBSs (CBS I, CBS II i CBS III) estan molt conservades entre vertebrats i podrien estar actuant ajudant a que es formi correctament l'encebador de RNA per a iniciar la replicació (46). Les TASs són seqüències curtes, d'uns 15 parells de bases, també molt conservades, que estan associades amb l'aturada de la replicació als extrems 3' de les cadenes de DNA del *D-loop* (47).

Un cop la replicació de la cadena pesada H s'ha iniciat existeixen dues alternatives: (a) la síntesi de la cadena H s'atura al voltant de les seqüències TAS, generant així l'estructura del *D-loop*. Aquest procés és el que es dona més sovint. (b) Menys habitualment, la replicació continua sense aturar-se completant així la totalitat del genoma. No es coneixen els mecanismes que determinen si, en cas de que l'elongació s'aturi formant el *D-loop*, aquesta continuarà o no (48).

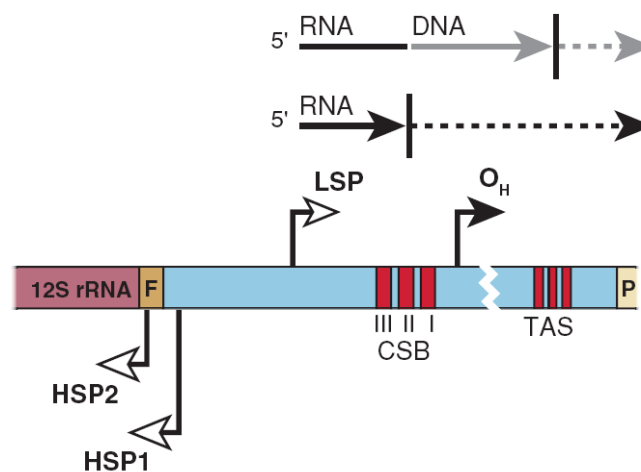


Figura 3. Representació esquemàtica de la regió reguladora D-loop. Falkenberg, M et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007.

Aquest model asimètric de replicació de les dues cadenes permet que la síntesi es dugui a terme de manera contínua. Un cop finalitza la síntesi d'ambdues cadenes, la doble cadena de nova generació se separa de la parental, els encebadors de RNA són eliminats i els corresponents espais que deixen són resolts i lligats als extrems de DNA lliures. Finalment, el mtDNA anellat adoptarà la seva estructura terciària interaccionant amb diverses proteïnes.

Recentment s'ha descrit un altre model pel que fa al mecanisme de replicació del mtDNA que coexisteix amb l'anteriorment esmentat. Aquest nou mecanisme es basa en les observacions d'intermediaris replicatius fetes emprant gels de dues dimensions, i defineix un model similar al de la forquilla de replicació del DNA nuclear, on existeix la síntesi d'una cadena líder acoblada a la síntesi de l'altra cadena de forma retardada. Aquests dos mecanismes sembla ser que podrien coexistir en determinades circumstàncies, com per exemple en cèl·lules parcialment deplecionades de mtDNA (49).

2.4. Traducció dels transcrits mitocondrials

La mitocòndria està equipada amb una maquinària pròpia de síntesi proteica dels polipèptids codificats pel mtDNA, que és independent de la maquinària citosòlica. Aquest sistema està format per 2 rRNAs i 22 tRNAs, codificats pel mtDNA, i un grup ampli de proteïnes, codificades pel nDNA i importades a la matriu mitocondrial. Aquest grup de proteïnes comprèn proteïnes ribosomals, tRNA sintetases, i els factors de iniciació, elongació i terminació de la traducció. La traducció mitocondrial és similar a la bacteriana i es coneix que els mitoribosomes són considerablement més petits que els ribosomes citosòlics. Aquests presenten un menor contingut de rRNA i consegüentment un baix coeficient de sedimentació (aproximadament 55S) (50). Aquest baix contingut de RNA està compensat per un elevat contingut proteic.

Cal esmentar que el codi genètic de la mitocòndria, que determina la correspondència entre la informació genètica i la corresponent síntesi de polipèptids, és diferent respecte el codi del genoma cel·lular (Figura 4). Així, per exemple, TGA, que és un codó stop, serà interpretat com a l'aminoàcid triptòfan dins la mitocòndria.

El mecanisme molecular de síntesi proteica que es dona a la matriu mitocondrial no es coneix completament. El inici de la traducció és considerablement diferent dels descrits a bactèria i al citoplasma eucariota, ja que els mRNAs mitocondrials no tenen estructura de cap a 5' ni regió no codificant que facilitin en el reconeixement i unió per part del ribosoma. De quina manera es dona l'acoblament mRNA-mitoribosoma és motiu d'estudi en l'actualitat.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Figura 4. Quadre del codi genètic del DNA mitocondrial, on s'especifica la correspondència entre els diferents codons i l'aminoàcid incorporat a la cadena polipeptídica.

Un bon grup de proteïnes que actuen com a factors de traducció mitocondrials en mamífers han estat identificades: els factors d'iniciació IF-2mt i IF-3mt, i els factors d'elongació EF-Gmt, EF-Tsmt i EF-Tumt. El procés de terminació de la traducció és la fase menys estudiada i només s'ha identificat un factor putatiu mitjançant anàlisi bioinformàtic, mtRF1, i recentment una altra proteïna, mtRF1a, que és capaç de finalitzar i desacoblar la traducció *in vitro* i *in vivo*. No s'ha pogut demostrar que mtRF1 sigui capaç de desacoblar el mitoribosoma del mRNA, ni identificar cap factor de reciclatge del ribosoma equivalent als existents en procarïotes i en bacteris, però s'estan realitzant estudis *in silico* comparant-n'he les seqüències (51).

En resum, s'han pogut identificar un seguit de factors implicats en la iniciació i elongació dels polipèptids mitocondrials, però altres parts del procés, com la terminació i el reassemblatge del mitoribosoma segueixen sent aspectes que requereixen de més estudi.

2.5. Característiques particulars de l'expressió del DNA mitocondrial

Contràriament a l'expressió de gens nuclears, l'expressió del mtDNA és regulada també a nivell de la replicació d'aquest, ja que la quantitat de còpies del mtDNA i per tant, també la quantitat de còpies de cada gen, és un factor fortament determinant del grau

d'expressió dels gens codificats pel mtDNA, i per tant afectarà a la funció mitocondrial. Diversos processos fisiològics adaptatius, com per exemple els efectes sobre el múscul esquelètic de l'exercitació continuada, promouen un augment de l'expressió del mtDNA a través d'un augment de la replicació del mtDNA, i per tant, un augment en la dosi gènica (52).

El mtDNA és particularment susceptible a mutacions somàtiques, a més a més de la variabilitat genètica que presenta en humans, fet que pot afectar a la capacitat d'expressar-se correctament i per tant pot afectar a la funció mitocondrial. Aquest fet sembla ser conseqüència de l'exposició del mtDNA a la producció local d'especies reactives de l'oxígen (ROS) provinents de l'activitat de la cadena respiratòria, i també de la inefectivitat dels mecanismes de reparació de danys en el DNA en el procés de replicació del mtDNA. També cal tenir en compte que la maquinària d'expressió gènica del mtDNA és diferent dels processos d'expressió típics dels gens nuclears, així doncs, és raonable pensar que els processos patogènics podrien estar alterant específicament tant la maquinària d'expressió del mtDNA com la base final de totes les alteracions en la funció mitocondrial, des d'un balanç energètic alterat fins el mal funcionament de la cadena respiratòria, donant lloc a un increment de la producció de ROS, o fins i tot a l'activació d'apoptosi per la via mitocondrial.

2.6. Implicació de la depleció del DNA mitocondrial en el sistema OXPHOS i en l'apoptosi a nivell experimental

El mtDNA codifica per 13 polipèptids que formen part de subunitats catalítiques crítiques dels complexos I, III, IV i V de la cadena respiratòria. Així doncs, les cèl·lules deplecionades de mtDNA no són capaces de mantenir el correcte funcionament de la cadena de transport d'electrons i la síntesi d'ATP, i depenen gairebé exclusivament de l'ATP que deriva de la glucòlisi anaeròbia per a desenvolupar les seves funcions. Per a poder determinar la influència de la biogènesi mitocondrial en processos de senyalització intracel·lular, més enllà de la producció d'energia, on la integritat i funció mitocondrial juguen un paper clau (apoptosi, secreció d'insulina induïda pels nivells de glucosa, etc.) es va desenvolupar un sistema experimental de cultius de cèl·lules de mamífer deplecionades total o parcialment de mtDNA per l'acció del bromur d'etidi a temps

prolongats i a dosis controlades (cèl·lules ρ^0) (53-54). El fet de que aquestes cèl·lules sobrevisquin i creixin sense fer la fosforilació oxidativa, en condicions determinades de cultiu (requereixen la presència de piruvat i uridina), ens permet estudiar quina relació existeix entre determinats mecanismes de senyalització i el potencial redox generat a la mitocòndria per acció del transport d'electrons, i si aquest es determinant per al procés.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'apoptosi és un procés fortament vinculat a la mitocòndria, ja que és necessari un canvi del potencial de membrana mitocondrial per a alliberar el citocrom c al citosol. Les cèl·lules ρ^0 no desencadenen apoptosi com a resposta a tots els estímuls que sí que la provoquen a cèl·lules *wild-type* (55), així que tenim un marc de controvèrsia on, depenent de l'estímul proapoptòtic que generi la cascada de caspases i la subseqüent mort cel·lular programada, el procés sembla ser més o menys depenent de la integritat de la cadena de transport electrònic, determinada per la quantitat de còpies de mtDNA.

Estudis amb cultius de cèl·lules humanes (*HeLa*) ρ^0 han demostrat que l'acció combinada d'alguns components de l'ATP sintasa (F_1 -ATPase) i el transportador d'ATP/ADP ANT permet el manteniment del potencial de membrana mitocondrial, independentment de l'estat de la cadena de transport electrònic. En aquest sistema, quan s'inhibeix la funció de transport que realitza ANT o bé l'activitat de F_1 -ATPase, s'atura el creixement cel·lular i es despolaritza la membrana mitocondrial, induint així la progressió de l'apoptosi (56). Per contra, aquestes cèl·lules són insensibles a inhibidors de components responsables del transport d'electrons, com la rotenona o l'antimicina (57), que sí que inicien apoptosi en cèl·lules *wild-type*. En altres sistemes, com les cèl·lules de carcinoma hepàtic SK-Hep1, quan aquestes són deplecionades de mtDNA esdevenen insensibles al *TRIAL*, un potent agent proapoptòtic de la família de $TNF\alpha$, que produeix elevada citotoxicitat per la via de les caspases en una ampla varietat de línies cel·lulars transformades (58). En la mateixa línia, s'ha demostrat que una depleció parcial del mtDNA indueix resistència a l'apoptosi produïda per l'estaurosporina en mioblasts C2C12. Les cèl·lules deplecionades de mtDNA presenten un increment en l'abundància de proteïnes proapoptòtiques (Bax, BAD i Bid) però un increment molt més determinant de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 (59).

En resum, podem concloure que la relació entre l'abundància de mtDNA i la via d'inducció de l'apoptosi és un tema controvertit, que depèn de l'estímul proapoptòtic concret i del tipus cel·lular emprat. També és important remarcar que aquest estudis han estat realitzats en sistemes de cel·lules transformades, i no en cèl·lules diferenciades i en divisió, com ara els limfòcits, on la mort cel·lular programada juga un paper rellevant i similar a la situació fisiològica en mamífer.

3. Patologies d'origen genètic associades a depleció del DNA mitocondrial

3.1. Generalitats

Les malalties mitocondrials poden ser causades per alteracions genètiques, ja sigui per mutacions del mtDNA o de gens nuclears que codifiquen per proteïnes que tenen la seva funció a la mitocòndria. Aquestes malalties es poden classificar en tres grups, segons el seu origen genètic: (a) causades per mutacions primàries del mtDNA, (b) causades per mutacions del nDNA que afecten a gens directament implicats en la funció OXPHOS, o en gens que codifiquen per factors implicats en l'assemblatge dels complexos de la cadena respiratòria, i (c) les malalties causades per mutacions del nDNA que afecten a gens implicats en el correcte manteniment del mtDNA. Des de l'any 1999 hi ha hagut un apogeu en el descobriment de gens nuclears relacionats amb la síndrome de depleció del mtDNA (MDS) i d'altres malalties relacionades. Aquest grup de gens comprèn principalment gens que codifiquen per proteïnes que juguen un paper directe en la replicació del mtDNA, com són *POLG*, *POLG2* i *TWINKLE*, o bé gens que s'encarreguen del transport i síntesi de desoxinucleòtids trifosfat (dNTPs) de la via de salvament del metabolisme nucleotídic. D'aquest grup s'han identificat *TP*, *DGUOK*, *TK2*, *DNC*, *MPV17*, *SUCLA2*, *SUCLG1* i *RRM2B* (45).

3.2. La síndrome de depleció del DNA mitocondrial (MDS) per deficiència de timidina quinasa 2 (TK2)

La síndrome de depleció del mtDNA (*Mitochondrial DNA Depletion Syndrome*, MIM #609560) es caracteritza per una reducció en el nombre de còpies del mtDNA, sense

presència de mutacions i/o reordenacions en el procés (60), i forma part d'un grup heterogeni de malalties que s'hereten de forma autosòmica recessiva. En un estudi amb quatre pacients no emparentats que presentaven una miopatia fulminant infantil i síndrome de depleció del mtDNA el grup d'A. Saada va observar nivells baixos d'activitat de la cadena respiratòria, i la quantitat de mtDNA disminuïda al múscul esquelètic. L'anàlisi de la seqüència del gen TK2 va revelar la presència de dues mutacions (H90R, I181D) que, o bé l'una o bé l'altre es trobaven presents en els pacients, reduint així l'activitat de TK2 (61). Actualment es coneixen un total 14 mutacions de sentit erroni i una mutació sense sentit en el gen TK2, que, actuant en homozigosi recessiva o heterozigosi composta causen deficiència d'aquest enzim. Altres gens, les mutacions dels quals s'han associat a depleció del mtDNA en el múscul esquelètic són el gen de la subunitat β de la succinil-CoA sintasa (*SUCLA2*) (62), i la subunitat dependent de p53 de la ribonucleòtid reductasa (*RRM2B*) (63).

El subministrament de dNTPs a dins la mitocondria es dona per dues vies complementaries, el transport actiu de dNTPs citosòlics o el salvament (reciclatge) de dNTPs dins la matriu mitocondrial gràcies a la acció de dos desoxinucleòtid quinases mitocondrials, la desoxiguanosina quinasa (dGK) i la TK2. TK2 catalitza la fosforilació de la desoxitimidina (dThd) i la desoxicitidina (dCyt), mentre que la dGK fosforila la desoxiadenosina (dAdo) i la desoxiguanosina (dGuo). Això fa que aquests dos enzims siguin fonamentals per a l'estabilitat i la regulació del *pool* de nucleòtids (dNTP) mitocondrial i pel manteniment de la integritat del mtDNA. També s'ha descrit una desoxinucleotidasa mitocondrial (dNT2), equivalent a la citosòlica (5'NT), que desfosforila la timidina i la desoxicitidina monofosfat (64). L'activitat de dNT-2 és, per tant, inversa a la de TK2, formant així un cicle substrat-producte que contribueix a la fina regulació del *pool* de dNTPs mitocondrial (65) (Figura 5). La identificació de mutacions en el gen de la timidina fosforilasa (TP) en pacients MNGIE (*Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy*, MIM # 603041) (66) evidencià la importància de la regulació del *pool* de dNTPs mitocondrial ja que aquest enzim participa directament en el control de l'homeòstasi dels nucleòtids. Els pacients MNGIE no són capaços de catabolitzar la timidina y la desoxiuridina, per la qual cosa acumulen quantitats tòxiques d'aquests nucleòsids en el plasma (67-68). S'ha postulat que l'alteració en l'equilibri del *pool* de nucleòtids podria ser responsable del fenotip de depleció, delecions múltiples i mutacions puntuals en el mtDNA, observat en el múscul esquelètic de pacients MNGIE (69).

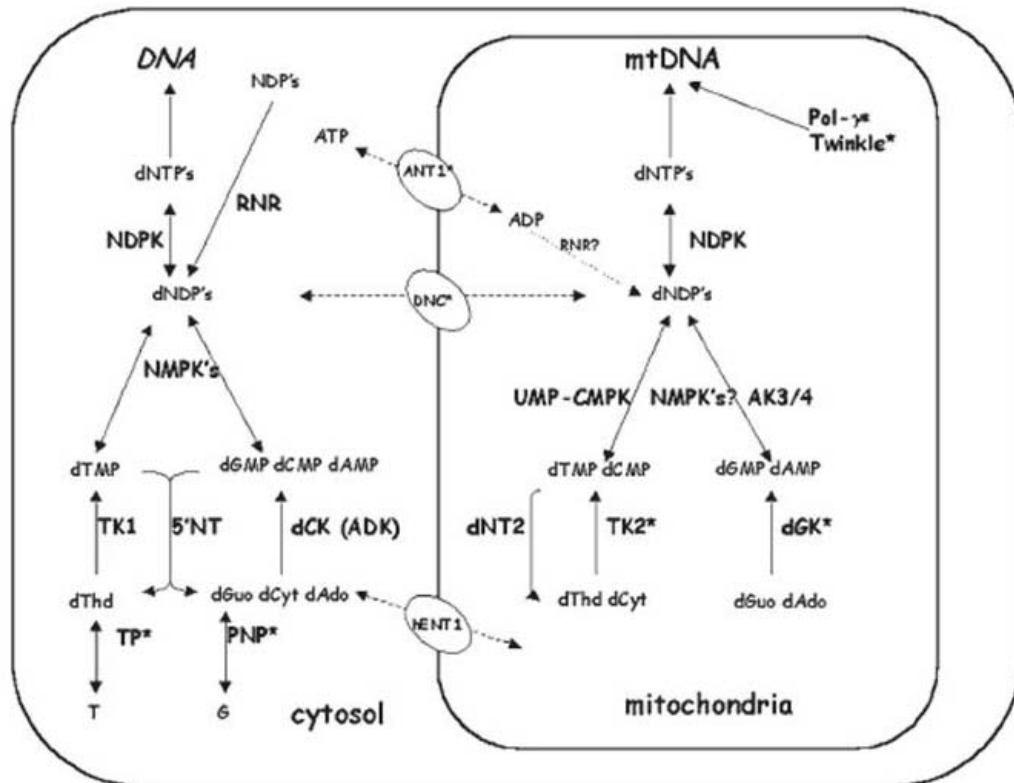


Figura 5. Esquema de les vies de salvament citosòlica i mitocondrial del metabolisme dels nucleòtids i nucleòsids. Saada A. *DNA Cell Biol.* 2004.

En cèl·lules que no es divideixen, la isoforma citosòlica de la TK2, la timidina quinasa 1 (TK1), i la síntesi *de novo* de dNTPs estan reprimides, fet que fa imprescindibles les dues desoxinucleòtid quinases mitocondrials per a la síntesi dels precursors necessaris per a la replicació del mtDNA.

Fisiopatologia de la síndrome de depleció del DNA mitocondrial per deficiència de TK2

La forma miopàtica de la MDS és una malaltia mitocondrial de progressió lenta que comença durant la infància i presenta una depleció del mtDNA al múscul esquelètic menys severa (entre el 66 i el 86%) que en el cas de la variant hepatocerebral de la síndrome, que presenta fins a un 99% de depleció a fetge (70). En general, podríem establir que els individus amb la forma miopàtica de la MDS presenten nivells variables de depleció del mtDNA en els diferents teixits, sent aquest nivells relativament normals als teixits no afectats.

Aquesta síndrome presenta una fisiopatologia heterogènia entre els diferents pacients estudiats. La malaltia sol presentar elements comuns com la presència de fibres *ragged-red* al múscul esquelètic, deficiència de l'activitat de la cadena respiratòria, i nivells variables de depleció del mtDNA. A nivell clínic els pacients presenten una forta hipotonia provocada habitualment per una pèrdua progressiva de massa muscular, acidosi làctica, encara que no en tots casos, i de vegades poden presentar oftalmoplègia, lordosi lumbar i/o displègia facial. La malaltia també és molt variable en termes de pronòstic de supervivència, des de casos fatals durant els primers mesos de vida fins a casos on progressa lentament fins a l'adolescència (60, 71-75). Fins al moment, no s'ha pogut correlacionar aspectes genètics, bioquímics o moleculars de la MDS amb la severitat del cas en particular, així que la heterogeneïtat de la síndrome segueix sent una incògnita.

3.3. La síndrome de depleció del DNA mitocondrial (MDS) per deficiència de desoxiguanosina quinasa (dGK)

Els individus amb la forma hepatocerebral de la MDS presenten, des del naixement, una deficiència hepàtica progressiva acompanyada de complicacions neurològiques, hipoglicèmia i hiperlactatèmia. El pronòstic és molt dolent i els individus afectes solen morir durant els primers mesos de vida. Els teixits afectats presenten una forta depleció del mtDNA (88-99%) i una disminució en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria codificats parcialment pel mtDNA (76). Aquesta síndrome pot ser causada per mutacions en els gens de la desoxiguanosina quinasa (*DGUOK*), *MPV17*, la helicasa Twinkle (*C10ORF2*), la DNA polimerasa γ (*POLG1*), i la subunitat α de la succinil-CoA sintasa (*SUCLG1*). La neuropatia que presenten els indis Navajos també constitueix una forma hepatocerebral de la MDS.

4. Depleció del DNA mitocondrial d'origen farmacològic

A més a més de la depleció del mtDNA produïda per deficiència heretable d'algun enzim clau en el manteniment i estabilitat del genoma mitocondrial, també es produeix una disminució del nombre de còpies de mtDNA notable, i molt rellevant a nivell funcional, en individus tractats amb fàrmacs antiretrovirals. Aquests fàrmacs interfereixen la

replicació del mtDNA mitjançant diferents interaccions, en funció de la naturalesa química del compost i del disseny del seu principi d'acció front el virus del HIV-1. S'entén que la inhibició del procés replicatiu del mtDNA es dona perquè un cop dins de la mitocondria, els NRTIs trifosfat establirien una competència amb els dNTPs endògens per a ser incorporats al mtDNA, i un cop incorporats, la manca del grup 3'-OH, provocaria l'aturada de la síntesi de la cadena de mtDNA nova (77-78). Al mateix temps, la falta del grup 3'-OH permetrà que l'NRTI trifosfat incorporat sigui resistent a l'activitat exonucleasa de la DNA polimerasa γ (79). Finalment, fruit de l'acumulació intracel·lular de la forma monofosfat dels NRTIs, també es dona una inhibició de l'activitat exonucleasa de l'enzim.

S'ha pogut observar que aquesta toxicitat provocada pel mal funcionament de l'activitat mitocondrial afecta predominantment a alguns teixits, sent aquests els músculs esquelètic i cardíac, el fetge, el sistema nerviós perifèric, i el teixit adipós. Com a conseqüència de la toxicitat mitocondrial, a nivell sistèmic és molt comú trobar nivells elevats de lactat circulant en el plasma dels individus afectats. Pacients infectats per l'HIV-1 que eren tractats amb monoteràpia de zidovudina (AZT) acabaven presentant una miopatia severa al cap d'uns anys de tractament, associada a toxicitat mitocondrial amb presència de fibres *ragged-red* i depleció del mtDNA (80-84). Aquesta miopatia associada al AZT era clarament dosi dependent i al retirar la farmacologia es recuperava quantitat de mtDNA amb la millora consegüent del pacient (85).

Estudis en cèl·lules PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) han demostrat que els pacients HIV-1 tractats amb estavudina presenten uns nivells significativament més baixos de mtDNA respecte a individus control (86-87). També s'observen alteracions metabòliques, conseqüència de la disfunció mitocondrial, com la hiperlactatèmia (86). Per altra banda s'ha observat depleció del mtDNA en el fetge de pacients infectats per l'HIV-1 i el virus de la hepatitis C, tractats amb anàlegs de nucleòsids inhibidors de la transcriptasa reversa (NRTIs), i s'ha inferit que, en aquest cas, es requereix d'una depleció del mtDNA bastant pronunciada per a que el fetge contribueixi a l'augment dels nivells de lactat (88). De forma similar, un estudi en pacients HIV-1 tractats amb NRTIs ha identificat depleció del mtDNA i una reducció en la capacitat oxidativa en el múscul esquelètic. De la mateixa manera, la hiperlactatèmia derivada de l'alterat estat energètic del múscul només s'ha pogut associar als casos on la depleció del mtDNA i les conseqüències pel què fa a la capacitat oxidativa resultaven ser més severes (89).

Les evidències de depleció del mtDNA en el teixit adipós provocada per la farmacologia associada al tractament de l'HIV-1 seran exposades posteriorment, amb més deteniment, en els capítols 5.2.3 i 6.

5. Lipodistròfia en pacients d'HIV-1

5.1. Introducció

La lipodistròfia és una malaltia caracteritzada per la pèrdua i acumulació selectiva de teixit adipós en els diferents dipòsits anatòmics. Aquestes síndromes presenten uns aspectes clínics molt heterogenis, tant si són adquirides com congènites, i els pacients afectats es caracteritzen per ser propensos a la resistència a la insulina i d'altres complicacions metabòliques associades: diabetis mellitus, dislipidèmia, esteatosi hepàtica i acantosi nigricans. En dones, també poden ser-hi presents característiques de la síndrome de l'ovari policístic, com ara hirsutisme, oligomenorrea i ovari policístic en si.

La primera descripció d'un fenotip clínic de lipodistròfia data del 1885 (90) i tot just ara s'estan començant a elucidar les bases genètiques, cel·lulars i moleculars subjacents als diferents tipus de lipodistròfies.

5.2. Fisiopatologia de la lipodistròfia adquirida associada a l'HIV-1

Les lipodistròfies adquirides són més comuns en la població que les congènites. En un primer moment, el terme "síndrome lipodistròfica" associat a HIV-1, va ser introduït per descriure un quadre clínic complex que incloïa la redistribució del teixit adipós i alteracions metabòliques que es donaven en pacients infectats per l'HIV-1 i que, sota tractament HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), rebien inhibidors de proteasa (HALS, "*HIV-1/HAART Associated Lipodystrophy Syndrome*") (91). Amb l'estudi de la síndrome, altres característiques com l'osteopènia i la hiperlactatèmia s'han inclòs dins el diagnòstic. Tot i els recents avenços, a dia d'avui no existeix un consens clar per a la definició d'aquesta síndrome, i això és degut, en part, a que no tota la simptomatologia es manifesta per complet ni al mateix temps en tots els pacients, fet que genera que el diagnòstic respongui en molts casos a una interpretació massa subjectiva del cas estudiat en particular.

5.2.1. Components de la teràpia HAART

5.2.1.1. Introducció

La teràpia HAART aconsegueix una ràpida reducció del RNA viral al plasma sanguini i en limfòcits infectats. L'HIV necessita retrotranscriure el seu RNA de cadena simple a DNA de doble cadena per a poder integrar el seu material genètic al genoma de la cèl·lula hostagera, i així, controlar la maquinària de transcripció i traducció d'aquesta per a produir nous virions. Els fàrmacs antiretrovirals usats actualment s'agrupen dins de tres grans famílies, cadascuna de les quals intervé de manera diferent en aquest procés. L'administració combinada d'aquests fàrmacs resulta en una acció de bloqueig coordinada, tant de la replicació com de la maduració del virus, aconseguint així un millor control de la càrrega viral.

5.2.1.2. Inhibidors de proteases (PIs)

Els PIs són molècules dissenyades com a substrats anàlegs de les proteases víriques que bloquegen el centre actiu de la proteasa un cop s'hi uneixen, evitant així la formació de nous virions, ja que les proteïnes precursors del virus no podran ser procesades. Els PIs utilitzats a la teràpia HAART són: amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir i saquinavir.

5.2.1.3. Inhibidors de la transcriptasa reversa, anàlegs de nucleòsids (NRTIs)

Els NRTIs són compostos derivats de l'adenosina, la citosina i la timina. Són inhibidors competitiu i actuen com a substrat alternatiu per al procés de polimerització del DNA. Són considerats profàrmacs ja que necessiten ser trifosforilats en 5' per a ser actius. La modificació química més important d'aquests compostos és que els manca l'extrem 3'-OH, o en el cas de la zidovudina, que aquest extrem està substituït per un grup azida (N₃). Aquesta modificació evita la formació de l'enllaç 3'-5' fosfodièster entre els nucleòsids de la cadena de DNA en elongació i el nucleòsid 5' trifosfat entrant. D'aquesta manera els NRTIs actuen com a terminadors de la funció de la transcriptasa reversa del virus. Actualment, els NRTIs d'ús més freqüent són: estavudina (d4T), didanosina (ddI), lamivudina (3TC), zidovudina (AZT), zalcitabina (ddC) i abacavir (ABC).

5.2.1.4. Inhibidors de la transcriptasa reversa, no anàlegs de nucleòsids (NNRTIs)

Els NNRTIs incluen un grup de compostos policíclics de naturalesa química divergent que actuen com a inhibidors al·lostèrics no competitiu de la transcriptasa reversa: s'uneixen covalentment a la cavitat hidrofòbica adjacent al domini actiu polimersasa de la subunitat p66 anomenat NNRTI-BP, induint modificacions estructurals que disminueixen la taxa d'incorporació de nucleòtids a través del desplaçament de residus aspartat del domini catalític polimerasa (92). A diferència dels NRTIs no necessiten ser fosforilats per ser actius. Aquest grup de fàrmacs inclou: efavirenz, delavirdina i nevirapina.

5.2.2. Quadre clínic

La característica principal descrita en els pacients amb lipodistròfia associada a HIV-1 és la pèrdua de teixit adipós subcutani perifèric (lipoatròfia) a la cara (periorbital i temporal), braços, natges i cames, deixant molt visibles i prominents les venes i la musculatura de les extremitats inferiors. Aquesta pèrdua de greix perifèric pot anar acompanyada d'una acumulació de teixit adipós central visceral a nivell intrabdominal, i en dones, als pits (lipohipertròfia) (91). En alguns casos, els pacients poden presentar acumulacions de greix al coll i a la zona dorsocervical, donant lloc respectivament, a una doble barbata i al que es denomina gepa de búfal (de l'anglès, *buffalo hump*), així com altres lipomes en altres localitzacions anatòmiques (93).

Al mateix temps que es desenvolupen les alteracions fisiològiques, es desenvolupen greus alteracions metabòliques. En molts dels casos, els pacients acaben desenvolupant resistència a la insulina, tan perifèrica com hepàtica, diabetis mellitus, hipertrigliceridèmia, baixos nivells de colesterol associats a HDL (94), elevats nivells de colesterol associats a LDL, un increment en els àcids grassos lliures circulants, hiperglicèmia (95) i esteatosi hepàtica (96). En relació als nivells d'adipoquines circulants, l'adiponectina es troba disminuïda en sèrum (97).

Diferents estudis transversals de la població d'individus tractats amb antiretrovirals han estimat una prevalença de la síndrome d'entre un 30 i un 50% (94, 98). La lipodistròfia, en general, no és atribuïble a cap família de fàrmacs de la HAART en concret, mentre que la component lipoatròfica sí que es veu fortament associada al

tractament amb NRTIs, i concretament amb anàlegs de timina. Per altra banda, les alteracions sistèmiques, reminiscents de la síndrome metabòlica, que provoquen aquests fàrmacs solen estar més associades al tractament amb PIs. El risc de patir la síndrome incrementa amb el temps d'exposició del organisme al tractament, l'edat del pacient i el grau d'immunodeficiència. No obstant, la composició del tractament també pot accentuar l'evolució de la lipodistròfia ja que s'ha observat que la pèrdua de teixit adipós subcutani progressa de forma més ràpida en pacients tractats amb NRTIs i PIs si els comparem amb els que només reben NRTIs.

5.2.3. Patogenicitat. Toxicitat mitocondrial

Els mecanismes moleculars responsables de la síndrome lipodistròfica segueixen sent l'objecte d'estudi d'un bon nombre de investigadors ja que no s'han pogut identificar les bases moleculars de manera concisa. La comunitat científica accepta que estaríem parlant d'un seguit de processos patofisiològics que, actuant de manera sinèrgica, acabarien per donar lloc a la malaltia. Resulta complicat establir els límits per a definir aquests processos, però a grans trets podem separar-los entre els que estan relacionats amb la toxicitat mitocondrial, i els que no, que estarien relacionats amb la inhibició de l'adipogènesi i la inducció de processos inflamatoris, malgrat no es pot descartar la possibilitat que sigui la pròpia toxicitat mitocondrial la causant final de les alteracions en els processos inflamatoris i adipogènics.

La disfunció mitocondrial en el teixit adipós de pacients tractats amb teràpia HAART ha estat objecte d'estudi en un context de recerca on la funció mitocondrial, dins la fisiologia cel·lular, ha estat redefinida, deixant de ser un simple generador d'energia química, per esdevenir una component essencial en el control de processos molt importants, com són l'apoptosi i la producció de espècies reactives d'oxigen (ROS), entre d'altres (Figura 6). En el mateix context, la investigació duta a terme en el camp de la HALS ha contribuït potentment a realçar la importància de la mitocòndria dins de la biologia del teixit adipós (99).

La teràpia HAART ha suposat un avenç significatiu pel tractament de la SIDA, ja que la que fins ara era una malaltia letal ha esdevingut una malaltia crònica tractable. Malgrat la revolució que ha suposat aquests tractaments, la HALS, i més concretament la

toxicitat mitocondrial associada a aquesta, ha esdevingut una entitat clínica concomitant a aquest tractament (80, 82).

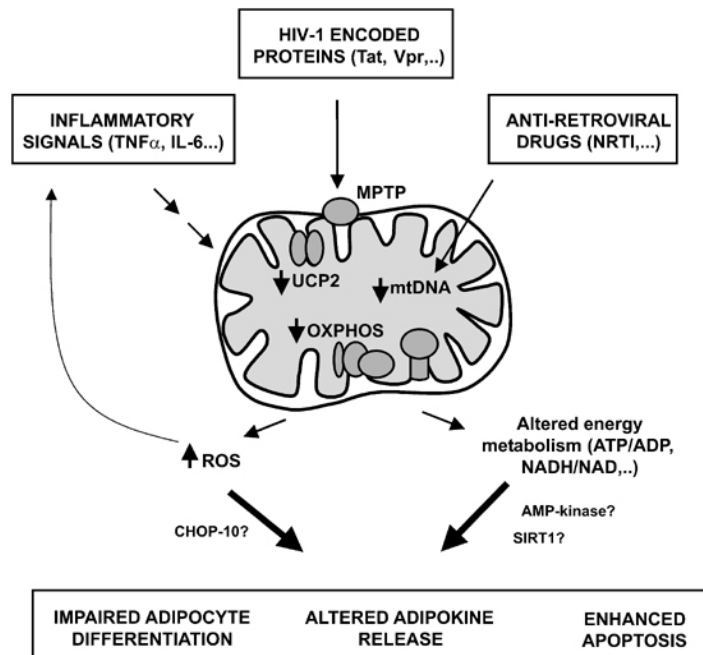


Figura 6. Model teòric de com les alteracions mitocondrials atribuïdes als fàrmacs antiretrovirals, proteïnes de l'HIV-1, i senyals inflammatòries podrien estar provocant lipoatròfia en els pacients HALS. *Villarroya et al. Int J Obes. 2007.*

5.2.3.1. La fosforilació dels NRTIs

Anteriorment ja s'ha esmentat l'acció dels NRTIs inhibint la DNA polimerasa γ . D'altra banda, cal esmentar que els NRTIs entren a la cèl·lula a través dels transportadors de nucleòsids ubicats a la membrana plasmàtica, i un cop dins la cèl·lula són fosforilats tres vegades, emulant el mateix procés que pateixen els desoxinucleòsids endògens. Aquest seguit de fosforilacions es pot donar total o parcialment a dins la matriu mitocondrial, que conté isoformes orgànul-específiques de les desoxinucleòtid quinases encarregades d'aquestes reaccions enzimàtiques. La TK2, com s'ha esmentat anteriorment, és la timidina quinasa mitocondrial, mentre que la TK1 es troba al citosol. La TK1 és present i activa en aquells teixits que tenen un recanvi mitòtic més freqüent, mentre que l'expressió de TK2 no sembla ser depenent de la fase del cicle cel·lular (100-102). El fet que la seva presència relativa en cada tipus cel·lular variï, podria ser un dels determinants de que un teixit sigui més susceptible que un altre a desenvolupar toxicitat mitocondrial.

Pel que fa al paper de TK2 en el desenvolupament de toxicitat mitocondrial sembla tractar-se d'una diana clau. En estudis en cultius cel·lulars s'ha pogut observar que l'estavudina i la zidovudina són repressors de la TK2, impeding que aquest enzim fosforili correctament els desoxinucleòsids endògens, portant a un desequilibri en el *pool* de dNTPs mitocondrial (103).

5.2.3.2. L'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu es un fenomen que es defineix habitualment com el desequilibri entre la producció de ROS (superòxid, peròxid d'hidrogen, radicals hidroxil i peroxinitrit, etc.) i els agents antioxidants de la cèl·lula (104). Els ROS oxiden les cadenes de mtDNA obstaculitzant així la replicació d'aquest. La mitocòndria concentra ferro (Fe) per a que pugui ser incorporat als citocroms i proteïnes no hemo-fèrriques incloent-hi enzims amb el grup Fe-S com l'aconitasa. Els ROS poden alliberar el ferro Fe(II) de l'aconitasa (105), i aquest unir-se al mtDNA donant lloc a punts específics d'oxidació. La conseqüència immediata de la depleció del mtDNA serà una síntesi insuficient de proteïnes essencials per al sistema OXPHOS. Seguidament, el funcionament alterat de la cadena respiratòria provocarà una pèrdua d'energia, donant lloc a un augment de la relació AMP/ATP, incrementant la producció de ROS, com a conseqüència de l'alliberament d'electrons (106). Aquest efecte promou que es produeixin mutacions, delecions i en definitiva, depleció del mtDNA, accentuant així l'efecte inhibitori sobre la DNA polimersasa γ per part dels NRTIs.

Per altra banda, també s'ha descrit que la DNA polimersasa γ és sensible al dany oxidatiu *in vitro*, fet que podria ser rellevant *in vivo* (107).

5.2.3.3. L'apoptosi en la HALS

L'apoptosi d'adipòcits i cèl·lules endotelials és una de les característiques comuns en el teixit adipós subcutani dels pacients HALS (108-110). Tot i que és ben coneguda la implicació que té la mitocòndria en les vies d'inducció de l'apoptosi, no està clar en quin punt específic del procés actua la teràpia antiretroviral. Així i tot, s'han descrit elevats nivells d'apoptosi conjuntament amb depleció del mtDNA en pacients tractats amb

estavudina respecte individus control, així com també s'han observat millores en els nivells de mtDNA i apoptosi dels pacients tractats quan a aquests se'ls canvia l'estavudina per altres NRTIs menys agressius, com l'abacavir o la zidovudina (111). En conjunt, aquestes dades semblen indicar que l'apoptosi observada deriva dels efectes de toxicitat mitocondrial produïts pels NRTIs. No obstant, altres fàrmacs antiretrovirals diferents dels NRTIs, podrien estar intervenint en les vies d'apoptosi. S'ha descrit que el nelfinavir (i possiblement altres inhibidors de proteasa) faciliten certa protecció contra l'apoptosi a través de la interacció directa amb el complex del porus de permeabilitat de transició mitocondrial (MPTP), component principal en el control de l'apoptosi dependent de mitocòndria (112). Aquest estudi no ha estat realitzat en el context de cèl·lules adiposes i els resultats es contradiuen amb el rol proapoptòtic atorgat al inhibidors de proteasa associat a toxicitat mitocondrial (113). Estudis recents en cultius d'adipòcits indiquen que el nelfinavir sí que indueix l'apoptosi (114).

Així doncs, sembla ser que la mitocòndria juga un paper clau en els processos apoptòtics derivats de la teràpia antiretroviral. En estudis amb pacients de la HALS s'ha pogut observar una morfologia mitocondrial alterada en els adipòcits en procés d'apoptosi (115). Per altra banda, la substitució dels fàrmacs antiretrovirals que es coneix que donen més toxicitat mitocondrial per d'altres, provoca un increment de la massa de teixit adipós subcutani (111). Per contra, aquesta millora no es dona quan el canvi de règim només millora el quadre metabòlic del pacient, sense modificar el grau de toxicitat mitocondrial, i per tant, tampoc l'apoptosi que se'n deriva (116).

Aquests estudis donen consistència a la hipòtesi que les alteracions mitocondrials produïdes pels fàrmacs antiretrovirals poden activar l'apoptosi en adipòcits, de la mateixa manera que ha estat descrit en altres tipus cel·lulars. De fet, una de les hipòtesis de com el dany mitocondrial podria portar a l'activació del catabolisme, implica l'activació de l'AMP-quinasa degut a un augment dels nivells d'AMP (99) i, recentment, s'ha vist que l'activació de l'AMP-quinasa és inductora de l'apoptosi (117). Altres factors que es coneix que activen l'apoptosi al teixit adipós, ja sigui com a conseqüència de l'acció de la infecció o per la inducció de l'activitat AMP-quinasa esmentada, són uns nivells alts d'interferó α (IFN- α) (118). Finalment un altre possible origen de l'activació de l'apoptosi a través de la mitocòndria estaria relacionat amb la producció de ROS, ja que estudis recents han descrit un augment de l'apoptosi en cultius d'adipòcits tractats amb PIs a causa de l'activació de l'estrès oxidatiu (119).

5.2.3.4. La infecció de l'HIV-1

L'HIV-1 per si sol podria ser responsable de contribuir a l'estrès oxidatiu. L'expressió transgènica de la proteïna vírica Tat en cultius cel·lulars de neurones humanes i ratolins altera les defenses antioxidants: s'han observat canvis en el contingut cel·lular de glutatió i la supressió de l'activitat superòxid dismutasa (120), major susceptibilitat a la toxicitat per NRTIs (121) i alteracions ultraestructurals de la mitocòndria (122). En humans, la proteïna vírica Vpr pot activar els components mitocondrials de la via d'apoptosi cel·lular, com és el MPTP (123-124), i per tant, fer més sensible les cèl·lules a l'apoptosi mediada per toxicitat mitocondrial deguda al tractament antiretroviral.

També en humans, hi ha dades que indiquen depleció del mtDNA i alteracions de la cadena respiratòria en cèl·lules PBMC i greix subcutani de pacients infectats per l'HIV-1 no tractats, però aquest conjunt d'evidències serà tractat més endavant, en el capítol 6.5.

6. El paper del DNA mitocondrial en la patofisiologia del teixit adipós

6.1. El DNA mitocondrial en els adipòcits

El paper que juga la funció mitocondrial en el teixit adipós ha estat un tema marginat tradicionalment ja que s'ha assumit que el pobre equipament mitocondrial present en l'adipòcit blanc, relegat al petit espai citosòlic que embolcalla la vacuola lipídica, no pot representar una funció rellevant per a la biologia de la cèl·lula adiposa. Només en el cas dels adipòcits marrons, que tenen la particularitat d'estar especialitzats en la funció termogènica i presenten una potent maquinària mitocondrial, la funció mitocondrial ha gaudit d'una atenció rellevant (Figura 7). Malgrat això, el paper que juguen els adipòcits marrons en patologies metabòliques en humans, tals com l'obesitat o la diabetis mellitus tipus 2, no està gens clar, ja que encara avui en dia és tema d'estudi i controvèrsia fins a quin punt la poca i dispersa presència de teixit adipós marró en humans adults podria estar representant un element rellevant. Durant aquests últims anys,

diferents grups de recerca focalitzats en l'estudi de la fisiopatologia del teixit adipós han aportat evidències que destaquen la rellevància, prèviament no reconeguda, de la funció mitocondrial per a la biologia d'aquest teixit i la regulació metabòlica sistèmica.

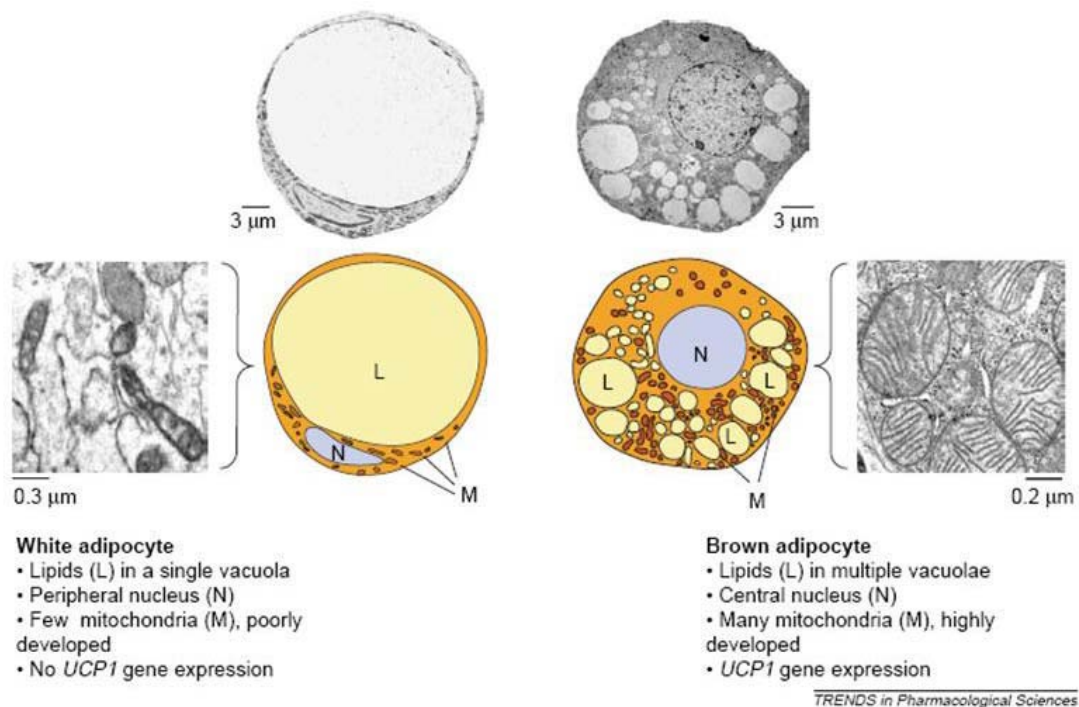


Figura 7. Representació i microscopia electrònica de la morfologia diferencial dels adipòcits blanc i marró. Abreviacions: L, lípid. N, nucli. M, mitocòndria. *Villarroya et al. TRENDS. 2005.*

Actualment, la recerca que s'està duent a terme des de camps com la genètica, l'endocrinologia o la farmacologia indiquen que la biologia del mtDNA és molt important per a la funció del teixit adipós i que alteracions en el mtDNA podrien tenir conseqüències tant en el propi teixit com sistèmiques. Malgrat això, som lluny encara de poder entendre mecanísticament de quina manera les alteracions en el mtDNA causen aquests efectes.

6.2. El DNA mitocondrial en el desenvolupament i diferenciació de l'adipòcit

Fins fa pocs anys, els estudis de la biologia del mtDNA en el teixit adipós han estat restringits a l'anàlisi de la biogènesi mitocondrial en el teixit adipós marró, teixit especialitzat en la termogènesi i per tant, contràriament al teixit adipós blanc, un teixit que conté grans quantitats de mitocòndries amb gran capacitat oxidativa. Durant el

desenvolupament i diferenciació del teixit adipós marró es potencia la biogènesi mitocondrial, procés que està associat a un increment en la quantitat de mtDNA i també a l'augment de l'expressió de components del sistema OXPHOS codificats pel genoma mitocondrial (125). Els activadors transcripcionals, PGC-1 α i PGC-1 β , juguen un paper principal en aquest procés, ja que són els factors que coordinen l'augment de l'expressió dels factors nuclears incrementant la replicació i transcripció del mtDNA, i regulen l'expressió de gens específics de l'activitat termogènica (126).

Estudis recents han posat de manifest la importància de la biogènesi mitocondrial en la biologia del teixit adipós blanc, i el possible potencial de les alteracions mitocondrials a l'hora d'alterar la funció i desenvolupament de l'adipòcit. Estudis de S. Corvera i col·laboradors han demostrat que (a) la biogènesi mitocondrial està directament associada amb la diferenciació de l'adipòcit; (b) els ratolins obesos ob/ob presenten una massa i funció mitocondrials alterades; i (c) el tractament amb tiazolidindiones (TZDs), compostos que activen el receptor nuclear PPAR γ afavorint la diferenciació adipocitària, milloren aquestes alteracions (127-128). També s'ha pogut observar que la diferenciació de l'adipòcit blanc està associada amb un increment relatiu del contingut de mtDNA, com també dels components responsables de la replicació i transcripció d'aquest, tals com TFAM (129), i també de components del metabolisme dels desoxinucleòtids necessaris per a la replicació del mtDNA (103). Paral·lelament, agents que indueixen la diferenciació de l'adipòcit blanc *in vitro*, tals com les glitazones, també augmenten el contingut de mtDNA en adipòcits humans *in vitro* (130).

6.3. Alteracions del DNA mitocondrial en l'obesitat

L'estudi de les possibles alteracions del mtDNA en el teixit adipós en relació amb l'obesitat s'ha centrat en dues possibles alteracions: modificacions en la abundància de mtDNA subjacents als fenotips d'obesitat, i l'aparició de formes mutades o polimòrfiques del mtDNA específicament associades amb l'obesitat.

En models experimentals d'obesitat, tals com els ratolins ob/ob o db/db, s'ha observat un contingut de mtDNA anormalment disminuït (131-132). El tractament d'aquests ratolins amb glitazones augmenta el contingut de mtDNA en el teixit adipós blanc (132), de la mateixa manera que en els estudis *in vitro* esmentats anteriorment. En

un estudi en que ratolins eren alimentats amb una dieta enriquida en àcids grassos poliinsaturats es van identificar transcrits i proteïnes codificades pel mtDNA en el grup dels gens més sobreexpressats en el teixit adipós i aquesta sobreexpressió es veia associada amb un increment de l'oxidació d'àcids grassos (133). En humans ens trobem amb un escenari més complex. Estudis de P. Arner i col·laboradors indiquen que l'abundància relativa de mtDNA no està associada amb l'obesitat *per se* sinó més aviat amb fenotips de diabetis tipus II (134), i de fet, l'abundància de mtDNA es veu fortament relacionada amb la lipogènesi en el teixit adipós (135), més que no pas amb l'índex de massa corporal (BMI). El mecanisme mitjançant el qual el nombre de còpies de mtDNA podria estar afectant el ritme lipogènic en el teixit adipós segueix sent una incògnita, però entra en contradicció amb la relació plausible entre les variacions en l'abundància de mtDNA, la despesa energètica i l'oxidació del teixit adipós. A més a més, en humans, de la mateixa manera que en ratolins, el tractament amb pioglitazona provoca un augment en l'abundància de mtDNA en el teixit adipós (136).

Probablement, una de les evidències més destacables del possible paper de que juga l'abundància relativa de mtDNA en l'obesitat en humans ha estat recentment proporcionada per un estudi realitzat amb una sèrie de bessons monozigots, discordants pel què fa al fenotip d'obesitat (137). L'anàlisi de la seqüència del mtDNA en el teixit adipós subcutani dels individus va confirmar que no existia heteroplàsmia aberrant entre les parelles de bessons i malgrat això, el nombre de còpies de mtDNA estava disminuït un 47% en el teixit adipós dels bessons obesos comparant amb els seus respectius germans. Aquests resultats destaquen el possible paper que l'abundància de mtDNA pot estar jugant en la regulació de la massa de teixit adipós en humans.

Una altra línia de recerca important es centra en l'anàlisi de mutacions del mtDNA per les quals no s'han observat conseqüències patogèniques, però que podrien constituir formes polimòrfiques del mtDNA relacionades amb l'obesitat. Varis estudis mostren aquesta associació però no s'ha pogut arribar encara a cap conclusió clara. El polimorfisme 15497 G/A, que provoca el canvi d'una glicina per una serina en el residu 251 (Gly251Ser) del citocrom b, codificat pel mtDNA, ha estat associat amb l'obesitat en població japonesa (138). De fet, els individus portadors de l'al·lel A presentaven una ràtio cintura-cadera augmentat i un elevat nivell de triglicèrids respecte els portadors de l'al·lel G. Malgrat aquestes dades, les conseqüències funcionals d'aquest polimorfisme per a la biologia del teixit adipós, i si està afectant de forma directa la funció adipocitària o bé el

balanç energètic general provocant una expansió de la massa del teixit, són encara desconegudes. Estudis en poblacions caucàsiques van determinar que aquesta mutació contribueix a un fenotip sever d'obesitat però només en alguns casos particulars (139), i així mateix, un polimorfisme a la regió no codificant del *D-loop* del mtDNA no va poder ser associat amb l'obesitat (140). Recentment, dos polimorfismes que afecten als gens de la subunitat I de la NADH deshidrogenasa i del rRNA 12S, ambdós codificats pel mtDNA, han estat també associats amb l'obesitat en una població japonesa (141) mentre que una variant comú del mtDNA ha estat associada amb un baix índex de massa corporal en dones caucàsiques (142).

6.4. Mutacions patogèniques del DNA mitocondrial i alteracions en el teixit adipós

Des dels anys 80 es coneix que delecions i mutacions en el mtDNA causen malalties humanes, les característiques patogèniques més comuns de les quals impliquen disfuncions en el sistema nerviós i en el múscul esquelètic, però no en el teixit adipós. No obstant, existeix una excepció sorprenent: mutacions en el tRNA-Lys, codificat pel mtDNA, causen lipomatosi. La majoria de pacients portadors de mutacions en el tRNA-Lys (A8344G, T8356C, G8361A, G8363A) presenten la síndrome MERRF (*Myoclonic Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers*, MIM #545000), caracteritzada per símptomes de neuropatia i miopatia, però també en trobem d'altres que presenten un augment anòmal del teixit adipós situat a la zona dorsal, de forma similar al què succeeix en la síndrome Madelung (143-146). El teixit lipomatós en l'àrea dorso-cervical d'aquests pacients no presenta canvis pel què fa a la quantitat de mtDNA o l'expressió d'aquest; els components mitocondrials codificats pel nDNA tampoc presenten canvis a excepció dels responsables de la regulació de l'adipogènesi. Existeix també un patró d'expressió distorsionat pel què fa a la diferenciació dels adipòcits, que presenta unes característiques més pròpies del teixit adipós marró que de blanc (147-148). L'explicació de com una mutació tan específica en un gen del mtDNA causa hipertròfia del teixit adipós segueix sent un misteri, però posa de manifest la importància del mtDNA per a un desenvolupament normal del teixit adipós.

Per altra banda, certes mutacions patogèniques que afecten al mtDNA estan fortament associades amb la diabetis causada per una insulinoènia progressiva,

concretament la mutació A3243G en el gen tRNA-Leu, codificat pel mtDNA. Aquesta mutació ha estat associada amb alteracions en el teixit adipós, encara que no es coneix realment si els efectes de la mutació sobre el teixit són directes o conseqüència indirecta de la insulinopènia. Una característica clínica remarcable d'aquests pacients és que presenten un baix índex de massa corporal (149-150), i en alguns pacients s'ha pogut observar lipomatosi tot i presentar un bon control de la glicèmia (151-152).

Finalment, un altre estudi que aporta evidències que contribueixen a la idea que les patologies relacionades amb el mtDNA alteren el teixit adipós prové de malalties mitocondrials causades per mutacions en gens nuclears involucrats en la replicació i/o transcripció del mtDNA. Així doncs, pacients finsos que presenten atàxia deguda a mutacions en la DNA polimerasa γ mitocondrial també presenten obesitat (153). Contràriament, en un model experimental de ratolins transgènics portadors d'una versió de la DNA polimerasa γ deficient per a l'activitat correctora d'errors, s'ha observat una reducció en la quantitat de teixit adipós subcutani associada amb una acumulació anormal de mutacions somàtiques en el mtDNA durant l'envelliment (154).

6.5. El DNA mitocondrial en les lipodistròfies

Com s'ha esmentat anteriorment, la hipòtesi més acceptada proposada per explicar l'etiopatogenicitat de la lipodistròfia associada al HIV-1 està basada en l'acció dels anàlegs de nucleòsid inhibidors de la transcriptasa reversa del virus, l'efecte secundari dels quals seria la inhibició de la DNA polimerasa γ (154) i per tant de la replicació del mtDNA. Conseqüentment, els pacients tractats amb antiretrovirals presenten una reducció en l'abundància de mtDNA (99). Un anàlisi sistemàtic d'articles publicats basats en estudis transversals indica que la majoria d'aquests treballs identifiquen consistentment una associació entre depleció del mtDNA en el teixit adipós subcutani i lipoatròfia (155). No obstant, altres teixits, a part del adipós, presenten també una reducció en el nombre de còpies de mtDNA. Així doncs, si la depleció del mtDNA fos la causa de la síndrome, es desconeix el per què afecta de forma tan específica el teixit adipós. Tampoc es coneix amb claredat quines són les conseqüències directes de la depleció del mtDNA sobre les funcions del teixit adipós en els pacients. La reducció de la quantitat del mtDNA succeeix

conjuntament amb l'expressió defectuosa de gens relacionats amb la diferenciació adipocitària (p.e. PPAR γ), la captació de lípids (p.e. lipoproteïna lipasa, GLUT4) i adipoquines (p.e. adiponectina) (156-159) però també s'ha observat que en casos on el tractament antiretroviral en pacients HIV-1 amb lipoatròfia ha sigut interromput (160) o canviat per fàrmacs que afecten menys a la DNA polimerasa γ , s'ha produït una reversió substancial de la depleció del mtDNA però només una lleu millora de la lipoatròfia (111, 161-163). Així doncs, la relació causa-efecte segueix sent font d'investigació ja que no es coneix bé. L'exposició d'adipòcits blancs en cultiu a tractaments amb anàlegs de nucleòsid inhibidors de la transcriptasa reversa provoca una reducció de l'abundància de mtDNA al mateix temps que una diferenciació defectuosa dels adipòcits (164-166). No obstant, altres fàrmacs antiretrovirals que ni inhibeixen la DNA polimerasa γ ni provoquen canvis en el contingut de mtDNA, tals com els PIs, impedeixen fortament la diferenciació adipocitària *in vitro* (167).

Un altre aspecte a tenir en compte és la diferent susceptibilitat dels pacients HIV-1 tractats amb teràpia HAART a desenvolupar una lipoatròfia més o menys severa, i fins a quin punt la toxicitat mitocondrial associada hi té algun tipus de relació. Estudis recents han evidenciat que l'haplogrup del mtDNA s'associa fortament amb la progressió i el grau de severitat de la lipoatròfia observada en pacients en tractament HAART (168), i per tant, que el *background* genètic és crucial a l'hora d'entendre com progressa la distròfia en cada pacient.

En última instància, podem esperar que el impacte potencial que tingui la depleció del mtDNA en la funció cel·lular i tissular hauria de ser reflex de la reducció que provoqui en la quantitat de productes gènics codificats pel mtDNA. Encara que la depleció del mtDNA acostuma a anar associada a una reducció en l'abundància de transcrits codificats pel mtDNA (157), la quantitat de proteïnes codificades pel genoma mitocondrial pot no veure's alterada (158, 169), suggerint l'acció de mecanismes de regulació compensatoris que estiguin augmentant l'expressió d'aquestes proteïnes. Cal esmentar també que la massa mitocondrial podria estar fins i tot augmentada en el teixit adipós de pacients amb baixa quantitat de mtDNA (156, 158, 167).

Per altra banda, si la depleció del mtDNA causa algun defecte en la cadena respiratòria, ha estat postulat que les conseqüències funcionals podrien ser resultat no només de la baixa producció d'ATP sinó que també d'una reducció en la síntesi d'uridina.

L'activitat de la dihidroorotat deshidrogenasa, un enzim clau en la síntesi *de novo* de les pirimidines, depèn de que el flux d'electrons de la cadena respiratòria funcioni de forma eficient (170). El tractament d'adipòcits amb uridina fa millorar les alteracions provocades per fàrmacs que causen depleció del mtDNA, suggerint així que un bon manteniment del mtDNA és necessari per a assegurar un bon nivell de síntesi de uridina, i que l'homeòstasi de la uridina està estretament relacionada amb el manteniment de la funció i diferenciació de l'adipòcit (171).

Sembla doncs que la reducció de còpies de mtDNA pot ser, fins a cert punt, compatible amb el manteniment d'una funcionalitat normal; per sota d'una quantitat permissiva, es creua un llindar per sota del qual els mecanismes homeostàtics del adipòcit no poden assegurar una abundància inalterada dels productes gènics codificats pel mtDNA. Actualment, no tenim els coneixements suficients sobre la mecanística de transcripció i traducció del mtDNA que ens permetin entendre de quina manera es regula l'expressió d'aquest de forma precisa. Aquesta és una àrea de recerca ben prometedora pel què fa a la intervenció farmacològica o nutricional per tal de mirar d'augmentar la taxa d'expressió del mtDNA, i així millorar les conseqüències patogèniques d'una depleció del mtDNA per sota del llindar permissiu en el teixit adipós.

Fins el moment, la majoria d'estudis s'han centrat en relacionar la depleció del mtDNA en el teixit adipós amb l'atròfia que es produeix en aquest en els pacients HIV-1. Aquest fet reflexa la relativa facilitat d'accés al teixit adipós subcutani atròfic per ser biopsiat i posteriorment analitzat. Altres signes de lipodistròfia associada a HIV-1, tals com la lipomatosi, no estan associades a pèrdua de massa adiposa. Un estudi de biòpsies de *buffalo hump* va mostrar una depleció del mtDNA similar a la que podem trobar en teixit subcutani lipoatròfic (157). Aquestes observacions qüestionen el fet que la depleció del mtDNA hagi d'implicar necessàriament un efecte atròfic en el teixit on es produeix.

Alguns estudis indiquen que les primeres senyals de depleció del mtDNA en el teixit adipós tenen lloc en absència de tractament, senzillament degudes a la infecció de l'HIV-1 (172), tot i que la majoria de treballs atribueixen la depleció del mtDNA exclusivament al tractament antiretroviral (173). En models experimentals de rata on no hi ha infecció per l'HIV-1, ha estat molt complicat induir depleció del mtDNA i lipodistròfia, tot i utilitzar altes dosis d'antiretrovirals (174), suggerint que els esdeveniments vinculats a la infecció de

l'HIV-1 contribueixen en una part important a la manifestació del fenomen de depleció del mtDNA.

Finalment, en un estudi recent s'ha descrit depleció del mtDNA en el teixit adipós d'un model experimental de ratolí en el que s'ha produït una disrupció específica del receptor nuclear relacionat amb els estrògens ($ERR\alpha$, de l'anglès *estrogen-related receptor- α*). Aquest receptor sembla jugar un paper essencial en el control de l'expressió de gens nuclears involucrats en la biogènesi mitocondrial; d'entre aquests hi són inclosos aquells que estan relacionats amb la maquinària de replicació del mtDNA. Els ratolins deficients per $ERR\alpha$ mostren una disminució en l'abundància de teixit adipós blanc, una acumulació anormal de teixit adipós marró i resistència a l'obesitat induïda per una dieta elevada en greixos (175). Tot i que no hi ha dades referents al teixit adipós blanc, el teixit adipós marró d'aquests animals presenta també una reducció significativa de la quantitat de mtDNA i dels transcrits codificats per aquest (176).

En resum, en les últimes dècades s'ha evidenciat el destacat paper que els canvis quantitius del mtDNA juga en el desenvolupament i funció dels teixits adiposos, i la rellevància que té en patologies humanes com l'obesitat i la lipodistrofia. Val a dir que fins al moment de l'escriptura de la present Tesi no existia cap estudi sistemàtic de la bibliografia que agrupés de forma comprensiva el conjunt de dades existents sobre les alteracions en el teixit adipós associades a canvis del mtDNA, com s'ha resumit anteriorment. Ha estat una primera aportació d'aquesta Tesi el treball bibliogràfic publicat en forma de revisió que es mostra a continuació.

Mitochondrial DNA, an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology

Revista: Obesity (Silver Spring). 2009, 17:1814-20.

PMID: 19461585

El DNA mitocondrial, un actor prometedor en la patofisiologia del teixit adipós blanc

El DNA mitocondrial (mtDNA) constitueix un sistema genètic diferent en cèl·lules de mamífer, incloent-hi els adipòcits, que juga un paper crucial en la maquinària bioenergètica de la cèl·lula. El paper del mtDNA en el teixit adipós ha estat tradicionalment marginat ja que la importància de la funció mitocondrial en l'adipòcit blanc ha estat recentment valorada. Durant els últims anys s'han acumulat evidències que han destacat el paper que del mtDNA juga en el desenvolupament i la funció del teixit adipós blanc. Aquesta revisió se centra en proporcionar un resum del coneixement que tenim actualment sobre la biologia de del mtDNA i la seva rellevància en les patologies humanes, com l'obesitat i la lipodistròfia, que estan relacionades amb el balanç energètic. S'ha observat que algunes mutacions patogèniques al mtDNA provoquen lipomatosi, i varis estudis indiquen que existeixen polimorfismes del mtDNA que podrien estar relacionats amb canvis en l'índex de massa corporal. La depleció del mtDNA en els dipòsits d'adipós està associada amb complexes alteracions del teixit, que van des de lipoatròfia fins a obesitat visceral. Aquesta relació ha estat ben demostrada en pacients infectats per l'HIV-1 tractats amb antiretrovirals que presenten lipodistròfia, en estudis genètics amb bessons, i en models animals de depleció del mtDNA. Malgrat tot, la mecanística que connecta una alterada funció del mtDNA amb la biologia del teixit adipós blanc és complexa, i encara som lluny d'un coneixement precís del procés. Sembla ser que els efectes llinars, tant específics de teixit com diferencials entre individus, són els responsables de la variabilitat de les conseqüències patològiques observades quan la funció del mtDNA està disminuïda. Encara més, els canvis en la funció del mtDNA podrien provocar subtils canvis en les propietats secretores de l'adipòcit blanc i, d'aquesta manera, estar afectant el metabolisme sistèmic, fins i tot en absència d'efectes substancials sobre el metabolisme energètic de la cèl·lula adiposa.

Objectius

Objectius

Aquesta Tesi ha tingut com a **objectiu global** aprofundir en el coneixement del paper que canvis en els nivells de mtDNA tenen sobre diversos processos fisiopatològics emprant models experimentals cel·lulars i animals, i directament en pacients.

Un primer bloc tingué com a objectiu establir els **mecanismes pels quals la depleció de mtDNA deguda a deficiència de TK2 afecta la funció cel·lular, mitjançant l'estudi de cèl·lules en cultiu i biòpsies de pacients**. En un segon apartat es desenvolupà un **model cel·lular d'interferència de TK2** amb aquest mateix objectiu global.

El segon bloc de la Tesi es centrà en l'estudi de **l'efecte de la depleció de mtDNA sobre la fisiopatologia del teixit adipós**, en relació a la lipodistròfia de pacients HIV-1 tractats, que tradicionalment s'associa amb toxicitat mitocondrial. Els objectius foren:

- establir la existència de **depleció del mtDNA i les alteracions en la biologia adipocitària en ratolins *knock-in* per TK2**
- analitzar, **en un model de ratolí transgènic per HIV-1, si les alteracions adipocitàries s'associen a depleció de mtDNA.**

Finalment, es presenta un estudi en pacients HIV-1 tractats on s'investigà la **relació entre tractament antiretroviral amb inhibidors de proteasa, depleció de mtDNA i apoptosi**.

**Informe dels codirectors en relació a la Tesi Doctoral
de Joan Villarroya i Terrade (publicacions i paper del
doctorand)**

Informe dels codirectors en relació a la Tesi Doctoral de Joan Villarroya i Terrade (publicacions i paper del doctorand)

En tant que directors de la Tesi doctoral de Joan Villarroya i Terrade, fem constar que, a la memòria de la Tesi, els resultats obtinguts s'estructuren en sis articles científics.

Articles científics que formen part de la Tesi

Dels dos articles:

Villarroya J, de Bolós C, Meseguer A, Hirano M, Vilà MR. *Altered gene transcription profiles in fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations indicate compensatory mechanisms*. Exp Cell Res. 2009 May 1;315(8):1429-38

Villarroya J, Lara MC, Garrido M, García-Arumí E, Meseguer A, Hirano M, Vilà MR. *An in vitro model of mitochondrial DNA depletion by down-regulation of thymidine kinase 2 expression*. Exp Cell Res (Submitted)

El primer ja ha estat publicat a la revista Exp Cell Res, i el segon es troba sotmès a aquesta mateixa revista. Aquesta revista té un factor d'impacte, segons l'ISI, de 3.95, essent en el segon quartil de les àrees de Cell Biology i Oncology.

El doctorand, primer autor d'aquestes dues publicacions, ha tingut tot el protagonisme en la obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels experiments, i ha participat amb gran protagonisme en la discussió dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el de investigadors sènior que han participat fonamentalment en els aspectes intel·lectuals, d'elaboració i contextualització de les dades.

Un tercer article:

Vilà MR, **Villarroya J**, García-Arumí E, Castellote A, Meseguer A, Hirano M, Roig M. *Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency*. J Neurol Sci. 2008 Apr;267(1-2):137-41

Ha estat ja publicat a la revista J Neurol Sci, amb factor d'impacte 2.52 i en el segon quartil dins l'àrea Clinical Neurology. El doctorand, segon autor de la publicació, ha realitzat i analitzat els estudis experimentals de immunohistoquímica i anàlisi morfològica del teixit muscular del pacient, en directa col·laboració experimental i intel·lectual amb la codirectora de la Tesi i primera autora.

El quart treball:

Miró O, **Villarroya J**, Garrabou G, López S, Rodríguez de la Concepción M, Pedrol E, Martínez E, Giralt M, Gatell JM, Cardellach F, Casademont J, Villarroya F. *In vivo effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrially driven apoptosis*. Antiviral Therapy. 2005 Oct;10(8):945-51

Fou publicat a la revista Antiviral Therapy, amb un factor d'impacte de 4.02, i en el primer quartil de les àrees de Pharmacology & Pharmacy, i de Infectious Diseases.

Aquest treball, fruit d'un projecte de col·laboració amb l'equip dirigit pel Dr. O. Miró de l'Hospital Clínic de Barcelona, té com a primer autor al propi Dr. Miró i com a segon autor al doctorand, que realitzà els estudis experimentals d'apoptosi en relació a nivells de DNA mitocondrial, aspecte clau del treball.

El cinquè article:

Villarroya J, Diaz-Delfin J, Hyink D, Domingo P, Giralt M, Klotman PE, Villarroya F. *HIV-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: towards a rodent model of HIV-1 lipodystrophy*. Antiviral Therapy 2010 (Accepted)

Ha estat acceptat recentment així mateix a la revista *Antiviral Therapy*, com s'ha esmentat amb un factor d'impacte de 4.02, i en el primer quartil de les àrees de *Pharmacology & Pharmacy*, i de *Infectious Diseases*.

En aquest article, el doctorand ha realitzat les tasques d'obtenció de mostres de teixit adipós, anàlisi de nivells de mtDNA, expressió gènica mitocondrial i d'altres paràmetres adipocitaris. Ha estat així mateix el responsable de totes les tasques de coordinació amb el laboratori de l'Hospital Mount Sinai (New York, USA) que han fet possible aquest treball, així com de l'elaboració intel·lectual de l'estudi. Els coautors són investigadors de la UB que han participat en tasques analítiques de citocines al teixit adipós, investigadors sènior de la UB i de l'Hospital Mount Sinai, implicats en la direcció del projecte, i investigadors de l'Hospital Mount Sinai implicats en les tasques de desenvolupament del model de ratolins transgènics emprat.

El sisè article:

Villarroya J, Dorado B, García-Arumí E, Vilà MR, Giralt M, Hirano M, Villarroya F. *Effects of thymidine kinase 2 loss-of-function and mitochondrial DNA depletion on brown adipose tissue development in mice*. *Int J Obesity* (Submitted)

Ha estat sotmès a la revista *Int J Obesity*. És la revista oficial de la *International Association for Studies on Obesity* (IASO), i té un factor d'impacte de 3.64, essent en el primer quartil de l'àrea de nutrició. És una revista de referència internacional en el marc dels estudis sobre fisiopatologia del teixit adipós. El doctorand ha realitzat les tasques experimentals de pràcticament tot l'estudi i, com en el cas anterior, ha estat el responsable de totes les tasques de coordinació amb el laboratori de la Universitat de Columbia (New York, USA) que han fet possible aquest treball, així com de l'elaboració intel·lectual de l'estudi. Els coautors són investigadors sènior de la UB i de la Universitat de Columbia, implicats en la direcció del projecte, i investigadors de la Universitat de Columbia implicats en les tasques de desenvolupament del model de ratolins transgènics emprat.

El setè article:

Villarroya J, Giralt M, Villarroya F. *Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology*. Obesity (Silver Spring). 2009, 17:1814-20

Ha estat publicat a la revista Obesity. És la revista oficial de la *National Association for Studies on Obesity* (NASO) dels Estats Units. Té un factor d'impacte de 2.76, essent en el primer quartil de l'àrea de nutrició. Aquest és un article de revisió en que el doctorand va donar forma d'article publicable a bona part de la tasca de revisió bibliogràfica realitzada a la Introducció de la Tesi, en ser conscients de la manca a la bibliografia d'una revisió focalitzada en la relació entre el DNA mitocondrial i el teixit adipós. Els coautors són investigadors sènior de la UB que van supervisar aquesta tasca.

Apèndix

En darrer lloc cal esmentar que de forma col·lateral al desenvolupament dels aspectes centrals de la Tesi, Joan Villarroya ha participat en dos treballs de col·laboració relacionats i que han donat lloc a dos articles que es presenten en forma d'apèndix.

Pedraza N, Rosell M, **Villarroya J**, Iglesias R, González FJ, Solanes G, Villarroya F. *Developmental and tissue-specific involvement of PPAR α in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression*. Endocrinology. 2006 Oct;147(10):4695-704

En aquest treball, Joan Villarroya va realitzar els estudis de canvis en el patró de metabòlits circulants en els models estudiats. La revista Endocrinology és de primer nivell internacional, és publicada per la *Endocrine Society* dels EEUU, i té un factor d'impacte de 4.95.

Peraire J, Miró O, Saumoy M, Domingo P, Pedrol E, Villarroya F, Martínez E, López-Dupla M, Garrabou G, Sambeat MA, Deig E, **Villarroya J**, Rodriguez-Chacón M, López S, Fontanet A, Holmstrom M, Giralt M, Gatell JM, Vidal F. *HIV-1-infected long-term non-progressors have milder mitochondrial impairment and lower mitochondrially-driven apoptosis in peripheral blood mononuclear cells than typical progressors*. Current HIV Research. 2007 Sep;5(5):467-73

En aquest treball de col·laboració amb l'equip del Dr. Francesc Vidal de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona, Joan Villarroya realitzà les anàlisis de marcadors d'apoptosi d'origen mitocondrial i general.

La revista Curr HIV Res té un factor d'impacte de 2.71. Val a dir que aquest treball rebé el Premi Dr. Ferran i Clua, de la Fundació Doctor Ferran en la convocatòria del 2007.

A Barcelona, el 8 de febrer del 2010

Signat:

Francesc Villarroya i Gombau
Codirector

Maya Vilà i Iglesias
Codirectora

Resum global i discussió general

Selecció de miofibres de tipus I en un pacient amb una encefalomiopatia de progressió lenta per depleció del mtDNA .

En la present Tesi s'ha reportat la progressió d'alteracions mitocondrials presents en el múscul esquelètic d'un pacient amb la forma miopàtica de la MDS deguda a mutacions en TK2 però amb una progressió inusualment lenta de la malaltia i una supervivència atípicament perllongada del individu. La última biòpsia del pacient mostrà una depleció del mtDNA molt pronunciada malgrat l'activitat de la cadena respiratòria i l'expressió de proteïnes codificades pel mtDNA eren aparentment normals. S'analitzaren les característiques moleculars i histològiques d'aquesta lleu manifestació de la MDS, ja descrita en altres pacients (75, 177-178), a biòpsies d'entre 2 i 12 anys d'edat.

La morfologia del múscul esquelètic als 2 anys d'edat presentava unes característiques molt similars a aquelles descrites en infants amb una MDS miopàtica típica, probablement perquè les edats i l'estadi de la patologia són comparables. Posteriorment, als 5 anys, s'observà que la necrosi i la infiltració de lípids en el múscul era menys prominent que anteriorment i en l'última biòpsia als 12 anys d'edat, les fibres musculars restants presentaven un aspecte normal, gairebé sense fibrosi endomisial. En aquest treball es demostra per primer cop la coexistència d'una pèrdua de massa muscular progressiva, principalment formada per fibres de tipus II, acompanyada d'una millora de la funció mitocondrial a les fibres musculars de tipus I restants.

La llarga longevitat d'aquest pacient de MDS podria explicar-se per una deficiència més moderada de l'enzim TK2, respecte altres casos de progressió més típica. La caracterització bioquímica individual de les dues formes mutants (T77M i R161K) de la proteïna TK2 mostrà una disminució dràstica de l'activitat catalítica. Podria ésser que l'enzim heterodimèric tingués una activitat més elevada que els homodímers, però en analitzar l'activitat TK2 en fibroblasts del pacient s'observà una deficiència gairebé total (179). Per altra banda, podria haver-hi mecanismes moleculars adaptatius que s'activessin per a compensar la manca de mtDNA com s'ha observat en un altre pacient de MDS miopàtica, que suggeria que un augment en la regulació de la transcripció i el

contingut de mtDNA en les miofibres supervivents podria millorar el fenotip clínic del pacient (75, 177).

La discordança que observem entre poca quantitat de mtDNA i quantitat normal de transcrits codificats pel mtDNA, proteïnes i activitat dels enzims de la cadena respiratòria ha estat descrita en diferents models i pacients. En un pacient de MDS per deficiència de TK2, es mesurà la quantitat mínima de molècules de mtDNA *wild-type* necessàries per mantenir l'activitat de la citocrom oxidasa (COX) a múscul esquelètic i es mostrà un mosaic variable de tinció COX. Durham et al. postulen que tot i la severa depleció de mtDNA, podria existir algun tipus de compensació a nivell transcripcional o post-transcripcional, o una complementació funcional per part de subunitats de la cadena respiratòria sintetitzades en segments adjacents de la mateixa fibra muscular amb un major nombre de còpies de mtDNA (71).

Probablement existeixen mecanismes moleculars compensatoris en la varietat de situacions fisiopatològiques on hi ha depleció del mtDNA, com per exemple pacients HIV-1 asimptomàtics tractats amb estavudina i didanosina, on les cèl·lules mononucleades de la circulació perifèrica (PBMCs) presenten depleció del mtDNA combinada amb nivells normals d'activitat citocrom oxidasa i d'expressió de COII (180). No obstant, més factors han d'estar implicats en la selecció de subpoblacions de fibres musculars en miopaties com la descrita en el present document. Així doncs, s'establiren cultius de fibroblasts del pacient estudiat per a analitzar-ne aquests putatius mecanismes moleculars.

El patró d'expressió gènica en fibroblasts deficients en TK2 i dGK indica mecanismes compensatoris

El manteniment del mtDNA està regulat per una xarxa homeostàtica complexa que inclou varis components del replisoma del mtDNA, i un ventall d'enzims i transportadors que subministren equilibradament a la mitocondria precursors dels desoxiribonucleòtids, i això fa que alteracions d'aquests factors puguin causar depleció del mtDNA. Actualment hi ha descrits 8 gens, mutacions en els quals són responsables de la MDS (61-62, 76, 181-184), i en el present treball s'ha analitzat les possibles interrelacions de les quinases mitocondrials TK2 i dGK amb d'altres components d'aquesta xarxa de proteïnes altament regulades.

Fibroblasts derivats de pacients deficients en TK2 i dGK mostren diferències pel què fa a l'abundància de mtDNA: els fibroblasts dGK⁻ en quiescència presenten depleció del mtDNA, mentre que els TK2⁻ mantenen nivells normals de mtDNA. Les vies metabòliques responsables d'aportar dTTP a la mitocondria en cèl·lules en cultiu han estat caracteritzades (185), i es coneix que, en cèl·lules en divisió, la ribonucleòtid reductasa R1/R2 i, en menys mesura, la TK1 són les principals fonts d'aportació d'aquest nucleòtid. El dTMP entra a la mitocondria (186) a través d'algun transportador no descrit i és fosforilat per les quinases mitocondrials fins a esdevenir dTTP, però quan les cèl·lules estan en estat de quiescència, el dTMP és sintetitzat per la ribonucleòtid reductasa R1/p53R2 al citosol (187), i pel salvament o "reciclatge" de la timidina catalitzat per TK2, dins la matriu mitocondrial (188). Malgrat que la MIM és impermeable als nucleòtids, els *pools* de dNTPs citosòlic i mitocondrial es comuniquen molt ràpidament i per tant, és clau la correcta regulació dels transportadors específics.

En el present estudi hem pogut observar diferències significatives pel què fa a l'expressió del transportador equilibratiu hENT1 entre els fibroblasts TK2⁻ i dGK⁻. hENT1 transporta un ampli espectre de nucleòsids i nucleòtids purínics i pirimidínics, és present a gairebé tots els teixits (189) i està localitzat tant a membranes mitocondrials com a membrana plasmàtica (190-191). D'acord amb els nostres resultats podem hipotetitzar que hENT1 juga un paper important en el manteniment del mtDNA en els fibroblasts TK2⁻ ja que, tant els nivells de transcrit com de proteïna diferien entre les dues línies, essent significativament reprimits en els fibroblasts dGK⁻ quiescents. La disminució de hENT1 en el context d'una mancança d'activitat dGK⁻ podria ser responsable del fenotip de depleció del mtDNA observat en les cèl·lules deficients en dGK⁻. El fet que el silenciament de hENT1 en les cèl·lules TK2⁻ quiescents indueixi depleció del mtDNA i l'absència de canvis en els *pools* de dTTP mitocondrial i citosòlic en aquest model (192) evidencien la importància clau que té hENT1 en la preservació del mtDNA, i demostren que existeix una diferència remarcable entre els dos *backgrounds* genètics.

Altres gens d'aquesta ruta metabòlica també es veuen alterats si comparem els fibroblasts TK2⁻ i dGK⁻. Hem observat un repressió en l'expressió del mRNA de la timidilat sintasa (TS), que catalitza la conversió de dUMP a dTMP en la via *de novo* de síntesi de nucleòtids de pirimidina. S'ha demostrat recentment que existeix una via *de novo* activa en fibroblasts quiescents responsable de subministrar desoxiribonucleòtids per a la reparació del DNA nuclear i la síntesi de mtDNA, i que una activitat baixa de la

ribonucleòtid reductasa R1/p53R2 es correlaciona amb una també baixa activitat de la TS (187, 193). Probablement, en el nostre model, la síntesi de dTMP s'estaria donant principalment a través de la ribonucleòtid reductasa R1/p53R2 i així, la síntesi *de novo* de dTTP junt amb l'elevada expressió de hENT1 podria estar compensant la deficiència de TK2 a l'hora de mantenir un nombre de còpies normal de mtDNA. Els transcrits de TFAM i Pol γ , disminuïts en les cèl·lules dGK⁻ respecte les TK2⁻, estarien confirmant la reducció del mtDNA ja que, com ja s'ha esmentat en la present Tesi, TFAM s'associa fortament a la quantitat de mtDNA, i l'absència de mtDNA podria estar reprimint-ne la transcripció. A més a més, s'observa disminuïda l'expressió de la Pol γ . En tot cas estaríem parlant, més probablement, d'efectes secundaris a la depleció del mtDNA i no explicatius de la diferència existent entre mecanismes compensadors. Per a aprofundir més sobre aquests canvis en l'expressió gènica vam establir un model cel·lular de depleció del mtDNA.

Model *in vitro* de depleció del mtDNA per silenciament de TK2 en cèl·lules TK1⁻

Per a respondre al plausible emmascarament del fenotip de depleció del mtDNA per part de l'activitat TK1 present en els fibroblasts, es va generar una línia cel·lular estable amb TK2 interferida sobre un *background* de TK1 disfuncional (Ost TK1⁻/TK2⁻), el què creiem que és el primer model cel·lular de depleció del mtDNA per deficiència de TK2.

La depleció del mtDNA observada en el model de cèl·lules Ost TK1⁻/TK2⁻ es dona en absència d'un desequilibri en el *pool* de nucleòtids, fet que és complicat d'explicar. En cèl·lules no proliferatives el petit *pool* de dTTP depèn de les activitats de la ribonucleòtid reductasa R1/p53R2 i de TK2 (188). És possible, que en aquest model, els canvis en el *pool* de dNTPs i la subseqüent inducció de depleció del mtDNA foren processos primerencs, quan les cèl·lules estaven en confluència i que, en mesurar els *pools* de dNTPs citosòlic i mitocondrial a post-confluència, aquest s'haguessin equilibrat novament als nivells basals.

A nivell d'expressió gènica, les cèl·lules Ost TK1⁻/TK2⁻ presentaven un augment en l'expressió de proteïnes i transcrits codificats pel mtDNA acompanyat d'un augment de l'activitat citocrom oxidasa, similars als efectes reportats en el pacient de MDS presentat en aquest document, i que resulta ser una resposta mitocondrial a la disminució del mtDNA observada en molts casos i models diferents, que indicaria un cop més un intent de compensació funcional. Paral·lelament, s'observà una disminució en els mRNAs de

hENT1, Pol γ , TFAM i timidina fosforilasa (TP), respecte les cèl·lules control, de forma similar al patró observat als fibroblasts TK2⁻ respecte els dGK⁻. Aquests resultats suggereixen un cop més el important paper que podria estar jugant el transportador hENT1 en el manteniment del mtDNA i es confirma l'associació de TFAM i Pol γ amb els nivells de mtDNA. La TP catabolitza la timidina citoplasmàtica, restringint així la disponibilitat de timidina per ser fosforilada posteriorment per la TK2 a la mitocòndria. En aquest model cel·lular, la previsible acumulació de timidina citoplasmàtica que es donaria en absència de TP no podria ser incorporada a la matriu mitocondrial per l'absència de hENT1, ni fosforilada per la TK2, resultant així en última instància en la depleció del mtDNA observada.

La deficiència de TK2 provoca depleció del mtDNA en BAT de ratolí sense comprometre totalment la funció adipocitària

La introducció, mitjançant manipulació genètica, de la mutació H126N en el gen TK2 i la subseqüent eliminació funcional de l'enzim provoca alteracions neuromusculars en el ratolí reminiscents de la MDS per deficiència de TK2 (veure més endavant). Donada la sospita d'un paper important de la depleció del mtDNA en la lipodistròfia en pacients HIV-1, ens platejarem aprofitar aquest model per a l'estudi de les alteracions que es donen en el teixit adipós. Donada la mortalitat dels ratolins en etapes tempranes del seu desenvolupament i el desenvolupament tardà del teixit adipós blanc en aquestes espècies, l'estudi es restringí al BAT.

La mutació H126N en el gen TK2 provocà una severa depleció del mtDNA en el BAT que progressà durant el seu desenvolupament. El rang de depleció fou de l'ordre dels teixits més afectats descrits prèviament. Aquesta disminució progressiva del mtDNA a BAT succeïa en paral·lel amb una forta inducció post-natal de l'expressió de TK2 en els ratolins *wild-type* a mesura que el teixit passa de ser més proliferatiu a adquirir les característiques d'un teixit diferenciat, on la replicació del mtDNA esdevindria altament dependent de l'activitat TK2, com succeeix a tots els teixits post-mitòtics.

La depleció del mtDNA en BAT donà lloc a una reducció significativa dels transcrits codificats pel mtDNA sense alterar els transcrits codificats pel DNA nuclear, components de la funció respiratòria. En estudiar l'afectació a nivell de mtDNA, mRNA codificat pel mtDNA, proteïna representativa i activitat respiratòria s'observà que a cada pas es perdia

una mica la intensitat de les alteracions, essent la depleció del mtDNA l'alteració més pronunciada seguida del mRNA, proteïna, per donar lloc finalment a una moderada reducció de l'activitat del complex IV del sistema OXPHOS. Tot i la no alteració general de proteïnes mitocondrials codificades pel DNA nuclear, TFAM es trobava fortament reduïda, malgrat presentava nivells normals de mRNA. Aquest efecte indirecte per la correlació entre TFAM i el mtDNA que estan fortament associats sembla lògic en aquest contexte, on l'absència de mtDNA provocaria que la proteïna TFAM sintetitzada es degradés al no poder empaquetar el mtDNA (44, 194).

L'anàlisi bioquímic i microscòpic dels animals ens mostrà que no existien alteracions generalitzades en el BAT associades a la depleció del mtDNA. Analitzant les imatges de TEM no s'observaven diferències en la morfologia dels adipòcits ni en l'abundància de gotes lipídiques, mentre que sí s'observà una anòmala distribució i morfologia de les mitocòndries en el BAT dels ratolins TK2^{-/-}, formant cúmuls aberrants altament constrenyits en l'espai citoplasmàtic. Aquestes estructures recorden molt a les *ragged-red fibers* observades en el múscul esquelètic de pacients amb depleció del mtDNA hereditària (195), i també a pacients HIV-1 amb lipodistròfia on es dona aquesta proliferació mitocondrial aberrant (158-159, 169). La preservació de l'activitat oxidativa amb les alteracions morfològiques observades en el BAT del ratolí TK2^{-/-} haurà de ser analitzat amb detall.

La repercussió de la depleció del mtDNA en la funció específica del teixit adipós fou explorada i en general, no s'identificaren alteracions ni a nivell transcripcional ni pel què fa a paràmetres circulants relacionats (adipoquines d'origen adipós com la adiponectina). Només els gens específicament vinculats a la funció termogènica del BAT es trobaven disminuïts en la seva expressió, probablement per la dràstica afectació del sistema nerviós en aquest model (196) i la conseqüent alteració del control, per part del sistema nerviós simpàtic, de la funció termogènica en el BAT (10).

Així doncs, hem pogut determinar que nivells molt baixos de mtDNA són compatibles amb una funció gairebé normal del BAT i que d'alguna manera el mtDNA remanent s'expressa més eficientment mantenint la funció mitocondrial força preservada. Malgrat no podem extrapolar directament, aquestes dades suggereixen que la depleció del mtDNA no es tractaria del principal factor que determina les alteracions que presenten els pacients HIV-1 amb lipodistròfia al teixit adipós on probablement, el mateix virus hi

estigui jugant un paper important. Per tal d'establir el paper que les proteïnes del l'HIV-1 juguen a l'hora de provocar aquestes alteracions varem emprar un model de ratolí portador d'un transgen HIV-1.

Les alteracions en el teixit adipós de pacients HALS són reproduïbles en un model animal HIV-1 que no presenta depleció del mtDNA

Les alteracions observades en el teixit adipós de ratolins que expressen el transgen HIV-1 (Tg26+/-) es donen en absència de depleció del mtDNA o disfunció en l'expressió d'aquest. Aquestes dades concorden amb la idea actual que la toxicitat mitocondrial existent en els pacients HALS està associada principalment amb el tractament antiretroviral (197) i que no seria l'únic factor explicatiu de la lipodistròfia.

Així doncs, les alteracions observades en aquest model segueixen un patró molt similar als canvis observats en pacients HALS amb baixos nivells d'adiponectina en plasma i elevada presència de citokines proinflamàtores circulants (198), i baixos nivells de glucosa i insulina, indicatius de una hipersensibilitat insulinèmica que és característica de les alteracions primerenques que trobem a individus HIV-1 no tractats (naïf) (199). Altres característiques presents en pacients HALS i naïf que també mimetitza el ratolí Tg26+/- són una reducció en l'expressió de PPAR γ i gens diana d'aquest (com GLUT4 i el gen de l'adiponectina) (156), junt amb la sobreexpressió de citokines proinflamàtores (MCP-1, IL-6) en el teixit adipós subcutani (scWAT) (108, 156, 200-201).

En els ratolins Tg26+/-, la disminució preferent del teixit adipós visceral (vsWAT) respecte el scWAT contrasta amb la hiperadipositat visceral en HALS. Aquestes diferències de comportament entre els dipòsits de WAT, típicament descrites a HALS (197), s'associen amb la inducció de TNF α i IL-6 a vsWAT i scWAT, respectivament, que no són explicables, en el nostre model, per diferències en la presència del transgen als diferents dipòsits. Fins a quin punt aquestes diferències en l'expressió gènica entre dipòsits de WAT són comparables a pacients no es fàcil de saber, ja que pràcticament no existeixen estudis de teixit adipós visceral en pacients HALS, i encara menys en naïf.

Globalment, aquest model animal ens mostra l'impacte que tenen les proteïnes de l'HIV-1 sobre l'expressió gènica del teixit adipós, en absència de fàrmacs antiretrovirals, i

resulta molt consistent amb el què es coneix en pacient HALS i sobretot en els primers insults que causa el virus abans del tractament HAART. Per tot això, el ratolí Tg26+/- sembla un bon model per a elucidar els mecanismes fisiopatològics que actuen en la HALS.

EL tractament de la HALS amb PIs millora l'efecte nociu de l'apoptosi sense augmentar el mtDNA

La infecció de l'HIV-1 està associada amb un augment de l'apoptosi d'origen mitocondrial i una disminució del nombre de còpies de mtDNA a PBMCs.

En aquest estudi *in vivo* es confirmà que una teràpia HAART basada en PIs reduïa l'activació intrínseca de l'apoptosi sense alterar els nivells de Bcl2 però disminuint significativament els nivells de caspasa-9. Aquests efectes beneficiosos es donen de la mateixa manera en pacients amb el mtDNA més preservat i en d'altres amb una depleció més severa. De fet, estudis *in vitro* suggereixen que la modulació de l'apoptosi per la via mitocondrial no depèn de l'abundància o integritat del mtDNA ja que depèn més aviat del manteniment o disrupció del potencial de membrana mitocondrial (57, 202)

El nostre estudi confirma que la apoptosi d'origen mitocondrial i la depleció del mtDNA són dues alteracions relacionades amb la mitocòndria que poden funcionar de manera independent i l'elecció d'uns o altres tipus de fàrmacs antiretrovirals pot afectar més un paràmetre o l'altre de manera força independent.

Discussió general

La funció mitocondrial, tradicionalment entesa com el procés d'obtenció d'energia en forma d'ATP a partir de glucosa, piruvat i/o NADH, ha esdevingut una entitat molt més complexa els darrers anys. Això ha fet que entenem la mitocòndria com un òrganul regulador de molts processos biològics, i per tant, que s'hagi relacionat la seva funció amb un bon nombre de patologies, algunes d'elles altament esteses. La mitocòndria és un important regulador de la homeòstasi del calci intracel·lular, important per a la regulació de moltes reaccions que es donen en els processos de transducció de senyals. Una altra funció ben estudiada és l'activitat termogènica que es dona en el teixit adipós marró com a resposta a estímuls fisiològics, on mitjançant el desacoblament de la cadena respiratòria

es produeix calor. D'altres funcions importants són la regulació del potencial de membrana mitocondrial, la regulació de l'apoptosi, regulació de la proliferació i del metabolisme cel·lulars, i la síntesi d'algunes molècules, com algunes etapes de la síntesi del grup prostètic hemo i alguns esteroides.

La mitocòndria es un orgànul complex que consta de dos compartiments separats i molts components que li confereixen la capacitat per dur a terme tots aquests processos. Entre ells destaca la presència d'un petit genoma propi, que es regula independentment del genoma nuclear, i que està relacionat, de forma directa o indirecta, amb els processos esmentats i per tant, amb un elevat nombre de malalties, algunes d'elles de gran incidència i rellevància en la salut mundial, com són la síndrome de la immunodeficiència adquirida i els càncers, i d'altres més minoritàries, com són algunes malalties hereditàries que impliquen la funció mitocòndria.

L'apoptosi és el procés de mort programada pel qual es garanteix l'eliminació de les cèl·lules que estan danyades, i que no convé que es repliquin transmetent a la descendència les alteracions gèniques que hagin pogut acumular. Malgrat això, en algunes situacions patològiques, com la infecció per l'HIV-1, aquesta augmenta provocant danys importants en certs teixits. Concretament en PBMCs s'ha confirmat que la infecció per l'HIV-1 provoca una potenciació de l'apoptosi mediada per mitocòndria, i una depleció considerable del DNA mitocondrial. Com s'ha vist anteriorment, la teràpia HAART indicada per pacients d'HIV-1 junt amb la infecció *per se* sembla que estarien provocant depleció del mtDNA en la majoria de casos estudiats, però en analitzar l'apoptosi que actua per la via mitocondrial, hem pogut comprovar que els règims basats en PIs, i concretament amb nelfinavir, fan disminuir-la sense augmentar la quantitat de mtDNA. Així, la disminució de l'apoptosi fa augmentar la quantitat de limfòcits CD4⁺ i disminuir la càrrega viral en aquests individus respecte els pacients no tractats. Aquest descobriment ens posa de manifest que els efectes que tenen aquests fàrmacs sobre processos com l'apoptosi i la quantitat del mtDNA poden ser totalment independents.

Sabent que el bon manteniment del mtDNA es crític per a la funció respiratòria, i especialment en aquells teixits amb elevada demanda energètica, ja que aquest codifica per proteïnes dels complexos de la cadena respiratòria, la descripció de malalties genètiques associades a depleció del mtDNA i la poca esperança de vida del individus afectats ha posat de manifest en les últimes dècades el paper clau que juga aquest

component en el metabolisme energètic de tot l'organisme. Tot i així, la relació entre l'abundància de mtDNA i l'activitat de la cadena respiratòria/sistema OXPHOS no és directa i presenta una complexitat intrínseca poc coneguda encara.

L'estudi del cas d'un pacient amb la forma miopàtica de la Síndrome de Depleció del mtDNA per mutacions en el gen TK2 present en aquesta tesi, demostra la variabilitat en les repercussions fisiopatològiques que pot causar una depleció pronunciada del mtDNA, fent variar l'esperança de vida del individu des dels primers anys de vida, que són la majoria dels casos, fins a pacients que arriben a l'adolescència. S'ha observat en molts casos de depleció del mtDNA, tant d'origen genètic com farmacològic, com d'alguna manera, el sistema aconsegueix mantenir uns nivells de proteïnes de la cadena respiratòria codificades pel mtDNA compatibles amb la producció d'energia, malgrat el pobre manteniment del genoma mitocondrial. En el pacient estudiat també es va observar un fenomen interessant, que consistia en una disminució de la massa del múscul esquelètic, el teixit preferencialment afectat en aquesta patologia, acompanyat d'un augment de l'efectivitat de la funció mitocondrial en les fibres restants. Aquestes i d'altres evidències contribueixen inevitablement a fer-nos pensar en l'existència de mecanismes moleculars compensatoris, ja sigui a nivell transcripcional o post-transcripcional, que col·laborin a fer funcionar el sistema.

La regulació de la síntesi de mtDNA és un sistema complex que comprèn una maquinària enzimàtica que va des de la pròpia DNA-polimerasa γ fins als enzims responsables de la síntesi del substrat necessari per a que la replicació es pugui donar. Un bon nombre de deficiències hereditàries estan provocades per mutacions en aquests enzims que formen part del metabolisme dels nucleòtids. La via de salvament mitocondrial, crítica per a la replicació del mtDNA quan les cèl·lules no estan en divisió, inclou un grup de quinases, fosforilases i transportadors de membrana, entre les que hi ha TK2 i dGK, la funció de les quals és mantenir un equilibri entre els nucleòtids fosforilats adient per a la incorporació d'aquests a les cadenes de mtDNA de nova síntesi, durant el procés de replicació d'aquest. Així doncs, aquesta maquinària enzimàtica requereix d'una fina coordinació per a mantenir la homeòstasi del *pool* de nucleòtids mitocondrials. En analitzar comparativament l'expressió gènica d'aquests factors en cultius de fibroblasts de pacients de MDS per deficiència de TK2 i/o dGK vam observar una reduïda expressió del transportador hENT1, present a membrana mitocondrial interna, en els fibroblasts dGK⁻ respecte els TK2⁻ que podria ser un dels factors influents

en el fet que els cultius TK2⁻ no presentin el fenotip de depleció del mtDNA. Així doncs, donada la importància del transport de nucleòsids per a mantenir l'equilibri dels *pools*, aquest transportador d'ampli espectre (transporta nucleòsids de purina i pirimidina i també nucleobases) podria ser un dels factors responsables de què, en cèl·lules quiescents i en absència d'alguna quinasa crítica per al procés esmentat, es produeixi la depleció del mtDNA amb les conseqüències fisiopatològiques associades. Òbviament, segur que hi ha altres factors, com la isoforma citosòlica TK1 o el factor de transcripció TFAM, que també contribueixen a la depleció del mtDNA ja que també s'han vist alterats i es necessitaran més estudis per a poder inferir quines podrien ser, potencialment, les dianes terapèutiques a atacar que en algunes situacions actuen com a mecanisme compensatori per a mantenir un contingut de mtDNA compatible amb la funció respiratòria.

Les implicacions fisiològiques de la quantitat relativa de material genètic propi de la mitocòndria, i la repercussió que representen sobre les funcions mitocondrials, estan resultant ser elements de gran importància per a la comprensió de processos patològics que provenen de camps tan diferents com les encefalomiopaties d'origen genètic associades al DNA mitocondrial o bé les alteracions concomitants a la infecció i tractament del virus de l'HIV-1, entre d'altres. Alguns dels elements clau que segueixen sent fruit d'estudi per part de la comunitat científica són: (a) De quina manera alguns teixits de l'organisme són més sensibles a patir una disminució del contingut de mtDNA front a un estímul generalitzat, tant de naturalesa heretable com provocat per agents externs, present a tot l'organisme? (b) Quins elements determinen que alguns teixits o òrgans siguin capaços de compensar aquesta depleció del mtDNA, preservant així la seva funció inalterada, mentre que en altres existeixen alteracions de la funció mitocondrial amb les seves conseqüències fisiològiques? (c) Quins mecanismes moleculars connecten la disfunció mitocondrial associada a depleció del mtDNA amb una alteració de la funció, les característiques intrínseques i el desenvolupament dels teixits adiposos? Múltiples estudis de malalties genètiques associades al mtDNA en diferents teixits i òrgans han aportat evidències que recolzen la rellevància que tenen els efectes llinars que relacionen abundància alterada i funció del mtDNA amb disfuncions cel·lulars, i existeixen prou indicis que aquests efectes llinars podrien ser específics de teixit (71, 75, 177).

La síndrome de depleció del mtDNA, que pot estar originada per mutacions en diferents gens vinculats al manteniment del nombre de còpies del mtDNA, presenta molta heterogeneïtat simptomatològica referent al principal teixit que es troba afectat.

Actualment, encara no és senzill explicar la causa d'aquesta heterogeneïtat clínica. Malgrat això, existeixen evidències que explicarien l'especificitat tissular en funció del gen afectat atribuint-la a efectes lliardar en funció de l'expressió basal en condicions normals dels enzims implicats. Pel què fa a les formes miopàtica i hepatocerebral de la MDS, provocades per les mutacions en els gens TK2 i DGUOK, respectivament, s'ha postulat que l'expressió basal de TK2 en el múscul esquelètic és molt menor que en la resta de teixits, fet que provocaria que la deficiència funcional d'aquest enzim repercutís en primera instància sobre les fibres musculars del pacient en qüestió. Tenint en compte que les quinases TK2 i dGK s'expressen de forma ubiqua i, en la via de salvament mitocondrial dels nucleòtids, catalitzen la mateixa reacció, només diferint en l'especificitat dels substrats que fosforilen, aquest efecte lliardar dels nivells basals d'expressió podria explicar el fet que mutacions en l'un o l'altre afectin a teixits o òrgans diferents (177). Recentment, s'han generat dos models animals de depleció del mtDNA, per disrupció dirigida o *knock-in* de les formes mutants més prevalents, del gen TK2, un enzim clau responsable de subministrar desoxitimidina trifosfat per a la síntesi de mtDNA dins la mitocòndria (196, 203). En els dos models, els ratolins presentaven una pronunciada depleció del mtDNA en els teixits estudiats, incloent-hi el teixit adipós, i un fenotip neuromuscular reminiscent a la simptomatologia que presenten els pacients amb mutacions en la TK2. Els teixits adiposos presentaven una afectació important, i els ratolins presentaven signes de lipodistròfia, incloent-hi pèrdua de greix hipodèrmic i un teixit adipós marró alterat (203). Aquests models són de gran importància per a poder determinar *in vivo* l'especificitat tissular de malalties hereditàries mitocondrials, com la MDS, i a l'hora confereixen una eina molt poderosa per a elucidar els mecanismes moleculars que connecten la disminució de la quantitat de mtDNA amb les alteracions en la biologia del teixit adipós, podent aïllar el fenomen de la depleció del mtDNA de la presència del virus del HIV-1 i dels fàrmacs antiretrovirals, en el cas de les lipodistròfies associades a depleció del mtDNA.

Per altra banda, és de gran importància la determinació de quines interaccions a nivell molecular s'estan produint entre les proteïnes del virus de l'HIV-1 i la cèl·lula per tal de confirmar o desmentir si aquest, per si sol, ja està produint una disminució del nombre de còpies del mtDNA, com s'ha vist en alguns estudis (172). Existeix un model experimental de ratolí transgènic que sobreexpressa totes les proteïnes del virus HIV-1 (Vif, Vpr, Vpu, Env, Rev, Nef, Tat) menys aquelles que li permeten replicar-se i expandir-se dins l'organisme (Gag, Pol) (204). En l'anàlisi del teixit adipós blanc d'aquests ratolins

s'ha observat depleció del mtDNA acompanyada d'una expressió normal dels transcrits codificats per aquest. Paral·lelament s'ha observat una lleugera disminució de marcadors de la funció adipocitària com són PPAR γ i adiponectina. Aquests resultats confirmarien l'acció independent de la infecció del HIV-1 sobre l'abundància del mtDNA i la biologia del teixit adipós, per mecanismes encara desconeguts, i confereixen un marc conceptual en la patofisiologia de la lipodistròfia en pacients HIV-1 tractats amb antiretrovirals, on probablement tant les proteïnes víriques com els anàlegs de nucleòsids estiguin contribuint per diferents mecanismes d'acció a la generació de les alteracions tant de la funció mitocondrial com de la biologia i desenvolupament del teixit adipós, podent provocar efectes independents però simultanis en el temps, o fins i tot efectes sinèrgics que fins el moment no han estat possible descriure amb precisió.

La depleció del mtDNA afecta de forma diferent als teixits en funció de les característiques moleculars d'aquests, que determinen la seva funció i per tant també la seva dependència d'una funció mitocondrial ben preservada. En la majoria d'estudis on s'ha analitzat el contingut de mtDNA en pacients HIV-1 tractats amb antiretrovirals s'ha correlacionat la disminució de còpies del mtDNA amb una atròfia del teixit adipós subcutani. Altres símptomes de la lipodistròfia són la lipomatosi i la lipohipertròfia que es dona en el teixit adipós visceral, un dipòsit de teixit adipós localitzat al voltant d'alguns òrgans, que s'ha postulat que podria estar jugant un paper diferent del subcutani en el metabolisme energètic (205). Estudis en models animals han observat que els adipòcits del teixit adipós visceral presenten un major equipament mitocondrial i una major capacitat oxidativa respecte els adipòcits del subcutani (206). Recentment, la disponibilitat d'algunes biòpsies de teixit adipós visceral de pacients HIV-1 ens ha permès determinar que es produeix una reducció del mtDNA equivalent a l'observada en el dipòsit subcutani, tot i que les alteracions sobre la massa del teixit vagin en sentit oposat. Així doncs, sembla ser que podria tractar-se d'una reacció inflamatòria diferencial entre els dos dipòsits, ja que també s'ha descrit que els paràmetres basals relacionats amb la inflamació, com ara marcadors d'infiltració de macròfags, són diferents entre dipòsits de teixit adipós en humans (207).

Encara es desconeix quina quantitat de mtDNA és el llindar límit per sota del qual les funcions dels adipòcits no poden ser preservades. Algunes observacions suggereixen que les variacions en el contingut de mtDNA no només estan involucrades en la capacitat oxidativa intracel·lular dels adipòcits. Per exemple, les glitazones incrementen la quantitat

de mtDNA en els adipòcits, fet concomitant amb un increment en la diferenciació adipogènica i l'emmagatzematge de triglicèrids en el teixit adipós. En humans, l'abundància de mtDNA està associada amb la lipogènesi. Així doncs, l'impacte de les modificacions en el contingut de mtDNA dels adipòcits hauria de veure's no només com una efecte provocat per canvis en els processos bioenergètics mitocondrials i la síntesi cel·lular d'ATP donades per una funció del mtDNA alterada. En aquest context, en un estudi recent s'ha observat com lleugeres disminucions del contingut de mtDNA i de l'activitat de la cadena respiratòria en adipòcits 3T3-L1, provocades per la interferència de TFAM mitjançant iRNA, causaven una disfunció de la senyalització per insulina i del transport de la glucosa per mecanismes que són desconeguts (129). Per totes aquestes evidències, sembla ser que, mitjançant algun mecanisme, les alteracions en el contingut de mtDNA o l'expressió d'aquest en les mitocòndries de l'adipòcit podria estar influenciant l'expressió de gens nuclears a través d'una senyalització retrògrada (p.e. a través de senyalització intracel·lular mitjançant les espècies reactives de l'oxigen, o canvis en l'activitat AMP-quinasa), i així podria estar afectant de forma general la fisiologia de l'adipòcit. A més a més, l'efecte que podrien estar tenint les modificacions en el contingut de mtDNA o l'expressió de gens codificats pel mtDNA sobre la regulació de l'expressió de gens nuclears podria estar també relacionada amb la síntesi i secreció d'adipoquines, i així acabar per tenir conseqüències sistèmiques subjacents a la complexitat dels fenòmens fisiopatogènics.

Les alteracions que pugui estar provocant la depleció del mtDNA sobre la biologia cel·lular dels teixits no pot atribuir-se en tots els casos a una disminució en la síntesi de les proteïnes codificades pel mtDNA, ja que la quantitat d'aquestes proteïnes s'ha trobat inalterada en varis estudis, malgrat que els transcrits sí que solen veure's afectats. Aquest fet suggereix l'acció de mecanismes compensatoris en etapes de la síntesi de les proteïnes de codificació mitocondrial que no s'han tingut en prou en compte fins el moment. Així doncs, la maquinària de traducció mitocondrial podria estar optimitzant l'eficiència de síntesi de proteïnes a partir de menys quantitat de mRNA que en una situació normal. Una altra hipòtesi seria que, mitjançant algun mecanisme desconegut, els pocs transcrits mitocondrials que es sintetitzessin s'estabilitzessin més augmentant la seva vida mitjana i permetent així més rondes de traducció per a assolir una quantitat de proteïna compatible amb les funció oxidativa. Serà necessari en un futur pròxim aprofundir en els mecanismes d'expressió del mtDNA, sobretot pel què fa a la seva regulació postranscripcional i traduccional, per a identificar quins senyals estan intervenint i per

quins mecanismes moleculars, que fan compatible, en determinades situacions, diferents nivells de mtDNA amb el manteniment de la funció mitocondrial. A més a més de la rellevància científica *per se* d'aquests mecanismes, les possibilitats terapèutiques que comporten són decisives per a elaborar, ens els pròxims anys, noves aproximacions clíniques per a combatre les malalties que incideixen sobre l'homeòstasi de la funció mitocondrial.

Conclusions

Conclusions

Els treballs d'aquesta Tesi ens permeten arribar a una sèrie de conclusions sobre com la depleció del mtDNA afecta la biologia cel·lular i tissular en diferents models cel·lulars, animals i en pacients:

1. En múscul esquelètic es demostra que un pacient amb deficiència de TK2 pot mostrar una preservació moderada de la funció muscular compatible amb nivells elevats de depleció del mtDNA.

2. Els fibroblasts cultivats *in vitro* procedents de pacients deficients en TK2 no mostren depleció del mtDNA, a diferència de les procedents de pacients deficients en dGK. Això ens indica la presència de mecanismes adaptatius específics de la cèl·lula deficient en TK2 que s'evidencien per una alteració global de l'expressió gènica en la que destaca la inducció del transportador de nucleòsids hENT1.

3. En cèl·lules transformades deficients en TK1 es pot obtenir depleció del mtDNA en interferir TK2, i es desencadenen processos adaptatius com l'augment de la síntesi de proteïnes codificades pel mtDNA. Es confirma que l'expressió d'hENT1 i d'altres canvis en l'expressió gènica són crítics per al fenotip cel·lular de depleció, que no és explicable per un desequilibri del *pool* de nucleòtids.

4. Pel que fa al teixit adipós, potencial diana dels efectes de la depleció del mtDNA en la lipodistròfia HIV-1, s'observa una accentuada depleció del mtDNA durant les primeres setmanes de vida en ratolins transgènics amb pèrdua de funció de TK2. Aquesta disminució dels nivells de mtDNA en el teixit adipós marró s'associa a la preservació de les principals característiques del desenvolupament del teixit, tot i algunes alteracions moderades de la morfologia i funció mitocondrials.

5. El model de ratolins transgènics HIV-1 (Tg26) ens mostra, a més a més, que bona part de les alteracions característiques de la lipodistròfia associada a l'HIV-1 en el teixit adipós es poden reproduir en un model animal sense comportar canvis en els nivells i expressió del mtDNA.

6. En darrer lloc, esmentar que estudis en pacients HIV-1 ens mostren que el tractament amb inhibidors de proteasa pot donar lloc a efectes positius, com la reducció de l'apoptosi d'origen mitocondrial, sense això comportar una millora en el grau de depleció del mtDNA.

Com a conclusió global, podem afirmar que mecanismes homeostàtics cel·lulars poden compensar, en grau variable segons la cèl·lula o el teixit, diferents nivells de depleció del mtDNA. La identificació dels mecanismes compensatoris emprats per la cèl·lula de forma natural són encara poc coneguts i en els treballs que formen part d'aquesta Tesi se n'identifiquen alguns candidats. L'estudi d'aquests mecanismes és important ja que poden constituir potencials dianes d'intervenció terapèutica en el tractament de les patologies per depleció profunda del mtDNA.

Bibliografia

Bibliografia

1. Poyton RO, McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:563-607.
2. Mitchell P. The Ninth Sir Hans Krebs Lecture. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur J Biochem.* 1979 Mar 15;95(1):1-20.
3. Wallace. Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;51:612-21.
4. Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Montoya J. Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription. *Biol Chem.* 1999 Jul-Aug;380(7-8):737-47.
5. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Apr;29(2):109-19.
6. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Feb 9;1410(2):103-23.
7. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 1991 Apr;71(2):541-85.
8. Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, et al. Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Nov;283(5):E1040-5.
9. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):349-52.
10. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359.
11. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1:3-10.
12. Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol.* 1987 Oct;123(2):364-74.
13. Heerdt BG, Augenlicht LH. Changes in the number of mitochondrial genomes during human development. *Exp Cell Res.* 1990 Jan;186(1):54-9.
14. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 2004 Feb 15;18(4):357-68.

15. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(4):1354-66.
16. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Feb 15;91(4):1309-13.
17. Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* 1993 Mar;7(3):380-92.
18. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res.* 2004 Sep 17;95(6):568-78.
19. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, et al. ERRalpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Apr 27;101(17):6570-5.
20. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6472-7.
21. Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):13134-41.
22. Evans MJ, Scarpulla RC. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem.* 1989 Aug 25;264(24):14361-8.
23. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005 Jun;1(6):361-70.
24. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond).* 2005 Mar;29 Suppl 1:S5-9.
25. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, et al. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2003 Jul 1;373(Pt 1):155-65.
26. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related

transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1645-8.

27. White R, Morganstein D, Christian M, Seth A, Herzog B, Parker MG. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):39-45.

28. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005 Jun 3;121(5):671-4.

29. Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell.* 1983 Aug;34(1):151-9.

30. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:289-333.

31. Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature.* 1981 Apr 9;290(5806):465-70.

32. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, et al. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):615-25.

33. Fisher RP, Clayton DA. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol.* 1988 Aug;8(8):3496-509.

34. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(3):289-94.

35. McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(4):1116-25.

36. Prieto-Martin A, Montoya J, Martinez-Azorin F. A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *FEBS Lett.* 2001 Aug 10;503(1):51-5.

37. Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem.* 1992 Feb 15;267(5):3358-67.

38. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:409-35.

39. Cotney J, Shadel GS. Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA

methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *J Mol Evol.* 2006 Nov;63(5):707-17.

40. McCulloch V, Shadel GS. Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5816-24.

41. Rantanen A, Gaspari M, Falkenberg M, Gustafsson CM, Larsson NG. Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm Genome.* 2003 Jan;14(1):1-6.

42. Metodiev MD, Lesko N, Park CB, Camara Y, Shi Y, Wibom R, et al. Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):386-97.

43. Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta.* 1995 May 24;1271(1):127-34.

44. Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, et al. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 2003 Mar 15;31(6):1640-5.

45. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008;59:131-46.

46. Walberg MW, Clayton DA. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 1981 Oct 24;9(20):5411-21.

47. Doda JN, Wright CT, Clayton DA. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Oct;78(10):6116-20.

48. Brown TA, Clayton DA. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):2004-10.

49. Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, et al. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell.* 2002 Nov 15;111(4):495-505.

50. O'Brien TW. Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene.* 2002 Mar 6;286(1):73-9.

51. Rorbach J, Soleimanpour-Lichaei R, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. How do mammalian mitochondria synthesize proteins? *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1290-1.

52. Williams RS. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem*. 1986 Sep 15;261(26):12390-4.
53. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 1989 Oct 27;246(4929):500-3.
54. King MP, Attardi G. Mitochondria-mediated transformation of human rho(0) cells. *Methods Enzymol*. 1996;264:313-34.
55. Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ET. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1751-8.
56. Buchet K, Godinot C. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem*. 1998 Sep 4;273(36):22983-9.
57. Marchetti P, Susin SA, Decaudin D, Gamen S, Castedo M, Hirsch T, et al. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res*. 1996 May 1;56(9):2033-8.
58. Lee MS, Kim JY, Park SY. Resistance of rho(0) cells against apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1011:146-53.
59. Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. Mechanism of mitochondrial stress-induced resistance to apoptosis in mitochondrial DNA-depleted C2C12 myocytes. *Cell Death Differ*. 2005 Mar;12(3):266-78.
60. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, et al. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet*. 1991 Mar;48(3):492-501.
61. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet*. 2001 Nov;29(3):342-4.
62. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, et al. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet*. 2005 Jun;76(6):1081-6.
63. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):776-80.

64. Rampazzo C, Johansson M, Gallinaro L, Ferraro P, Hellman U, Karlsson A, et al. Mammalian 5'(3')-deoxyribonucleotidase, cDNA cloning, and overexpression of the enzyme in Escherichia coli and mammalian cells. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25;275(8):5409-15.
65. Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:349-74.
66. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*. 1999 Jan 29;283(5402):689-92.
67. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):4128-33.
68. Marti R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 28;303(1):14-8.
69. Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest*. 2003 Jun;111(12):1913-21.
70. Taanman JW, Bodnar AG, Cooper JM, Morris AA, Clayton PT, Leonard JV, et al. Molecular mechanisms in mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 1997 Jun;6(6):935-42.
71. Durham SE, Bonilla E, Samuels DC, DiMauro S, Chinnery PF. Mitochondrial DNA copy number threshold in mtDNA depletion myopathy. *Neurology*. 2005 Aug 9;65(3):453-5.
72. Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, et al. Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology*. 2002 Oct 22;59(8):1197-202.
73. Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol*. 2006 Aug;63(8):1122-6.
74. Tritchler HJ, Andretta F, Moraes CT, Bonilla E, Arnaudo E, Danon MJ, et al. Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology*. 1992 Jan;42(1):209-17.
75. Vilà MR, Segovia-Silvestre T, Gámez J, Marina A, Naini AB, Meseguer A, et al. Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1203-5.

76. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):337-41.
77. Mitsuya H, Yarchoan R, Broder S. Molecular targets for AIDS therapy. *Science.* 1990 Sep 28;249(4976):1533-44.
78. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985 Oct;82(20):7096-100.
79. Lim SE, Copeland WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):23616-23.
80. Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet.* 1991 Mar 2;337(8740):508-10.
81. Casademont J, Barrientos A, Grau JM, Pedrol E, Estivill X, Urbano-Márquez A, et al. The effect of zidovudine on skeletal muscle mtDNA in HIV-1 infected patients with mild or no muscle dysfunction. *Brain.* 1996 Aug;119 (Pt 4):1357-64.
82. Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med.* 1990 Apr 19;322(16):1098-105.
83. Grau JM, Masanes F, Pedrol E, Casademont J, Fernández-Solá J, Urbano-Márquez A. Human immunodeficiency virus type 1 infection and myopathy: clinical relevance of zidovudine therapy. *Ann Neurol.* 1993 Aug;34(2):206-11.
84. Masanes F, Pedrol E, Grau JM, Coll-Vinent B, Casademont J, Miró O, et al. Symptomatic myopathies in HIV-1 infected patients untreated with antiretroviral agents--a clinico-pathological study of 30 consecutive patients. *Clin Neuropathol.* 1996 Jul-Aug;15(4):221-5.
85. Masanes F, Barrientos A, Cebrián M, Pedrol E, Miró O, Casademont J, et al. Clinical, histological and molecular reversibility of zidovudine myopathy. *J Neurol Sci.* 1998 Aug 14;159(2):226-8.
86. de Mendoza C, de Ronde A, Smolders K, Blanco F, García-Benayas T, de Baar M, et al. Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 Mar;20(3):271-3.

87. Miró O, López S, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Martínez E, Soler A, et al. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antivir Ther*. 2003 Aug;8(4):333-8.
88. Walker UA, Bauerle J, Laguno M, Murillas J, Mauss S, Schmutz G, et al. Depletion of mitochondrial DNA in liver under antiretroviral therapy with didanosine, stavudine, or zalcitabine. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):311-7.
89. Haugaard SB, Andersen O, Pedersen SB, Dela F, Richelsen B, Nielsen JO, et al. Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol*. 2005 Sep;77(1):29-38.
90. Mitchell SW. Singular case of absence of adipose matter in the upper half of the body. *Am J Med Sci*. 1885:105-6.
91. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998 May 7;12(7):F51-8.
92. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*. 1995 Feb 17;267(5200):988-93.
93. Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M. Body shape changes in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998 Nov 1;19(3):307-8.
94. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet*. 1999 Jun 19;353(9170):2093-9.
95. Dube MP, Johnson DL, Currier JS, Leedom JM. Protease inhibitor-associated hyperglycaemia. *Lancet*. 1997 Sep 6;350(9079):713-4.
96. Sutinen J, Hakkinen AM, Westerbacka J, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Halavaara J, et al. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *AIDS*. 2002 Nov 8;16(16):2183-93.
97. Tong Q, Sankale JL, Hadigan CM, Tan G, Rosenberg ES, Kanki PJ, et al. Regulation of adiponectin in human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to body composition and metabolic indices. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr;88(4):1559-64.

98. Miller J, Carr A, Emery S, Law M, Mallal S, Baker D, et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Med.* 2003 Jul;4(3):293-301.
99. Villarroya F, Domingo P, Giralt M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Feb;26(2):88-93.
100. Eriksson S, Cederlund E, Bergman T, Jornvall H, Bohman C. Characterization of human deoxycytidine kinase. Correlation with cDNA sequences. *FEBS Lett.* 1991 Mar 25;280(2):363-6.
101. Eriksson S, Kierdaszuk B, Munch-Petersen B, Oberg B, Johansson NG. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Apr 30;176(2):586-92.
102. Eriksson S, Munch-Petersen B, Kierdaszuk B, Arner E. Expression and substrate specificities of human thymidine kinase 1, thymidine kinase 2 and deoxycytidine kinase. *Adv Exp Med Biol.* 1991;309B:239-43.
103. Rylova SN, Albertioni F, Flygh G, Eriksson S. Activity profiles of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in cultured adipocytes and myoblastic cells: insights into mitochondrial toxicity of nucleoside analogs. *Biochem Pharmacol.* 2005 Mar 15;69(6):951-60.
104. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
105. Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22369-76.
106. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999 Mar 5;283(5407):1482-8.
107. Lewis W, Kohler JJ, Hosseini SH, Haase CP, Copeland WC, Bienstock RJ, et al. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *AIDS.* 2006 Mar 21;20(5):675-84.
108. Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther.* 2004 Aug;9(4):555-64.
109. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, Francia E, Lagarda E, Sarnat MA, et al. Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy. *AIDS.* 1999 Nov 12;13(16):2261-7.

110. Domingo P, Vidal F, Domingo JC, Veloso S, Sambeat MA, Torres F, et al. Tumour necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest*. 2005 Dec;35(12):771-80.
111. McComsey GA, Paulsen DM, Lonergan JT, Hessenthaler SM, Hoppel CL, Williams VC, et al. Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS*. 2005 Jan 3;19(1):15-23.
112. Weaver JG, Tarze A, Moffat TC, Lebras M, Deniaud A, Brenner C, et al. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1828-38.
113. Ben-Romano R, Rudich A, Etzion S, Potashnik R, Kagan E, Greenbaum U, et al. Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir Ther*. 2006;11(8):1051-60.
114. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6770-5.
115. Lloreta J, Domingo P, Pujol RM, Arroyo JA, Baixeras N, Matias-Guiu X, et al. Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy. *Virchows Arch*. 2002 Dec;441(6):599-604.
116. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, Domingo JC, Arroyo JA, Sambeat MA, et al. Switching to nevirapine decreases insulin levels but does not improve subcutaneous adipocyte apoptosis in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *J Infect Dis*. 2001 Nov 1;184(9):1197-201.
117. Dagon Y, Avraham Y, Berry EM. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2alpha in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Feb 3;340(1):43-7.
118. Birk RZ, Rubinstein M. IFN-alpha induces apoptosis of adipose tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 30;345(2):669-74.
119. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Kornprobst M, Capeau J, Caron M. Antiretroviral drugs with adverse effects on adipocyte lipid metabolism and survival alter the expression and secretion of proinflammatory cytokines and adiponectin in vitro. *Antivir Ther*. 2004; Dec;9(6):911-20.
120. Agrawal L, Louboutin JP, Strayer DS. Preventing HIV-1 Tat-induced neuronal apoptosis using antioxidant enzymes: mechanistic and therapeutic implications. *Virology*. 2007 Jul 5;363(2):462-72.

121. Prakash O, Teng S, Ali M, Zhu X, Coleman R, Dabdoub RA, et al. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein potentiates zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Jul 15;343(2):173-80.
122. Raidel SM, Haase C, Jansen NR, Russ RB, Sutliff RL, Velsor LW, et al. Targeted myocardial transgenic expression of HIV Tat causes cardiomyopathy and mitochondrial damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 May;282(5):H1672-8.
123. Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6;1659(2-3):178-89.
124. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ*. 2005 Aug;12 Suppl 1:962-70.
125. Villena JA, Carmona MC, Rodríguez de la Concepción M, Rossmesl M, Viñas O, Mampel T, et al. Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Nov;59(11):1934-44.
126. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 2006 May;3(5):333-41.
127. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, et al. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*. 2003 Feb;23(3):1085-94.
128. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1281-9.
129. Shi X, Burkart A, Nicoloso SM, Czech MP, Straubhaar J, Corvera S. Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30658-67.
130. Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6650-6.
131. Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, et al. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. 2006 Apr;49(4):784-91.

132. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1751-60.
133. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2006 Feb;49(2):394-7.
134. Dahlman I, Forsgren M, Sjogren A, Nordstrom EA, Kaaman M, Naslund E, et al. Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1792-9.
135. Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjolín E, Dahlman I, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*. 2007 Dec;50(12):2526-33.
136. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*. 2005 May;54(5):1392-9.
137. Pietilainen KH, Naukkarinen J, Rissanen A, Saharinen J, Ellonen P, Keranen H, et al. Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. *PLoS Med*. 2008 Mar 11;5(3):e51.
138. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum Genet*. 2003 Oct;113(5):432-6.
139. Liguori R, Mazzaccara C, Pasanisi F, Buono P, Oriani G, Finelli C, et al. The mtDNA 15497 G/A polymorphism in cytochrome b in severe obese subjects from Southern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Oct;16(7):466-70.
140. Rivera MA, Perusse L, Gagnon J, Dionne FT, Leon AS, Rao DC, et al. A mitochondrial DNA D-loop polymorphism and obesity in three cohorts of women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Jun;23(6):666-8.
141. Guo LJ, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, et al. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion*. 2005 Feb;5(1):15-33.
142. Parker E, Phillips DI, Cockington RA, Cull C, Poulton J. A common mitochondrial DNA variant is associated with thinness in mothers and their 20-yr-old offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Dec;289(6):E1110-4.

143. Casali C, Fabrizi GM, Santorelli FM, Colazza G, Villanova M, Dotti MT, et al. Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology*. 1999 Mar 23;52(5):1103-4.
144. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23;1658(1-2):80-8.
145. Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve*. 1995;3:S102-6.
146. Pineda M, Solano A, Artuch R, Andreu AL, Playan A, Vilaseca MA, et al. Peripheral neuropathy with ataxia in childhood as a result of the G8363A mutation in mitochondrial DNA. *Pediatr Res*. 2004 Jul;56(1):55-9.
147. Guallar JP, Vilà MR, Lopez-Gallardo E, Solano A, Domingo JC, Gámez J, et al. Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA(Lys) point mutations in mitochondrial DNA. *Mol Genet Metab*. 2006 Nov;89(3):283-5.
148. Vilà MR, Gámez J, Solano A, Playan A, Schwartz S, Santorelli FM, et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):800-2.
149. Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaForgue D, Timsit J, Virally M, Gin H, et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med*. 2001 May 1;134(9 Pt 1):721-8.
150. Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T, Kanatsuka A, Kuzuya T, Kobayashi M, et al. Clinical features of diabetes mellitus with the mitochondrial DNA 3243 (A-G) mutation in Japanese: maternal inheritance and mitochondria-related complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003 Mar;59(3):207-17.
151. Suzuki Y, Nishimaki K, Taniyama M, Muramatsu T, Atsumi Y, Matsuoka K, et al. Lipoma and ophthalmoplegia in mitochondrial diabetes associated with small heteroplasmy level of 3243 tRNA(Leu(UUR)) mutation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2004 Mar;63(3):225-9.
152. Suzuki Y, Tsukuda K, Taniyama M, Atsumi Y, Matsuoka K, Oka Y. Lipoma and sensory neuropathy in mitochondrial diabetes associated with tRNA mutation at position 3271. *Diabetes Care*. 2002 Feb;25(2):407-8.
153. Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamaki M, et al. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet*. 2005 Sep;77(3):430-41.

154. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):417-23.
155. Cote HC. Possible ways nucleoside analogues can affect mitochondrial DNA content and gene expression during HIV therapy. *Antivir Ther*. 2005;10(Suppl 2):M3-11.
156. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodríguez de la Concepción ML, Alegre M, Domingo JC, et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther*. 2006;11(6):729-40.
157. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Fontdevila J, Martínez E, et al. Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS*. 2008 Mar 12;22(5):575-84.
158. Kim MJ, Jardel C, Barthelemy C, Jan V, Bastard JP, Fillaut-Chapin S, et al. Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 May;52(5):1670-6.
159. Pace CS, Martin AM, Hammond EL, Mamotte CD, Nolan DA, Mallal SA. Mitochondrial proliferation, DNA depletion and adipocyte differentiation in subcutaneous adipose tissue of HIV-positive HAART recipients. *Antivir Ther*. 2003 Aug;8(4):323-31.
160. Kim MJ, Leclercq P, Lanoy E, Cervera P, Antuna-Puente B, Maachi M, et al. A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study. *Antivir Ther*. 2007;12(8):1273-83.
161. Boyd MA, Carr A, Ruxrungtham K, Srasuebku P, Bien D, Law M, et al. Changes in body composition and mitochondrial nucleic acid content in patients switched from failed nucleoside analogue therapy to ritonavir-boosted indinavir and efavirenz. *J Infect Dis*. 2006 Sep 1;194(5):642-50.
162. Hammond E, McKinnon E, Mallal S, Nolan D. Pathogenesis of lipoatrophy: analysis of tissue and plasma. *Antivir Ther*. [Abstract]. 2008;13(Suppl 4).
163. McComsey GA, Lo Re V, 3rd, O'Riordan M, Walker UA, Lebrecht D, Baron E, et al. Effect of reducing the dose of stavudine on body composition, bone density, and markers of mitochondrial toxicity in HIV-infected subjects: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 15;46(8):1290-6.
164. Rodríguez de la Concepción ML, Yubero P, Domingo JC, Iglesias R, Domingo P, Villarroya F, et al. Reverse transcriptase inhibitors alter uncoupling protein-1 and mitochondrial biogenesis in brown adipocytes. *Antivir Ther*. 2005;10(4):515-26.

165. Stankov MV, Lucke T, Das AM, Schmidt RE, Behrens GM. Relationship of mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in preadipocytes treated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther.* 2007;12(2):205-16.
166. Walker UA, Bickel M, Lutke Volksbeck SI, Ketelsen UP, Schofer H, Setzer B, et al. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor--associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Feb 1;29(2):117-21.
167. Gougeon ML, Penicaud L, Fromenty B, Leclercq P, Viard JP, Capeau J. Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther.* 2004 Apr;9(2):161-77.
168. Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Jacobson LP, Palella FJ, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Jun 1;51(2):111-6.
169. Nolan D, Hammond E, Martin A, Taylor L, Herrmann S, McKinnon E, et al. Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS.* 2003 Jun 13;17(9):1329-38.
170. Loffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem.* 1997 Sep;174(1-2):125-9.
171. Walker UA, Auclair M, Lebrecht D, Kornprobst M, Capeau J, Caron M. Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. *Antivir Ther.* 2006;11(1):25-34.
172. López S, Garrabou G, Martínez E, Domingo P, Fontdevila J, Gatell JM, et al. Mitochondrial studies in adipose tissue of HIV-infected patients without fat redistribution. *Antivir Ther.* [Abstract]. 2004;9:L20.
173. McComsey GA, Libutti DE, O'Riordan M, Shelton JM, Storer N, Ganz J, et al. Mitochondrial RNA and DNA alterations in HIV lipoatrophy are linked to antiretroviral therapy and not to HIV infection. *Antivir Ther.* 2008;13(5):715-22.
174. Deveaud C, Beauvoit B, Hagry S, Galinier A, Carriere A, Salin B, et al. Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? *Biochem Pharmacol.* 2005 Jul 1;70(1):90-101.
175. Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(22):7947-56.

176. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Jan 23;104(4):1418-23.
177. Barthelemy C, Ogier de Baulny H, Diaz J, Cheval MA, Frachon P, Romero N, et al. Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions, and compensation. *Ann Neurol*. 2001 May;49(5):607-17.
178. Vu TH, Tanji K, Valsamis H, DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial DNA depletion in a patient with long survival. *Neurology*. 1998 Oct;51(4):1190-3.
179. Wang L, Limongelli A, Vila MR, Carrara F, Zeviani M, Eriksson S. Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol Genet Metab*. 2005 Jan;84(1):75-82.
180. Miró O, López S, Rodríguez de la Concepción M, Martínez E, Pedrol E, Garrabou G, et al. Upregulatory mechanisms compensate for mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004 Dec 15;37(5):1550-5.
181. Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonnqvist T. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):3032-40.
182. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*. 2004 May;55(5):706-12.
183. Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, Mogensen B, Duno M, Shoubridge EA, et al. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet*. 2007 Aug;81(2):383-7.
184. Spinazzola A, Viscomi C, Fernández-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, et al. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):570-5.
185. Pontarin G, Gallinaro L, Ferraro P, Reichard P, Bianchi V. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Oct 14;100(21):12159-64.
186. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Dec 5;103(49):18586-91.
187. Pontarin G, Ferraro P, Hakansson P, Thelander L, Reichard P, Bianchi V. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human

fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):16820-8.

188. Rampazzo C, Fabris S, Franzolin E, Crovatto K, Frangini M, Bianchi V. Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):34758-69.

189. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):735-43.

190. Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4490-7.

191. Lee EW, Lai Y, Zhang H, Unadkat JD. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem.* 2006 Jun 16;281(24):16700-6.

192. Frangini M, Rampazzo C, Franzolin E, Lara MC, Vila MR, Marti R, et al. Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts. *FEBS J.* 2009 Feb;276(4):1104-13.

193. Hakansson P, Hofer A, Thelander L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem.* 2006 Mar 24;281(12):7834-41.

194. Larsson NG, Oldfors A, Holme E, Clayton DA. Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 May 16;200(3):1374-81.

195. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci.* 1980 Jul;47(1):117-33.

196. Akman HO, Dorado B, López LC, García-Cazorla A, Vilà MR, Tanabe LM, et al. Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Hum Mol Genet.* 2008 Aug 15;17(16):2433-40.

197. Villarroya F, Domingo P, Giral M. Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond).* 2007 Dec;31(12):1763-76.

198. Addy CL, Gavrilu A, Tsiodras S, Brodovicz K, Karchmer AW, Mantzoros CS. Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat

- redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):627-36.
199. Hommes MJ, Romijn JA, Endert E, Eeftinck Schattenkerk JK, Sauerwein HP. Insulin sensitivity and insulin clearance in human immunodeficiency virus-infected men. *Metabolism.* 1991 Jun;40(6):651-6.
200. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):1026-31.
201. Villarroya J, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Gutiérrez MM, Mateo MG, et al. Differential alterations of gene expression in visceral versus subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected, HAART-treated patients with lipodystrophy: a pilot study. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 4:A3).
202. Arnould T, Mercy L, Houbion A, Vankoningsloo S, Renard P, Pascal T, et al. mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *FASEB J.* 2003 Nov;17(14):2145-7.
203. Zhou X, Solaroli N, Bjerke M, Stewart JB, Rozell B, Johansson M, et al. Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2008 Aug 1;17(15):2329-35.
204. Kopp JB, Klotman ME, Adler SH, Bruggeman LA, Dickie P, Marinos NJ, et al. Progressive glomerulosclerosis and enhanced renal accumulation of basement membrane components in mice transgenic for human immunodeficiency virus type 1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Mar 1;89(5):1577-81.
205. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010; 11: 11-18.
206. Deveaud C, Beauvoit B, Salin B, Schaeffer J, Rigoulet M. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 2004 Dec;267(1-2):157-66.
207. Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;92(6):2240-7.

Publicacions

Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency

Revista: Journal of the Neurological Sciences. 2008 Apr;267(1-2):137-41.

PMID: 18021809

Pèrdua selectiva de fibres musculars i compensació molecular en una miopatia mitocondrial deguda a deficiència de TK2

Un pacient (12 anys d'edat) amb la síndrome de depleció del DNA mitocondrial (mtDNA) deguda a mutacions del gen TK2 ha rebut un seguiment clínic continuat durant els últims 10 anys. Durant aquest temps es va observar una atròfia muscular progressiva acompanyada de pèrdua selectiva de fibres musculars de tipus 2 i, malgrat també es va observar una acusada depleció del mtDNA, les fibres musculars restants presentaven uns nivells d'activitat dels complexos de la cadena respiratòria (RC) i de la proteïna mitocondrial COX II normals.

Aquests resultats indiquen que existeixen mecanismes compensatoris que són responsables de la progressió lenta de la malaltia. Així doncs, la identificació de factors que millorin la depleció del mtDNA podria revelar noves dianes terapèutiques útils per a tractar aquestes malalties devastadores.

Altered gene transcription profiles in fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations indicate compensatory mechanisms

Revista: Experimental Cell Research. 2009 May 1;315(8):1429-38.

PMID: 19265691

Un perfil de transcripció gènica alterat en fibroblasts amb mutacions en TK2 o DGUOK indica mecanismes compensatoris

La síndrome de depleció del DNA mitocondrial (MDS) és una malaltia que s'hereta de forma autosòmica recessiva i es caracteritza per una reducció en la quantitat de DNA mitocondrial (mtDNA), que altera la síntesi dels complexos de la cadena respiratòria. La MDS ha estat classificada en dos grups principals, la forma hepatocerebral, que afecta al fetge i al sistema nerviós central, i la forma miopàtica que té com a teixit diana el múscul esquelètic. En aquest estudi s'ha comparat les característiques genètiques i moleculars de fibroblasts obtinguts de dos pacients amb mutacions en *TK2*, amb uns altres dos amb mutacions en el gen *DGUOK*. Per PCR a temps real es va observar depleció del mtDNA en els fibroblasts deficientes per *dGK* (*dGK*⁻) però no en les cèl·lules deficientes per *TK2* (*TK2*⁻). Per RT-PCR a temps real i western blot es van trobar diferències significatives pel que fa a la expressió del transportador de nucleòsids equilibratiu 1 humà (hENT1), tant en l'abundància relativa de mRNA com de proteïna. L'expressió d'hENT1 estava incrementada, tant el transcrit com la proteïna, en fibroblasts quiescents control i *TK2*⁻ respecte a cèl·lules en divisió. Contràriament, l'expressió d'hENT1 no variava en fibroblasts *dGK*⁻ quiescents i en divisió. A més a més, la repressió d'hENT1 per siRNA induïa depleció del mtDNA en fibroblasts *TK2*⁻, indicant que hENT1 contribueix al correcte manteniment dels nivells de mtDNA en cèl·lules deficientes per *TK2*. Els transcrits de la timidina fosforilasa, el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM), i la DNA polimerasa gamma (Pol γ) es trobaven reduïts en les cèl·lules *dGK*⁻ però no, en canvi, a les *TK2*⁻ que presentaven el mRNA de la timidilat sintasa (TS) augmentat. Aquests resultats, en conjunt, suggereixen una expressió gènica diferencial entre els fibroblasts deficientes per *TK2* i *dGK*, i destaquen la importància d'hENT1 com a factor compensatori en la MDS.

An *in vitro* model of mitochondrial DNA depletion by down-regulation of thymidine kinase 2 expression

Revista: Experimental Cell Research. Submitted

Un model *in vitro* de depleció del DNA mitocondrial per down-regulació de l'expressió de la timidina quinasa 2

La síndrome de depleció del mtDNA (MDS) compren un grup clínicament heterogeni de malalties caracteritzat per reduccions en l'abundància de mtDNA, sense mutacions puntuals o reordenacions associades. Hem desenvolupat un model *in vitro* per a estudiar els efectes d'una reducció de l'expressió de la timidina quinasa 2 mitocondrial (TK2) per a poder entendre els mecanismes moleculars involucrats en la MDS deguda a mutacions en TK2. Per a aquest motiu vam utilitzar un RNA d'interferència (siRNA) dirigit contra el mRNA de TK2 per a reduir l'expressió de TK2 en cèl·lules Ost TK1⁺, generant així línies estables deficientes per TK2 que mostraven una forta depleció del mtDNA. Els clons deficientes per TK2 presentaven un increment en l'activitat de la citocrom oxidasa (COX), un augment en l'expressió del transcrit COXI i la proteïna COXII, cap alteració del pool de desoxinucleòtids (dNTP) respecte les cèl·lules control, i una reducció marcada del mRNA del transportador equilibratiu de nucleòsids humà 1 (hENT1), la DNA-polimerasa γ (Pol γ), el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM) i la timidina fosforilasa (TP). Aquests resultats indiquen que el transportador hENT1 juga un paper important en el fenotip de depleció del mtDNA, que no pot ser explicat per un desequilibri dels dNTPs. A més a més, la disminució de l'expressió de TFAM i Pol γ semblen ser efectes secundaris a la depleció de mtDNA més que una causa per se. Els nostres descobriments destaquen la importància de desenvolupar noves eines *in vitro* que puguin millorar la nostra comprensió dels mecanismes moleculars subjacents a la MDS, i a l'hora possibles aproximacions terapèutiques.

An *in vitro* model of mitochondrial DNA depletion by down-regulation of thymidine kinase 2 expression

Joan Villarroya^{1,2}, M^a Carmen Lara¹, Beatriz Dorado³, Marta Garrido⁴, Elena García-Arumí¹, Anna Meseguer¹, Michio Hirano³, Maya R Vilà^{1*}.

¹Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM). Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Spain. ³Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA. ⁴Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

*Corresponding Author:

Maya R Vilà, PhD

Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Institut de Recerca, Plta 1 Lab 117

Pg. Vall d'Hebron, 119-129

08035 Barcelona, Spain

mayavila@gmail.com

Tel. +34 93 4894072

FAX: +34 93 4894015

Abstract

The mtDNA depletion syndrome (MDS) comprises a clinically heterogeneous group of diseases characterized by reductions of the mtDNA abundance, without associated point mutations or rearrangements. We have developed an in vitro model to study the effects of reduced mitochondrial thymidine kinase 2 (TK2) expression in order to understand the molecular mechanisms involved in MDS due to TK2 mutations. Small interfering RNA (siRNA) targeting TK2 mRNA was used to decrease TK2 expression in Ost TK1- cells, generating stable TK2-deficient cell lines showing severe mtDNA depletion. TK2-deficient clones showed increased cytochrome oxidase (COX) activity as well as COXI transcript and COXII protein expression, no alterations of the deoxynucleotide (dNTP) pools respect to control cells, and a severe reduction in the mRNA expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), DNA-polymerase gamma (Pol γ), mitochondrial transcription factor A (TFAM), and thymidine phosphorylase (TP). These results indicate an important role for the transporter hENT1 in the mtDNA depletion phenotype, which could not be explained by imbalance of dNTPs. Furthermore, the decreases in the expression of TFAM and Pol γ appear to be secondary responses to mtDNA depletion rather than a cause per se. Our findings highlight the importance of developing new in vitro tools that could improve our understanding of the molecular mechanisms underlying MDS, and foreseeable therapeutic approaches.

Keywords: Mitochondrial dNTP pools, mtDNA depletion, Ost TK1-, siRNA, TK2.

Introduction

The mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (MDS) comprises a clinically heterogeneous group of diseases characterized by a reduction of the mtDNA copy number without point mutations or rearrangements [1]. MtDNA depletion is transmitted as an autosomal recessive trait and may affect either a specific tissue (most commonly muscle or liver) or multiple organs, including heart, brain and kidney. Thus, three syndromes have been defined clinically: infantile myopathy, encephalomyopathy, and hepato-cerebral forms; each has been associated with specific molecular genetic defects. Myopathic MDS has been associated with mutations in genes TK2 [2] and RRM2B [3]. TK2 encodes the

mitochondrial thymidine kinase and RRM2B encodes the cytosolic p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit (p53R2). The encephalomyopathic form of MDS has been associated with mutations in the gene encoding the β -subunit of the adenosine diphosphate-forming succinyl coenzyme A synthase ligase (SUCLA2) [4]. Finally, hepatocerebral MDS has been linked with mutations in six genes: DGUOK, the gene encoding the mitochondrial deoxyguanosine kinase (dGK) [5], POLG1 for the mtDNA polymerase gamma (Pol γ) [6, 7], MPV17, a small mitochondrial membrane protein of unknown function [8], PEO1 for the mitochondrial helicase/primase TWINKLE [9], and SUCLG1 for the alpha subunit of succinyl-CoA synthase [10]

Unlike nuclear DNA (nDNA), synthesis of mtDNA is constitutive and not cell cycle-regulated [11]; hence a constant supply of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) is crucial for the maintenance of mitochondrial integrity. TK2 and dGK are involved in the salvage pathways of mitochondrial pyrimidine and purine deoxynucleotides, respectively, which constitute the major source of mtDNA precursors in post-mitotic tissues, while p53R2 is also active in resting cells and contributes to de novo dNTP synthesis [12]. Because succinyl-CoA synthase is thought to be associated with mitochondrial nucleoside diphosphate kinase (NDPK) [4], SUCLA2 and SUCLG1 mutations may also impair mitochondrial dNTP salvage causing mtDNA depletion. However, mutations in the aforementioned genes do not account for all cases of MDS, suggesting the existence of several causative genes for MDS.

It is still unclear why the phenotypes associated with TK2 and DGUOK mutations are tissue-specific. To better understanding of the pathogenesis of TK2 mutations, two TK2-deficient mouse models have been generated to assess pathomechanisms of this disease [13, 14]. Akman et al. generated mice harboring an H126N TK2 mutation corresponding to a pathogenic human H121N TK2 mutation. Homozygous TK2 knock-in mutant mouse manifested a severe and rapid progressive encephalomyelopathy with severe TK2 deficiency, imbalances of mitochondrial dNTP pools, and mtDNA depletion in multiple tissues [13]. Zhou et al. generated a TK2 knockout with several organs affected, including skeletal muscle, heart, liver, spleen, brain, and brown adipose tissue indicating that complete abrogation of TK2 without any residual enzymatic activity produces a more severe phenotype in mice compared to human patients [14]. These results correspond to the different phenotypes observed in patients with different TK2 mutations; severe defects cause early childhood mortality while milder mutations are compatible with survival into adulthood.

Although animal models are very useful tools to assess pathomechanisms and potential therapies, in vitro cellular models provide valuable complementary experimental systems because many manipulations and therapeutic assays are difficult to perform in vivo. Therefore, we developed the first cellular system of reduced TK2 expression in the context of cells lacking cytosolic thymidine kinase (TK1) expression in order to understand the molecular mechanisms involved in this form of mtDNA depletion syndrome. Small interfering RNA (siRNA) to target the TK2 mRNA was used to decrease TK2 expression in Ost TK1- cells generating stable TK2-deficient cell lines with severe mtDNA depletion. We have characterized these cell lines and studied how the down regulation of TK2 affects the expression of genes involved in the maintenance of mtDNA as well as in the nucleoside/nucleotide metabolism.

Materials and methods

Cell line and cell growth: The established human tumor cell line Ost TK1- was kindly provided by Dr. Vera Bianchi (Department of Biology, University of Padova, Italy). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g of glucose/liter (DMEM) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum (dFBS), 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 100 U/mL antibiotic/antimycotic, and 50 µg/ml of uridine. To obtain quiescent cells, we transferred confluent contact-inhibited cells to medium with 0.1% dFBS to enhance quiescence. Cells were regularly tested for mycoplasma contamination using the MycoAlert Mycoplasma Detection kit (Lonza). We used flow cytometry in order to determine cell-cycle distribution with a fluorescence-activated flow cytometer (FACS Calibur™ System. BD Biosciences).

iRNA experiments: Ost TK1- cells were stably transfected using Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen Life Technologies) with the pSilencer™ 4.1-CMV hygro expression vector (Ambion) containing the validated TK2 double-stranded oligonucleotide (5'-GGUCUAUGGCUCAUGUCUG-3'). Cells were also transfected with the same vector containing an irrelevant sequence to be used as an RNA interference control. All the plasmids constructed were verified by sequencing. Positive clones were selected in the presence of hygromycin to a final concentration of 450 µg/ml. To maintain the new generated cell lines, hygromycin was added permanently to the culture medium at the same concentration. Selected clones were screened for down-regulation of TK2 mRNA and protein by real time RT-PCR and Western blotting, respectively (see below).

Quantitative RT-PCR: TK2 mRNA expression levels were measured in all hygromycin resistance clones. Total RNA was obtained from cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated with RNase-free DNase following manufacturer's instructions. The integrity of the extracted RNA was verified by agarose gel electrophoresis and quantified by spectrophotometry. Reverse transcription (RT) was performed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), and PCR with the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System using Gene Expression Assays TaqMan® (Applied Biosystems) probes for TK2 (Hs00177950_m1) and PPIA (Hs99999904_m1) as endogenous control. mRNA expression of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) (Hs00191940_m1), DNA polymerase γ (Pol γ) (Hs00160298_m1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) (Hs00273372_s1), thymidine phosphorylase (TP) (Hs00157317_m1), and subunit I of cytochrome c oxidase (COX I) (Hs02596864_g1) were performed following the same procedure as described above. PCR was performed using the following cycle conditions: an initial step of 50 °C for 2 min, then 95 °C for 10 min, and 40 cycles of two-step 50 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. All assays were performed at least in triplicate. Post-PCR analysis was analyzed by using GenAmp 7500 SDS software.

Quantification of mtDNA depletion: DNA content assays were performed with the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Total DNA was extracted from cultured cells. Mitochondrial DNA was measured using the 12S ribosomal TaqMan mitochondrial assay labeled with FAM fluorochrome and the primers 5'CCACGGGAAACAGCAGTGATT3' and 5'CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA3'. Measurements of the nuclear single copy gene RNaseP was performed by using the PDARs RNaseP kit (Applied Biosystems) and a VIC labeled probe. We used calibration curves to quantify the copy number of mtDNA versus nDNA.

Western blotting: Cells grown at different culture conditions were trypsinized and washed three times with phosphate buffer saline (PBS). Protein extracts were prepared by adding protease inhibitor cocktail (Sigma) to the lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 Mm EDTA, 1% Triton X-100), and quantified by Lowry colorimetric assay (BioRad Laboratories) with bovine serum albumin as standard. Twenty μ g of protein were analyzed by SDS-15% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing conditions, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Westran® S, Whatman), and blotting with 1:3000 polyclonal TK2 anti-serum [15], or 1:1000 mouse monoclonal anti-cytochrome oxidase subunit II (COX II) (Molecular Probes) in blocking buffer (PBS/5% BSA/0.01% Tween-20). After washing extensively with PBS-0.01% Tween-20, blots were incubated with anti-rabbit or anti-mouse horseradish

peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Dako), washed, and developed with enhanced chemiluminescence (ECL) ECL-Plus (BD Biosciences). Blots were re-probed with 1:3000 mouse monoclonal anti-VDAC (Calbiochem Anti-Porin 31HL) to normalize the amount of mitochondrial protein loaded. Densitometric analyses were performed quantifying non-saturated autoradiographs with Quantity One v4.0.3 analysis software (BioRad Laboratories).

Enzymatic activity of the Respiratory Chain (RC): Cells were washed with PBS, homogenized with SETH buffer (250mM Sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 50 U/ml Heparin, pH 7.6) and sonicated. We assayed COX-complex IV activity monitoring cytochrome c oxidation at wavelength 550 nm with a spectrophotometric system. We also assayed citrate synthase (CS) activity in order to assess the mitochondrial content and to normalize complex IV activity to mitochondrial mass. CS was measured by monitoring the formation of CoA at wavelength 412 nm with DTNB. Levels of protein were quantified by Bradford assay (BioRad Laboratories) and results were expressed as COX activity/CS activity/mg protein.

Measurement of mitochondrial and cytosolic dNTPs: This analysis was performed following the enzymatic assay described by Pontarin et al. [16]. Briefly, $8-15 \times 10^6$ cells were collected and lysed using a 20G needle. Mitochondrial and cytosolic fractions were separated by differential centrifugation and pellets were reconstituted in methanol. After incubating the fractions (1h for the mitochondrial and 16h for the cytosolic), at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ methanol was evaporated in a speedvac. Both dry pellets were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used. The DNA polymerase assay was done using the klenow fragment of the DNA polymerase, the appropriate oligonucleotides as template, and radio-labeled nucleotides ([2.8- ^3H]-dATP for dGTP, dCTP and dTTP determinations or [methyl]- ^3H -dTTP for dATP determination, at $2.5\text{ }\mu\text{moles/l}$ in the reaction mixture) as substrate for the reaction. Samples were then reconstituted in milliQ H₂O for their use. After 1h of incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, reactions were placed in DEAE filter papers (Watman) and washed several times in order to clear the radioactivity excess. A standard curve based on known abundance of each deoxynucleotide was used to calculate the results.

Results

Silencing of TK2 mRNA in Ost TK1- cells caused a reduction in TK2 protein levels: Because skin fibroblasts from patients with TK2 mutations in gene do not manifest mtDNA depletion, we used the osteosarcoma cell line Ost, which lacks TK1 expression, for TK2 mRNA interference experiments. Ost TK1- cells were stably transfected with pSilencer-siRNA TK2 vector and with pSilencer-control vector to generate cell lines that have stable silencing of TK2 expression. Two weeks later, and after massive cell death observed, hygromycin resistant clones were grown separately and screened for the TK2 mRNA expression by quantitative RT-PCR. Two TK2 interfered clones (TK2-29 and TK2-33) and two control clones (C-5 and C-11) were selected based on TK2 mRNA expression levels (Figure 1A) relative to the parental untransfected Ost TK1- cells. Marked reductions of TK2 transcripts were observed in TK2-29 (20% of parental cells) and TK2-33 (30% of parental cells) clones. We then assessed whether the abundance of the TK2 protein corresponded to the levels of mRNAs observed in these clones. Cells taken at confluence were lysed and assayed by western blotting using a TK2 antibody developed in our laboratory [15]. Results shown in Figure 1B demonstrated the down-regulation of TK2 protein levels in the two interfered clones relative to the controls. Anti-porin antibody (VDAC) was used to normalize the amount of mitochondrial protein loaded onto each lane and blotted in the same membrane previously tested with anti-TK2 antibody.

TK2 down-regulation caused mtDNA depletion in TK2 deficient Ost TK1- cells: We subsequently studied the amount of mtDNA in control and TK2- clones. Cells were grown to confluence (day 0) in regular medium and then maintained in 0.1% dFBS to enhance quiescence or in regular medium for 5, 10, 15 and 20 days. Although Ost TK1- cancer cell lines had lost contact inhibition, flow cytometry analyses revealed that <47% of confluent cells in 10% of dFBS were in G1/G0, while the majority of confluent cells cultured for 10-days in 0.1% of dFBS were arrested (>87%) (results not shown). Beginning on day 1 post-confluency, fresh medium was supplied every day in order to maintain the monolayer attachment to plates. Levels mtDNA were measured by real-time PCR in control and TK2-cells; representative results of C-5 and TK2-33 cells are depicted in Figure 2. The level of mtDNA in TK2-33 cells was similar to control C-5 cells when cultured at confluency in 10% dFBS for 5 and 10 days, but, from day 15 to day 20, 50% of mtDNA depletion was observed ($p < 0.05$) (Figure 2A). These results indicate that mtDNA depletion can be observed in TK2+TK1 deficient cells even with high concentration of dFBS. However, in 0.1% dFBS, more rapid and marked mtDNA reduction was observed in quiescent TK2-33

cells compared to control cells from day 5 to day 20 ($p < 0.001$) (Figure 2B). Similar results were observed with clones C-11 and TK2-29 (not shown). It is noteworthy that control cells in 0.1% dFBS showed increased levels of mtDNA at day 5 while at day 10, 15 and 20 these levels were comparable to those observed in 10% dFBS cultured cells. These results closely parallel those we observed under similar culture conditions with normal and TK2 deficient skin fibroblast that never developed depletion of mtDNA [15].

Analysis of respiratory chain in TK2 deficient Ost TK1- cells: In most patients, a direct consequence of decreased mtDNA copy number is impaired synthesis of mtDNA-encoded respiratory chain components in affected tissues. For this reason and to further characterize TK2 deficient Ost TK1- cells, we measured activities of respiratory chain complexes together with the expression of the mitochondrial-encoded subunits I and II of COX, at the mRNA and protein level, respectively. To avoid differences in the culture conditions, cells were grown in large quantities as indicated, washed with PBS, divided into different pellets, and frozen at -80°C until use. Figure 3A summarizes the activities of the cytochrome oxidase (COX) observed in TK2-deficient and control cells grown to confluence and for 10-day post-confluence in the presence of high (10%) or low (0.1%) dFBS. Upon reaching confluence, TK2-29 and TK2-33 cells showed divergent COX activities, which were higher than control cells. However, COX activity increased in quiescent mtDNA-depleted TK2-deficient cells maintained in 0.1% dFBS for 10 days while COX activities were very similar among confluent cells cultured in 10% of dFBS for the same period of time. No changes were observed in the activity of the other respiratory chain complexes (not shown). To assess how COX activity increased in quiescent TK2-deficient cells despite mtDNA depletion, we measured expression of the mitochondrial-encoded subunit I of cytochrome oxidase (COXI) in TK2 deficient and control cells cultured in the same conditions. TK2-29 and TK2-33 showed higher levels of COXI mRNA than control cells when cultured at 10-day post-confluence in 0.1% of dFBS (Figure 3B). Similarly, the same cells expressed higher levels of the mitochondrial-encoded subunit II of cytochrome oxidase (COXII) relative to VDAC protein (Figure 3C). Taken together, these results indicate the presence of compensatory mechanisms to safeguard the integrity of the respiratory chain components in quiescent mtDNA-depleted cells.

TK2-deficient and control cells showed no differences in the mitochondrial and cytosolic dNTP pools: Balance and control of the mitochondrial and cytosolic deoxynucleotide pools are essential for the maintenance of mtDNA copy number. In post-mitotic tissues or quiescent cells, the synthesis of dNTPs in mitochondria depends on TK2 and dGK salvage enzymes and, to a lesser extent, on the de novo pathway where

R1/p53R2 catalyzes a low reduction of ribonucleotides providing dNTPs for mt-DNA synthesis [12, 17]. For this reason, we hypothesized that in our TK2-33 depleted cells would show alterations in the dNTP pools compared to control C-5 cells. Figure 4 shows the steady-state levels of the mitochondrial (A) and cytosolic (B) dNTP pools in quiescent C-5 control and TK2-33 mtDNA depleted cells, and, contrary to what we had expected, no differences were found in the levels of the four dNTP's. Similar results were obtained with cells collected at confluence, except the proportion of dCTP decreased (25%) and dGTP increased (35-37%) in both, mitochondrial and cytosolic pools of control and TK2-deficient cells (not shown). Two possible explanations could account for these unexpected results, that is, the presence of mtDNA depletion in the absence of an imbalanced nucleotide pools: a) residual cytosolic dTTP is sufficient to maintain the mitochondrial pool independently of the level of TK2 expression, and b) other events, in addition to the malfunction of TK2, are necessary to induce mtDNA depletion in this culture system.

mRNA expression of genes involved in the transcription and replication of mtDNA in control and TK2-deficient cells: We then studied how TK2 deficiency could affect the mRNA expression of genes related to the transcription and replication of the mtDNA machinery and also other enzymes involved in maintaining the homeostasis of the mitochondrial dNTP pool. Total RNA was extracted from control and TK2-deficient cells and analyzed by real time RT-PCR. Assays were performed twice using triplicates for each condition. Cyclophilin A (PPIA) was used as an endogen control gene and control cells grown to confluence and for 10-day post-confluence in 0.1% of dFBS were taken as calibrators. No differences were found in the expression of deoxycytidine kinase (dCK) and deoxyguanosine kinases (dGK), the nucleoside diphosphate kinases nm23-H4 and nm23H6, thymidilate synthase, and the mitochondrial transcription factors TFB1M and TFB2M (not shown). However, we found an important decrease in the expression of the equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and in the mtDNA polymerase gamma (Pol γ) in quiescent TK2-33 cells ($p < 0.05$) (Figure 5). The mitochondrial transcription factor A (TFAM) and thymidine phosphorylase (TP) were also decreased in TK2-33 cells even at confluence stage ($p < 0.05$). These results suggest a down-regulation of genes that are less crucial for cells with mtDNA depletion.

Discussion

In this study, we used RNA interference to down-regulate the expression of TK2 in Ost TK1-deficient cells generating stable TK2- cell lines that represent, to our knowledge, the first in vitro model of mtDNA depletion due to TK2 deficiency. We have further characterized these cell lines by analyzing activities of respiratory chain complexes, the mitochondrial and cytosolic dNTP pools, and how TK2-deficiency alters other genes involved in the maintenance and replication of mtDNA. TK2-deficient clones showed mtDNA depletion when grown in 0.1% of dFBS, increased activity of COX and expression of the catalytic subunits I and II of COX, no alterations of the dNTP pools relative to control cells, and marked reductions in the transcripts for hENT1, Pol γ , TFAM, and TP. Because cultured fibroblasts derived from patients harboring TK2 mutations do not show mtDNA depletion [15, 18, 19], our cellular model represents a relevant system to assess variables that are difficult to manipulate in patient's cells or in vivo.

mtDNA depletion is characterized by the impairment of the synthesis of the respiratory chain complexes [1]. In our TK2-deficient cell clones, we observed an increase not only in COX activity, but also in the expression of COXI transcript and COXII protein. These results are similar to what we observed in a patient with severe mtDNA depletion due to TK2 mutations, but normal activities of the respiratory chain subunits [20] that we attributed to compensatory mechanisms that may retard progression of the disease in patients.

The mtDNA depletion exhibited by our Ost TK1-/TK2-deficient cells in the absence of imbalanced nucleotide pools is difficult to explain. In non-proliferating cells, an important function of R1/p53R2 ribonucleotide reductase is to provide deoxynucleotides for mtDNA replication [12], and the small dTTP pools depend on activities of both R1-p53R2 and TK2 [21]. The mRNA and protein expression of the ribonucleotide reductase subunits, R1, R2, and p53R2 in our cells (results not shown) were virtually identical to those described in quiescent fibroblasts [12]. Those authors also worked with Ost TK1- TK2-silenced clones, which were treated with a ribonucleotide reductase inhibitor hydroxiurea (HU) for 5 min to 5 h and measured the dNTP pools. A rapid drop of the cellular dTTP pools after 60 min of HU treatment, but surprisingly, TK2 down-regulation did not affect the kinetics of dNTP changes. They also showed that the dTTP pool, in an unexplained manner, progressively recovered to near pre-treatment level after 5 h of continuous exposure to HU [21]. In our cellular model, it is possible that changes in dNTP pools and induction of mtDNA depletion

were early events in confluent Ost TK1-/TK2-deficient cells and that when we measured the mitochondrial and cytosolic dNTP pools in confluent cells cultured in 0.1% of dFBS for 10 days, dNTP pools had reequilibrated to baseline levels, whereas synthesis of the mtDNA could not recover.

Franco et al. have recently established a cellular model, analogous to our TK2-deficient cells, by interfering DGUOK to induce mtDNA depletion in HeLa cells [22]. In the mtDNA depleted cells, a secondary compensatory increase in the mRNA expression of the cytosolic dCK was induced. In contrast, TK2-deficient clones showed, however, marked reductions in the levels of transcripts for hENT1, Pol γ , TFAM, and TP. hENT1 is an equilibrative nucleoside transporter ubiquitously expressed and functionally present in mitochondria [23, 24]. The hENT1 content of cultured human cancer cells appears to be coordinated with cell cycle; levels of the transporter approximately double between the G1 and G2-M phases [25]. In our study, mRNA of hENT1 was down-regulated in TK2-deficient clones grown with 0.1% dFBS, but not in control cells at the same culture conditions, suggesting that factors other than cell cycle state affect expression of this transporter. It has been also suggested that transporter synthesis and/or cell surface expression are regulated in response to cellular deoxynucleotide levels via an unknown mechanism [25]. Whether hENT1 plays a central role preventing imbalance of dNTP pools in TK2-deficient clones remains to be established. We have recently described how differential expression patterns of hENT1 in fibroblast derived from patients harboring TK2 or DGUOK mutations contribute to the mtDNA depletion phenotype observed in dGK-, but not in TK2- fibroblasts [15]. Furthermore, we have also shown that down-regulation of hENT1, but not TK1 could induce mtDNA depletion in quiescent TK2- fibroblasts, suggesting an important role for this transporter in patients with TK2-deficiency [15].

In our mtDNA-depleted cells, decreases in the TFAM and Pol γ transcripts are probably secondary responses to the reduced requirements for these two proteins. In addition to its essential function in transcription, TFAM also serves a role in packaging mtDNA [26]. Thus, TFAM is considered one of the primary factors controlling the amount (copy number) of mtDNA in cells. This hypothesis is supported by the observation that over-expression of TFAM increases mtDNA in cultured mammalian cells, the strong correlation between steady-state levels of TFAM and mtDNA copy number, and the depletion of mtDNA in tissues of heterozygous or homozygous TFAM knockout mice [27-30]. Thymidine phosphorylase degrades thymidine in the cytoplasm, thus limiting the availability of thymidine for phosphorylation by TK2 in mitochondria. We observed a decrease in the expression of this enzyme in both, confluent and quiescent TK2- cells.

Consequently, dTMP synthesized by R1/p53R2 in the cytoplasm [21] would be degraded by the appropriate cytosolic nucleotidase to form thymidine, which would not be degraded to thymine due to the lack of TP. Down-regulation of hENT1 would impede the entry of the accumulated cytosolic thymidine into mitochondria inducing the mtDNA depletion observed in these cells.

Similar to Franco et al. who showed that changes in expression of DGUOK gene in quiescent HeLa cells can cause mtDNA depletion and can induce compensatory changes in the expression of other nucleoside kinases [22], we have shown that alterations of TK2 expression may affect the expression of other genes involved in the mtDNA maintenance and in the nucleoside/nucleotide metabolism, suggesting that secondary events altering transcription, in addition to malfunction of TK2, could be necessary to induce mtDNA depletion in our cellular model of mtDNA depletion.

Acknowledgments

We thank Dr. Ramon Martí and Dr. Francesc Villarroya for helpful discussions and the critical review of the manuscript, and Dr. Vera Bianchi for providing us with Ost TK1-cell line. We also thank Dr. Isabel Huber and Dr. Marçal Pastor-Anglada for their invaluable discussions, and David Lligé for the excellent technical support. This work was supported by the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (MRV) (FIS 04/0415), the Fundismun foundation, and the Muscular Dystrophy Association USA (MH).

Disclosure statement

There are no conflicts of interest among the authors.

References

- [1] C.T. Moraes, S. Shanske, H.J. Tritschler, J.R. Aprille, F. Andreetta, E. Bonilla, E.A. Schon, S. DiMauro, mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases, *Am J Hum Genet* 48 (1991) 492-501.
- [2] A. Saada, A. Shaag, H. Mandel, Y. Nevo, S. Eriksson, O. Elpeleg, Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy, *Nat Genet* 29 (2001) 342-344.
- [3] A. Bourdon, L. Minai, V. Serre, J.P. Jais, E. Sarzi, S. Aubert, D. Chretien, P. de Lonlay, V. Paquis-Flucklinger, H. Arakawa, Y. Nakamura, A. Munnich, A. Rotig, Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion, *Nat Genet* 39 (2007) 776-780.
- [4] O. Elpeleg, C. Miller, E. HersHKovitz, M. Bitner-Glindzicz, G. Bondi-Rubinstein, S. Rahman, A. Pagnamenta, S. Eshhar, A. Saada, Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion, *Am J Hum Genet* 76 (2005) 1081-1086.
- [5] H. Mandel, R. Szargel, V. Labay, O. Elpeleg, A. Saada, A. Shalata, Y. Anbinder, D. Berkowitz, C. Hartman, M. Barak, S. Eriksson, N. Cohen, The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA, *Nat Genet* 29 (2001) 337-341.
- [6] R.K. Naviaux, K.V. Nguyen, POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion, *Ann Neurol* 55 (2004) 706-712.
- [7] G. Ferrari, E. Lamantea, A. Donati, M. Filosto, E. Briem, F. Carrara, R. Parini, A. Simonati, R. Santer, M. Zeviani, Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gamma A, *Brain* 128 (2005) 723-731.
- [8] A. Spinazzola, C. Viscomi, E. Fernandez-Vizarra, F. Carrara, P. D'Adamo, S. Calvo, R.M. Marsano, C. Donnini, H. Weiher, P. Strisciuglio, R. Parini, E. Sarzi, A. Chan, S. DiMauro, A. Rotig, P. Gasparini, I. Ferrero, V.K. Mootha, V. Tiranti, M. Zeviani, MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion, *Nat Genet* 38 (2006) 570-575.
- [9] A.H. Hakonen, P. Isohanni, A. Paetau, R. Herva, A. Suomalainen, T. Lonqvist, Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion, *Brain* 130 (2007) 3032-3040.
- [10] E. Ostergaard, E. Christensen, E. Kristensen, B. Mogensen, M. Duno, E.A. Shoubridge, F. Wibrand, Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase

causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion, *Am J Hum Genet* 81 (2007) 383-387.

[11] D. Bogenhagen, D.A. Clayton, Thymidylate nucleotide supply for mitochondrial DNA synthesis in mouse L-cells. Effect of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate in thymidine kinase plus and thymidine kinase minus cells, *J Biol Chem* 251 (1976) 2938-2944.

[12] G. Pontarin, P. Ferraro, P. Hakansson, L. Thelander, P. Reichard, V. Bianchi, p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage, *J Biol Chem* 282 (2007) 16820-16828.

[13] H.O. Akman, B. Dorado, L.C. Lopez, A. Garcia-Cazorla, M.R. Vilà, L.M. Tanabe, W.T. Dauer, E. Bonilla, K. Tanji, M. Hirano, Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance, *Hum Mol Genet* 17 (2008) 2433-2440.

[14] X. Zhou, N. Solaroli, M. Bjerke, J.B. Stewart, B. Rozell, M. Johansson, A. Karlsson, Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2 deficient mice, *Hum Mol Genet* 17 (2008) 2329-2335.

[15] J. Villarroya, C. de Bolós, A. Meseguer, M. Hirano, M.R. Vilà, Differential gene transcription background among fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations, *Exp Cell Res* 315 (2009) 1429-1438.

[16] G. Pontarin, L. Gallinaro, P. Ferraro, P. Reichard, V. Bianchi, Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 12159-12164.

[17] P. Hakansson, A. Hofer, L. Thelander, Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells, *J Biol Chem* 281 (2006) 7834-7841.

[18] A. Saada, E. Ben-Shalom, R. Zyslin, C. Miller, H. Mandel, O. Elpeleg, Mitochondrial deoxyribonucleoside triphosphate pools in thymidine kinase 2 deficiency, *Biochem Biophys Res Commun* 310 (2003) 963-966.

[19] C. Mariotti, G. Uziel, F. Carrara, M. Mora, A. Prella, V. Tiranti, S. DiDonato, M. Zeviani, Early-onset encephalomyopathy associated with tissue-specific mitochondrial DNA depletion: a morphological, biochemical and molecular-genetic study, *J Neurol* 242 (1995) 547-556.

[20] M.R. Vilà, J. Villarroya, E. Garcia-Arumi, A. Castellote, A. Meseguer, M. Hirano, M. Roig, Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency, *J Neurol Sci* 267 (2008) 137-141.

- [21] C. Rampazzo, S. Fabris, E. Franzolin, K. Crovatto, M. Frangini, V. Bianchi, Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells, *J Biol Chem* 282 (2007) 34758-34769.
- [22] M. Franco, M. Johansson, A. Karlsson, Depletion of mitochondrial DNA by down-regulation of deoxyguanosine kinase expression in non-proliferating HeLa cells, *Exp Cell Res* 313 (2007) 2687-2694.
- [23] Y. Lai, C.M. Tse, J.D. Unadkat, Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs, *J Biol Chem* 279 (2004) 4490-4497.
- [24] E.W. Lee, Y. Lai, H. Zhang, J.D. Unadkat, Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine, *J Biol Chem* 281 (2006) 16700-16706.
- [25] J. Pressacco, J.S. Wiley, G.P. Jamieson, C. Erlichman, D.W. Hedley, Modulation of the equilibrative nucleoside transporter by inhibitors of DNA synthesis, *Br J Cancer* 72 (1995) 939-942.
- [26] T.F. Alam, T. Kanki, T. Muta, K. Ukaji, Y. Abe, H. Nakayama, K. Takio, N. Hamasaki, D. Kang, Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 1640-1645.
- [27] N.G. Larsson, A. Oldfors, E. Holme, D.A. Clayton, Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion, *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1994) 1374-1381.
- [28] N.G. Larsson, J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G.S. Barsh, D.A. Clayton, Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice, *Nat Genet* 18 (1998) 231-236.
- [29] J. Poulton, K. Morten, C. Freeman-Emmerson, C. Potter, C. Sewry, V. Dubowitz, H. Kidd, J. Stephenson, W. Whitehouse, F.J. Hansen, M. Parisi, G. Brown, Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion, *Hum Mol Genet* 3 (1994) 1763-1769.
- [30] B.L. Seidel-Rogol, G.S. Shadel, Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 1929-1934.

Figures

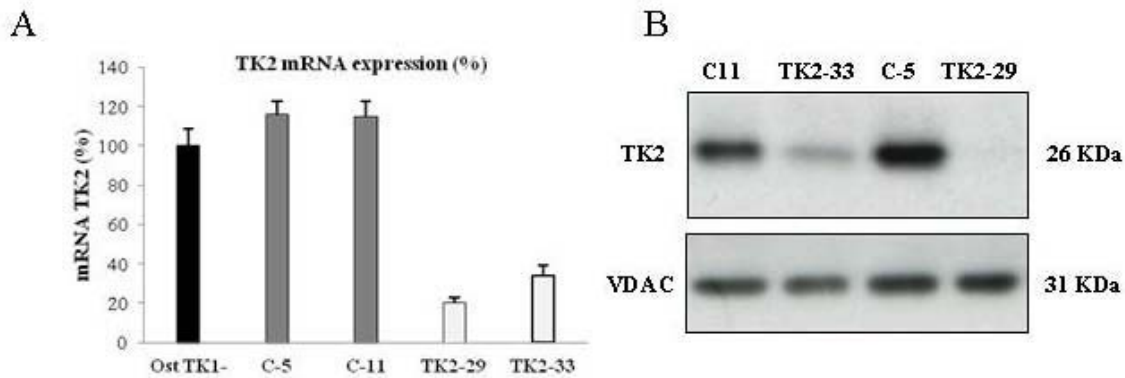


Figure 1. Analysis of TK2 expression in TK2-interfered Ost TK1- cells using quantitative real-time PCR and western blotting. A) TK2 relative mRNA expression in Ost TK1- parental cell line (Ost TK1-), 2 control cell lines (C-5, C-11) and 2 TK2-interfered cell lines (TK2-29, TK2-33). Results were normalized using the cyclophilin A (PPIA) as endogenous control, and expressed in percentage. Ost TK1- parental cell line was used as a calibrator. B) Western blot showing the TK2 protein reduction in TK2-deficient clones. We blotted 20 μ g of extracted cell protein with TK2 antiserum diluted 1:3000 in blocking buffer. The 26 kDa band corresponding to TK2 protein was detected. The membrane was stripped in the appropriate buffer and re-blotted with anti-porin antibody (VDAC) to normalize the amount of mitochondrial protein loaded onto each lane.

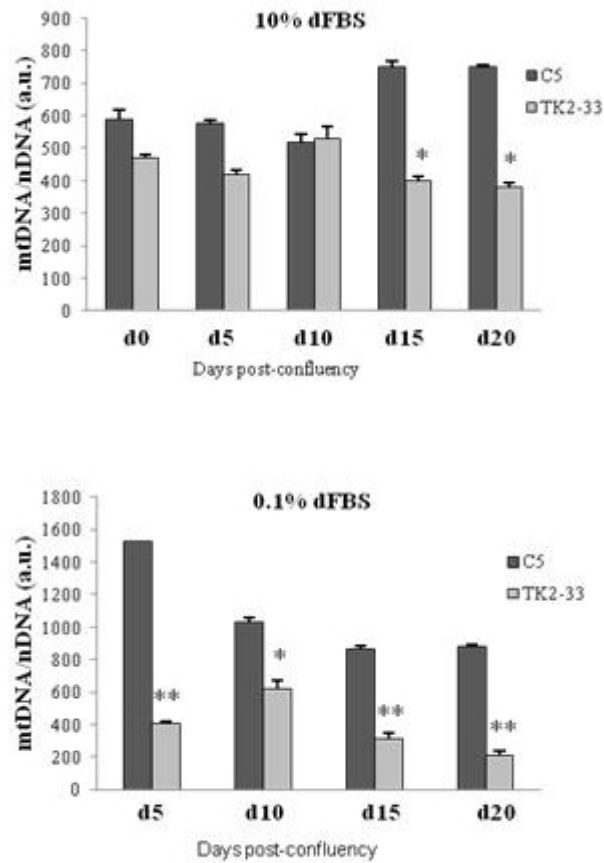
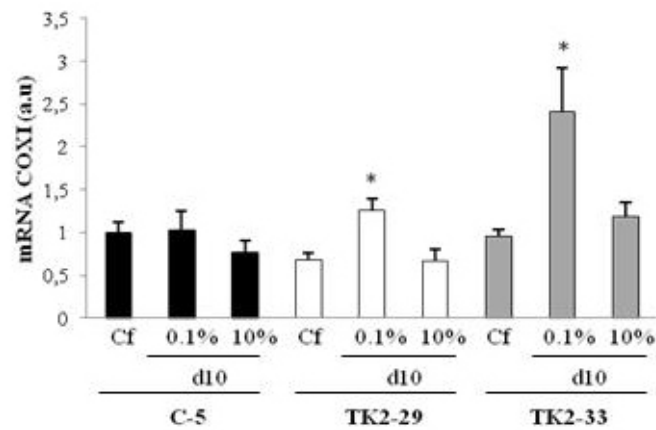


Figure 2. Measurement of mtDNA depletion by quantitative real-time PCR. Control (C-5) and TK2-interfered (TK2-33) clones were grown in 10% dFBS (top panel) until reaching confluence (d0) and then either shifted 0.1% dFBS or maintained in 10% dFBS (bottom panel). Cells in both conditions were harvested at day 5 (d5), 10 (d10), 15 (d15) and 20 (d20) after confluence. Results showed the ratio between mtDNA and nuclear DNA and are expressed in arbitrary units (a.u). Dark bars, C-5, light bars, TK2-33. (*) means $p < 0.05$; (**) means $p < 0.01$.

A

	COX/CS/mg prot		
	Confluence	0.1% dFBS d10	10% dFBS d10
Control	537.5±43.2	860.7±49.9	1264.6±72.6
TK2-29	803.9±62.3	1466.8±82.6	1268.9±78.8
TK2-33	1260.2±97.4	1412.8±98.9	1100.4±69.1

B



C

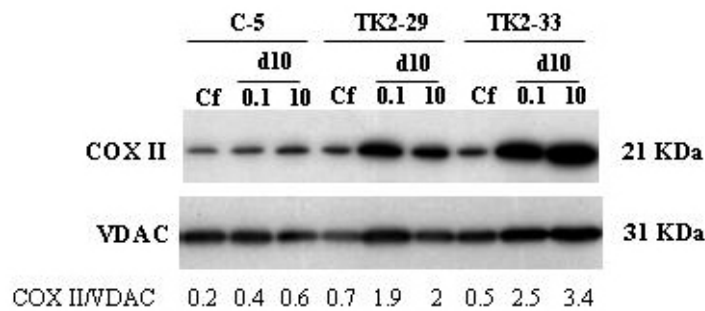
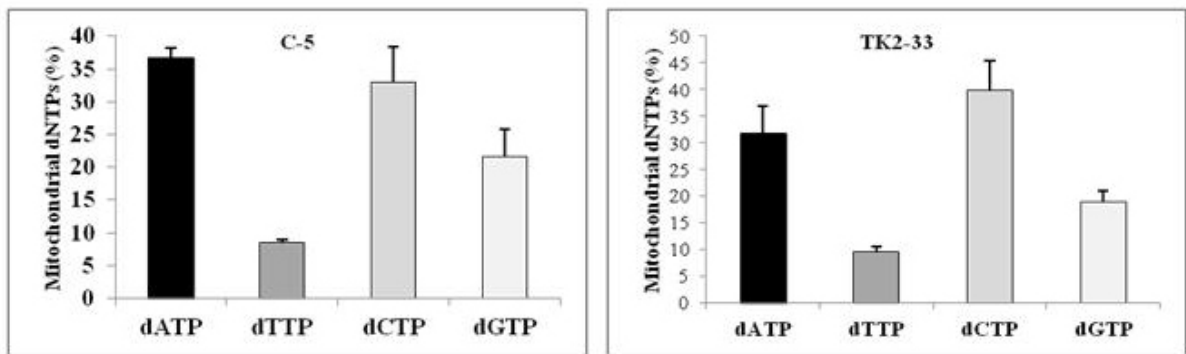


Figure 3. Analysis of the respiratory chain complexes. COX activity was measured in control and TK2-deficient cells grown in 0.1 and 10% dFBS (A). In control and TK2-deficient cells cultured in 0.1 and 10% dFBS for 10 days, levels of COXI transcript were assessed by real time RT-PCR (B) and COXII protein were analyzed by western blotting. Anti-porin antibody (VDAC) was blotted to normalize the amount of mt-protein loaded and the ratios are shown in the bottom panel (C).

A



B

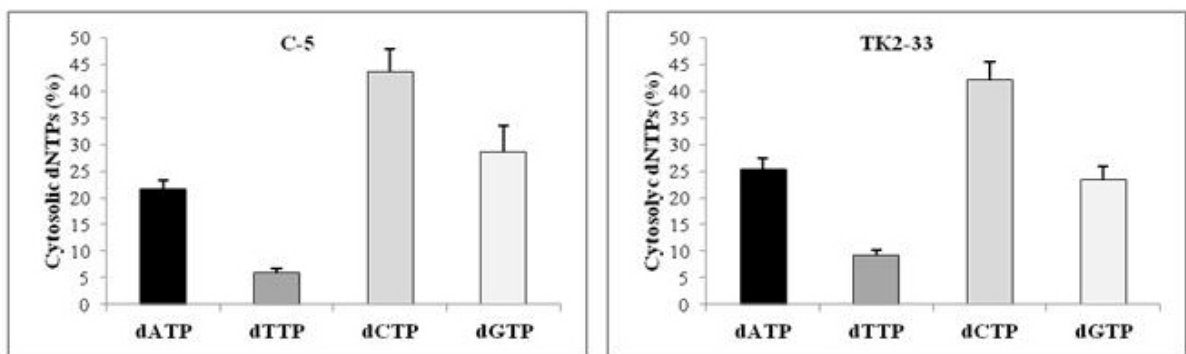


Figure 4. Relative dNTP composition of mitochondrial and cytosolic pools. Measurement of the relative abundance of the 4 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) in cytosolic (A) and mitochondrial (B) sub-cellular fractions in cells cultured with 0.1% dFBS 10 days post-confluency. Results are shown as the relative percentage value (%) for each dNTP in Ost TK1- control (C-11) and TK2-deficient (TK2-33) cells.

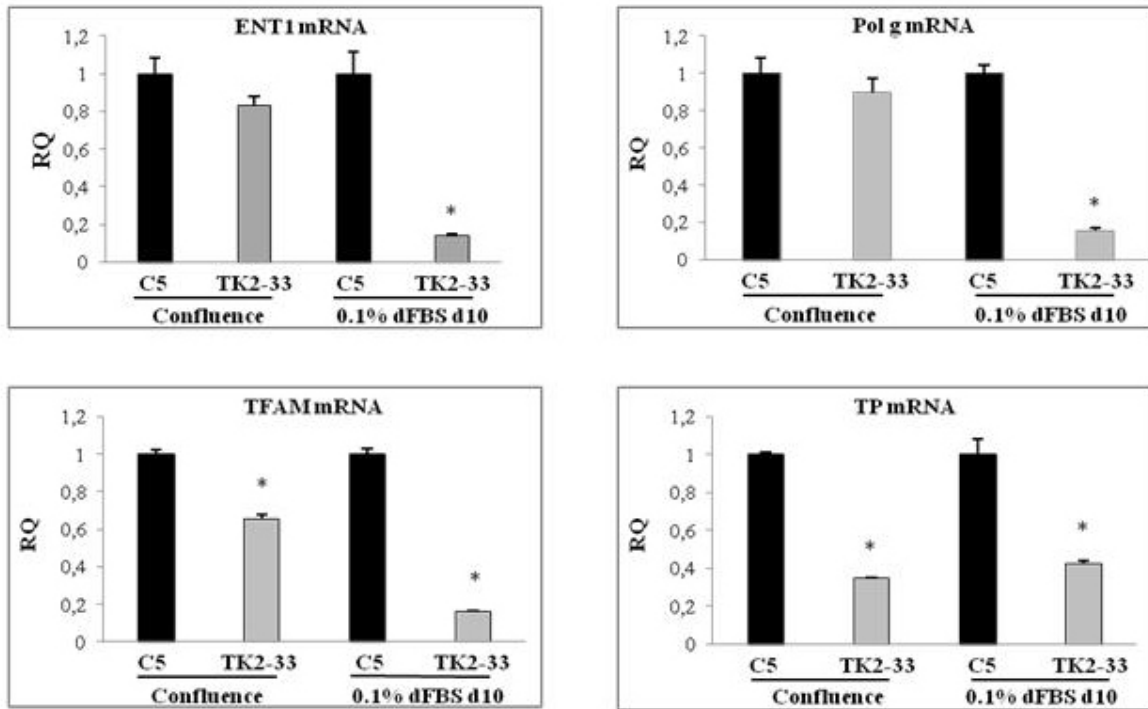


Figure 5. Expression of ENT1, Pol γ , TFAM, and TP transcripts in quiescent control (C-5) and TK2-interfered (TK2-33) Ost TK1- cells. The mRNA expression levels of ENT1, Pol γ , TFAM, and TP were analyzed by real-time RT-PCR using the cyclophilin A gene as an endogenous control. RQ: relative quantity. (*) means $p < 0.05$.

Effects of thymidine kinase 2 loss-of-function and mitochondrial DNA depletion on brown adipose tissue development in mice

Revista: International Journal of Obesity. 2010. Submitted.

Efectes de la disfunció de la timidina quinasa 2 i la depleció del DNA mitocondrial sobre el desenvolupament del teixit adipós marró en ratolins

Objectiu: Per tal de investigar el paper que juga la depleció del DNA mitocondrial en el desenvolupament del teixit adipós, hem analitzat el desenvolupament del teixit adipós marró en ratolins portadors una mutació de pèrdua de funció (H126N *knock-in*) en el gen de la timidina quinasa 2 mitocondrial. **Disseny:** Els ratolins foren analitzats a durant el període temprà postnatal de desenvolupament, abans que alteracions sistèmiques evidents comprometessin importants funcions fisiològiques i la viabilitat dels animals. **Resultats:** L'absència de timidina quinasa 2 funcional en el moment del naixement no modificava significativament ni la mida del teixit adipós marró, ni el contingut de DNA mitocondrial. Malgrat això, els ratolins mutants de dues setmanes d'edat presentaven una hipotròfia lleu de l'adipós marró, associada amb una expressió disminuïda dels transcrits i proteïnes codificades pel DNA mitocondrial, absència de alteracions en l'expressió nuclear dels gens OXPHOS, una morfologia mitocondrial anormal, i una reducció moderada de l'activitat respiratòria del complex IV. Tots aquests canvis no resultaven en una alteració de l'expressió gènica de gens marcadors generals d'adipogènesi, però conduïen a una disminució de l'expressió de gens involucrats específicament en la funció termogènica del teixit adipós marró. **Conclusions:** Concloem així que, malgrat la presència d'alteracions moderades de la funció mitocondrial, l'accentuada depleció del DNA mitocondrial en el teixit adipós marró és compatible amb la preservació de les principals característiques del desenvolupament d'aquest teixit.

Effects of thymidine kinase 2 loss-of-function and mitochondrial DNA depletion on brown adipose tissue development in mice

Joan Villarroya¹, Beatriz Dorado², Elena Garcia-Arumí³, Maya R. Vilà², Marta Giralt¹,
Michio Hirano², Francesc Villarroya¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; ²Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA. ³Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, Spain.

Running head: Adipose tissue in TK2 knock-in mice

Correspondence:

Francesc Villarroya, PhD

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia.

Universitat de Barcelona

Avda Diagonal 645. 08028-Barcelona. Spain

Tel. 34 934021525, FAX 34 934021559

E mail: fvillarroya@ub.edu

Abstract

Objective: In order to investigate the role of mitochondrial DNA depletion in adipose tissue development, we analyzed brown adipose tissue development in mice bearing a loss-of-function mutation (H126N knock-in) in the mitochondrial thymidine kinase 2 gene. **Design:** Mice were studied in the early postnatal developmental period, before overt systemic alterations compromise major physiological functions and viability. **Results:** At birth, the lack of thymidine kinase 2 function did not modify significantly either the size of brown adipose tissue or its mitochondrial DNA content. However, two week-old mice mutant mice exhibited a mild hypotrophy of brown fat, in association with a reduced expression of mitochondrial DNA-encoded transcripts and proteins, unaltered expression of nuclear OXPHOS genes, abnormal morphology of mitochondria and a moderate reduction in mitochondrial complex IV respiratory activity. All these changes did not result in alterations in the expression of marker genes of overall adipogenesis but led to a reduction in the expression of genes involved in the specific brown fat thermogenic function. **Conclusions:** It is concluded that, despite the presence of mild alterations in mitochondrial function, a profound mitochondrial DNA depletion in brown adipose tissue is compatible with a preservation of major features of brown fat development.

Keywords: mitochondrial DNA, TK2, brown adipose tissue, development.

Introduction

Recent data from studies on distinct human pathologies, from obesity to lipodystrophy, indicate that mtDNA levels and function may be essential for adipose tissue biology (208). Depletion of mtDNA in HIV-1-infected patients treated with inhibitors of viral reverse transcriptase is considered a main cause of lipodystrophy, an alteration in adipose tissue distribution taking place in a substantial number of patients (155-157). In obese patients, there have been conflicting reports, and even an increase in mtDNA levels in adipose tissue have been reported, specially in patients with concomitant type II diabetes (134-136).

Recently, rodent models of mitochondrial DNA depletion have been developed through targeted invalidation or gene replacement with a non-function form of the thymidine kinase-2 (TK2) gene (196, 203). TK2 is responsible for the provision of phosphorylated deoxythymidine inside mitochondria in differentiated, non-proliferating, cells and tissues. Therefore, TK2 activity is considered to be essential for the maintenance of appropriate levels of mtDNA by the provision of the required deoxynucleotides for mtDNA replication. Accordingly, null mutations of the TK2 gene, such as the H126N mutation, lead to mtDNA depletion and multiple neuromuscular pathologies in patients (61, 72-73, 75, 209-210); and experimental invalidation of the TK2 gene in mice mimics in part these alterations (196, 203). However, the impact of TK2 loss-of-function in mtDNA depletion in distinct tissues is highly variable, from profound mtDNA loss in neural tissues to very moderate depletion in liver or kidney.

These rodents models could be useful tools to investigate the role of mtDNA depletion in adipose tissue, provided that TK2 deficiency lead to substantial depletion in mtDNA in fat. This was a fact difficult to predict due to the lack of reports on the specific role of TK2 activity in the maintenance of mtDNA in the adipose cell.

In the present study, brown adipose tissue (BAT) from TK2 knock-in mice has been analyzed, a profound depletion in mtDNA levels has been established and the consequences on mitochondrial function and on the acquisition of the brown adipose tissue functional features have analyzed. The developmental regulation of changes in TK2 gene expression and relative abundance in mtDNA levels during BAT development has also been determined.

Materials and methods

Animal and tissue collection. For this study we analyzed homozygous mice harboring an H126N TK2 mutation. This mutation leads to an enzymatically inactive form of mitochondrial thymidine kinase (TK2). Thirteen-day-old homozygous (TK2^{-/-}) and wt (TK2^{+/+}) littermate mice were sacrificed and interscapular BAT (iBAT) was dissected, a small piece of tissue was separated, cut up into small pieces and stored at 4°C with fixation buffer (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) for subsequent transmission electron microscopy (TEM) analyses, and remaining tissue was frozen in liquid nitrogen. Newborn (1-day-old) TK2^{-/-} and TK2^{+/+} were also sacrificed to obtain BAT. For development studies, BAT from C57BL/6J mice was also collected.

Tissue samples preparation. One hundred milligrams of tissue samples were homogenized using a politron (Ultra-Turrax®, IKA Laboratory Equipment®, Staufen, Germany), RNA was isolated using a one column-based commercial kit (NuceloSpin®, Macherey-Nagel GmbH and Co., Düren, Germany), and DNA was isolated using a phenol/chloroform extraction methodology. DNA and RNA were quantified spectrophotometrically (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For protein analyses, 15 mg of tissue samples were homogenized in 300 µl of protein lyses buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 40 mM KCl, 2 mM EGTA, 5mM PMSF) and protein was quantified with a spectrophotometric system (Bradford, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Evaluation of circulating parameters. Glucose and lactate levels were measured in serum using Accutrend® technology (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Adiponectin levels were determined by immunoassay using an ELISA commercial kit (Linco Research, Saint Charles, MO, USA).

Optical and TEM microscopy analyses. BAT fixed samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% FeCNK in phosphate buffer 0.1M. After dehydration in a graded acetone series, tissue samples were embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were obtained using an Ultracut UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and examined with an optical microscopy. Later, the samples were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscopy (JEOL 1010, Tokyo, Japan).

mRNA expression analyses. One half μg of RNA was transcribed into cDNA using MultiScribe reverse transcriptase and random-hexamer primers (TaqMan Reverse Transcription Reagents; Applied Biosystems, Foster City, California, USA). For quantitative mRNA expression analysis, TaqMan reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) was performed on the ABI PRISM 7700HT sequence detection system (Applied Biosystems). The TaqMan RT-PCR reaction was performed in a final volume of 25 μl using TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG reagent and the following specific primer pair probes: TK2 (Mm00445175_m1), UCP1 (Mm00494069_m1), PGC-1 α (Mm00447183_m1), Adr β 3 (Mm00442669_m1), TFAM (Mm00447485_m1), TFB1M (Mm00524825_m1), TFB2M (Mm01620397_s1), Mtif2 (Mm00505356_m1), Mtif3 (Mm00512893_m1), UCP2 (Mm00495907_g1), UCP3 (Mm00494074_m1), SOD2 (Mm00449726_m1), RIP140 (Mm01343436_m1), Dio-2 (Mm00515664_m1), aP2 (Mm00445880_m1), PPAR γ (Mm00440945_m1), adiponectin (Mm00456425_m1), ACOX1 (Mm00443579_m1), FGF21 (Mm00840165_g1), CEBP β (Mm00843434_s1), PDK4 (Mm00443325_m1), Uqcrc1 (Mm00445911_m1), Cyt c (Mm01621044_g1), COIV (Mm00438289_g1), ATP5g3 (Mm00558162_m1) (TaqManGene Expression Assays; Applied Biosystems). Primers and probe for the detection of NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) and cytochrome b (Cyt b) mRNA and mtDNA abundance assesment were designed. Sequences were GAGCCTCAAACCTCCAAATACTCACT (forward), GAACTGATAAAAGGATAATAGCTATGGTTACTTCA (reverse), and CCGTAGCCCAAACAAT (FAM-labeled probe) for ND1 and CCCAACAGGATTAAACTCAGATGCA (forward), CTAGGGTTATGAGAATTAAGAATATGATTAGGATACCT (reverse), and TTCCATTTCACCCCTACTATACA (FAM-labelled probe) for Cyt b (Custom TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems). Cyclophilin A gene (PPIA) (Mm02342430_g1) was used as reference control.

Mitochondrial DNA relative content assessment. Quantification of mtDNA was performed through quantitative RT-PCR of cytochrome b gene and referred to nuclear DNA as determined by RT-PCR quantification of the intronless CEBP α gene (Mm00514283_s1).

Western blot and immunodetection. 5-10 μg of protein were used for western blot analysis in 0.1% SDS and 15% polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Immobilon, Millipore). Membranes were incubated with blocking buffer (5% dry milk, 0.1% Tween PBS) 1 hour at room temperature. The monoclonal antibody against the subunit I of the cytochrome oxidase (COI) was from Molecular Probes (Leiden, Nedtherlands) and

used at 1 $\mu\text{g/ml}$ concentration, as suggested. The monoclonal antibody against mitochondrial transcription factor A (TFAM) was a kind gift from Manuel Rojo. (INSERM. France) and was used at 1:200 dilution. The voltage-dependent anion channel (VDAC) monoclonal antibody (Anti-Porin 31 HL Ab-3 Mouse mAb 89-173/033) was from Calbiochem® (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA, USA) and it was used at 1 $\mu\text{g/ml}$ for the incubation. The monoclonal antibody against β -actin (clone Ac-15) was from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was used at 1:10000 dilution. In all cases membranes were incubated with 1% dry milk, 0.1% Tween PBS, O/N at 4 °C. For immunodetection a polyclonal anti-mouse secondary antibody (goat anti-mouse HRP-conjugate, Bio-Rad) was used, except for TFAM (goat anti-rabbit, HRP-conjugate, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), The ECL Reagents were used to analyze the immunoreactive signal (Immobilon Western, Millipore, Billerica, MA, USA).

Mitochondrial respiratory chain activities. Complex I plus complex III activity was determined as the velocity of reduction of cytochrome c by the enzyme NADH cytochrome c reductase in presence of NADH and rotenone. For this purpose, absorbance increment at 550 nm was measured with and without rotenone (211). Complex IV (cytochrome c oxidase) activity was measured using reduced cytochrome c as substrate. Cytochrome c oxidation was monitored at 550 nm (212). This enzyme catalyses the acetyl-coenzyme A oxalacetate reaction resulting in citrate and coenzyme A. This latter product was measured using 55'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). The reaction was monitored at 412 nm (213). Citrate synthase (CS) activity was used as a marker of mitochondrial mass. Enzyme activity was expressed per mg of protein. Protein content was determined using the Coomassie Plus protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA).

Results

BAT hypotrophy in TK2^{-/-} mice. The weight of iBAT was significantly lower in TK2^{-/-} mice respect to wild-type littermates. However, when referred to body weight, although it remained lower, the difference was not statistically significant. The protein content of iBAT also showed a significant reduction, thus confirming the minor development of iBAT in TK2^{-/-} mice. These changes occurred in the absence of significant alterations in metabolic parameters such as plasma glucose, plasma lactate, and plasma adiponectin levels (Table 1).

Alterations in mitochondrial morphology in iBAT from TK2^{-/-} mice. Examination of gross microscopy morphology of iBAT from TK2^{-/-} mice did not indicate large alterations (Fig 1, up). However, when brown adipocytes were examined by electron transmission microscopy, abnormal development of mitochondria was evidenced. In brown adipocytes from TK2^{-/-} mice, mitochondria occupy a larger cytoplasmic space respect to TK2^{+/+} adipocytes. Mitochondria appear regularly developed, with well developed cristae, but clumps of mitochondria, densely packed one to other, were evident (Fig 1, down).

mtDNA depletion and impaired expression of mtDNA-encoded transcripts in BAT from TK2^{-/-} mice. mtDNA levels were determined in iBAT from 13-day-old TK2^{-/-} mice and the corresponding TK2^{+/+} littermates. BAT from TK2^{-/-} mice showed a dramatic reduction in mtDNA abundance, to around 20% the mtDNA levels in wild-type mice. The reduction in mtDNA levels was associated with a significant reduction in mtDNA-encoded transcripts such as ND1 mRNA and Cyt b mRNA, which were significantly lowered. However, the transcript levels for nuclear DNA-encoded components of the OXPHOS system (Uqcrc1, Cyt c, COIV and ATP5g3) were unaltered (Fig 2, A). In newborns, there were no significant changes in mtDNA relative abundance and in mtDNA-encoded transcript levels (Cyt b mRNA) (Fig 2, B).

Reduced expression of mitochondrial proteins and complex IV respiratory activity in BAT from TK2^{-/-} mice. In order to determine the potential consequences of mtDNA depletion on mitochondrial function in BAT, immunoblot analysis for selected mitochondrial proteins was performed. A dramatic reduction of TFAM levels was observed in BAT from TK2^{-/-} mice, and, in fact, TFAM immunoblot signal was hardly detectable in the TK2^{-/-} mice. TK2^{-/-} mice showed a mild reduction in the levels of the mtDNA-encoded protein COI, and also in the nuclear-encoded mitochondrial protein VDAC (Fig 3, A). These data indicate that mtDNA depletion in TK2^{-/-} mice was associated with a moderate reduction in overall mitochondriogenesis, despite a dramatic reduction in a protein directly associated with mtDNA, such as TFAM.

In order to determine whether the above mentioned changes had consequences on mitochondrial OXPHOS function, the enzymatic activity of mitochondrial respiratory complexes was analyzed. Whereas there were no significant differences in complex I+III activity, there was a significant reduction in complex IV (cytochrome c oxidase) activity in iBAT from TK2^{-/-}. When complex IV activity was expressed as relative to citrate synthase activity, an index of mitochondrial mass, the levels of activity remained lower but difference was not statistically significant (Fig3, B).

Impaired expression of nuclear genes involved in thermogenesis in BAT from TK2^{-/-} mice. Table 2 shows transcript levels of nuclear genes encoding proteins involved in distinct aspects of BAT metabolism and physiological functions. No statistically significant changes were found in BAT from TK2^{-/-} mice respect to TK2^{+/+} littermates for expression of transcripts encoding proteins related to mtDNA expression regulation, to mitochondrial oxidative stress protection, overall adipogenesis or lipid metabolism. In contrast, the expression of two key genes for BAT thermogenesis, uncoupling protein-1 and PGC-1 α , were significantly down-regulated. The expression of these two thermogenic genes in 1-day-old newborn mice was found to be unaltered.

Developmental regulation of TK2 gene expression and mtDNA levels in BAT. TK2 mRNA expression in BAT from fetuses is lower than in adults. After birth, TK2 mRNA increases, reaching the highest levels in day 2 after birth and it is as high as in adults when mice were 13-day-old. Concerning mtDNA levels, they increase progressively after birth, reaching a maximum in the day 21 of life, when mtDNA abundance was even higher than those in adults.

Discussion

In the present study, TK2^{-/-} mice were used as a model to investigate the role of mtDNA depletion in adipose tissue and to establish the specific alterations in BAT taking place as a consequence of TK2 loss-of-function and mtDNA depletion. As stated in a previous report (196), TK2^{-/-} mice can only be studied before day 13 of life, as they develop severe weakness and spontaneous death after this age. The requirement of studying mice at this early age precluded the possibility of a reliable study of white adipose tissue, which is very poorly developed at this stage of mouse development, and we had to focus our study in brown adipose tissue, the type of adipose tissue developing in early mouse development.

The extent of mtDNA depletion in BAT from 13-day-old TK2^{-/-} pups was very profound, around 12%, in the range of the other most affected tissues, such as brain or spinal cord, and much more intense than in tissues such as liver or kidney, that only show around 60-70% depletion (196). Remarkably, no such depletion was found in BAT from 1-day-old TK2^{-/-} neonates, thus indicating that mtDNA depletion in BAT develop in the postnatal period. This observation is consistent with the profile of TK2 expression during BAT development, showing a marked postnatal induction. During the late fetal period, BAT

develops and differentiates progressively due to increased proliferation and differentiation of brown adipocytes (125). However, it is expected that, after birth, proliferative processes are much reduced and BAT becomes an essentially postmitotic tissue. The increase in TK2 gene expression in postnatal BAT is likely to be associated with the post-mitotic status of brown adipocytes after birth, and could explain that BAT mtDNA replication becomes strongly dependent on TK2 activity only in the postnatal period.

The depletion of mtDNA in BAT resulted in a significant reduction in the levels of expression of mtDNA-encoded transcripts with no effects on the expression of nuclear-encoded transcripts for components of mitochondrial respiratory function. The extent of reduction of mtDNA-encoded transcripts was milder than the extent of mtDNA depletion itself. When the levels of a representative mtDNA-encoded protein (COI) were determined, a reduction was also observed in TK2^{-/-} mice but of a much milder extent than mtDNA depletion. The final consequence of these alterations in the activity of mitochondrial respiratory complexes indicated a significant but quantitatively moderate reduction (complex IV) or even no changes (complex I+III).

Although the expression of the nuclear-encoded genes for mitochondrial proteins was generally not affected in BAT from TK2^{-/-} mice, the expression of TFAM protein (but not TFAM transcript) was dramatically down-regulated. This may be due to the known role of TFAM as an mtDNA-coating protein (44). It has been reported that mtDNA depletion accompanies low levels of TFAM without a decrease in its mRNA levels (194). It is likely, therefore, that TFAM reduction was indirectly caused by the reduction in mtDNA levels elicited by TK2 loss of function.

Microscopy and biochemical analysis indicated that mtDNA depletion was not associated with massive alterations in brown adipocyte development and cell morphology and, for instance, the accumulation of lipid droplets was essentially unchanged. However, electron microscopy revealed the surprising finding of an altered morphology of the mitochondrial distribution in brown adipocytes from TK2^{-/-} mice, essentially showing the presence of clumps of highly packaged mitochondria in the cell cytoplasm. This abnormality may be reminiscent of the accumulation of aberrant mitochondria appearing in muscle from patients with some mtDNA diseases, leading to the ragged-red fibers (195); or to the mitochondrial proliferation reported in adipose tissue from HIV-1 patients with lipodystrophy and mtDNA depletion (158-159, 169). However, expression of mitochondrial proteins, such as VDAC, did not suggest overt enhancement of mitochondrial proliferation as a consequence of mtDNA depletion in BAT. Further research will be required to

establish the relationship between mitochondrial morphology alterations but a mainly preserved mitochondrial oxidative function in BAT from TK2^{-/-} mice.

When the possibility that mtDNA depletion causes changes in specific adipocyte function was explored, results were mostly negative and no major alterations were observed in brown adipocyte morphology, in the pattern of adipose-specific gene expression or in the levels of serum adiponectin, an adipokine produced by adipose tissue. The exception was genes specifically involved in BAT thermogenic function that were abnormally down-regulated. It may happen that, through unknown mechanisms, lowered mtDNA levels elicit a specific impairment of the expression of thermogenesis-related genes in the brown adipocyte. However, to the light of the multi-systemic mtDNA depletion taking place in TK2^{-/-} mice (196), other possibilities should also be considered. For instance, BAT thermogenic activity is known to be under the control of the sympathetic nervous system acting on BAT (10). Considering that the nervous tissue is among the most affected tissues in TK2^{-/-} mice, it cannot be excluded that the reduction of thermogenic activity in BAT was not a direct consequence of mtDNA depletion in brown adipocytes, but an indirect consequence of altered sympathetic nervous system activity.

In summary, our present study establishes that very low levels of mtDNA are compatible with near-to-normal BAT function. This indicates that cellular regulatory mechanisms can ensure that the remaining mtDNA levels are more efficiently transcribed and translated thus leading to a mostly preserved mitochondrial function. Although these findings should be translated to human pathology with caution, several suggestions can be raised. Thus, the present results would suggest that mtDNA depletion may not be necessarily the major factor determining the profound adipose tissue alterations in HIV-1 patients with lipodystrophy, the human pathology most commonly associated with mtDNA depletion in adipose tissue (155). In fact, recent data indicate that, in these patients, atrophied and hypertrophied adipose tissue depots share common levels of mtDNA depletion (157, 201), making unlikely that mtDNA depletion solely contribute to the outcome of adipose tissue alterations. In any case, further research models should be developed to allow for the analysis of the role of mtDNA depletion in white adipose tissue and not only in BAT. Finally, the existence of powerful compensatory mechanisms capable to compensate profound mtDNA depletion deserves further research, as their molecular mechanisms of action constitute potential therapeutic targets to ameliorate disturbances in mtDNA depletion syndromes.

Acknowledgements

Supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01896), Instituto de Salud Carlos III (PI081715 and Red de Investigación en SIDA) and FIPSE (36610/06), Spain

Disclosure statement

There are no conflicts of interest among the authors.

References

1. Poyton RO, McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:563-607.
2. Mitchell P. The Ninth Sir Hans Krebs Lecture. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur J Biochem.* 1979 Mar 15;95(1):1-20.
3. Wallace. Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;51:612-21.
4. Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Montoya J. Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription. *Biol Chem.* 1999 Jul-Aug;380(7-8):737-47.
5. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 1997 Apr;29(2):109-19.
6. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Feb 9;1410(2):103-23.
7. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 1991 Apr;71(2):541-85.
8. Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, et al. Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Nov;283(5):E1040-5.
9. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):349-52.

10. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):277-359.
11. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1:3-10.
12. Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol.* 1987 Oct;123(2):364-74.
13. Heerdt BG, Augenlicht LH. Changes in the number of mitochondrial genomes during human development. *Exp Cell Res.* 1990 Jan;186(1):54-9.
14. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 2004 Feb 15;18(4):357-68.
15. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(4):1354-66.
16. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 15;91(4):1309-13.
17. Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* 1993 Mar;7(3):380-92.
18. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res.* 2004 Sep 17;95(6):568-78.
19. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, et al. ERRalpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6570-5.
20. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6472-7.
21. Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):13134-41.
22. Evans MJ, Scarpulla RC. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem.* 1989 Aug 25;264(24):14361-8.

23. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005 Jun;1(6):361-70.
24. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond).* 2005 Mar;29 Suppl 1:S5-9.
25. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, et al. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2003 Jul 1;373(Pt 1):155-65.
26. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1645-8.
27. White R, Morganstein D, Christian M, Seth A, Herzog B, Parker MG. Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):39-45.
28. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005 Jun 3;121(5):671-4.
29. Montoya J, Gaines GL, Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell.* 1983 Aug;34(1):151-9.
30. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:289-333.
31. Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature.* 1981 Apr 9;290(5806):465-70.
32. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, et al. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):615-25.
33. Fisher RP, Clayton DA. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol.* 1988 Aug;8(8):3496-509.
34. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(3):289-94.
35. McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(4):1116-25.

36. Prieto-Martin A, Montoya J, Martinez-Azorin F. A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *FEBS Lett.* 2001 Aug 10;503(1):51-5.
37. Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem.* 1992 Feb 15;267(5):3358-67.
38. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:409-35.
39. Cotney J, Shadel GS. Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *J Mol Evol.* 2006 Nov;63(5):707-17.
40. McCulloch V, Shadel GS. Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(16):5816-24.
41. Rantanen A, Gaspari M, Falkenberg M, Gustafsson CM, Larsson NG. Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm Genome.* 2003 Jan;14(1):1-6.
42. Metodiev MD, Lesko N, Park CB, Camara Y, Shi Y, Wibom R, et al. Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):386-97.
43. Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim Biophys Acta.* 1995 May 24;1271(1):127-34.
44. Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, et al. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 2003 Mar 15;31(6):1640-5.
45. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med.* 2008;59:131-46.
46. Walberg MW, Clayton DA. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 1981 Oct 24;9(20):5411-21.
47. Doda JN, Wright CT, Clayton DA. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6116-20.

48. Brown TA, Clayton DA. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):2004-10.
49. Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, et al. Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell.* 2002 Nov 15;111(4):495-505.
50. O'Brien TW. Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene.* 2002 Mar 6;286(1):73-9.
51. Rorbach J, Soleimanpour-Lichaei R, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. How do mammalian mitochondria synthesize proteins? *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1290-1.
52. Williams RS. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J Biol Chem.* 1986 Sep 15;261(26):12390-4.
53. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989 Oct 27;246(4929):500-3.
54. King MP, Attardi G. Mitochondria-mediated transformation of human rho(0) cells. *Methods Enzymol.* 1996;264:313-34.
55. Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ET. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1751-8.
56. Buchet K, Godinot C. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4;273(36):22983-9.
57. Marchetti P, Susin SA, Decaudin D, Gamen S, Castedo M, Hirsch T, et al. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res.* 1996 May 1;56(9):2033-8.
58. Lee MS, Kim JY, Park SY. Resistance of rho(0) cells against apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Apr;1011:146-53.
59. Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG. Mechanism of mitochondrial stress-induced resistance to apoptosis in mitochondrial DNA-depleted C2C12 myocytes. *Cell Death Differ.* 2005 Mar;12(3):266-78.
60. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, et al. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet.* 1991 Mar;48(3):492-501.

61. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):342-4.
62. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, et al. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2005 Jun;76(6):1081-6.
63. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, et al. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2007 Jun;39(6):776-80.
64. Rampazzo C, Johansson M, Gallinaro L, Ferraro P, Hellman U, Karlsson A, et al. Mammalian 5'(3')-deoxyribonucleotidase, cDNA cloning, and overexpression of the enzyme in *Escherichia coli* and mammalian cells. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5409-15.
65. Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:349-74.
66. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science.* 1999 Jan 29;283(5402):689-92.
67. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem.* 2002 Feb 8;277(6):4128-33.
68. Marti R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Mar 28;303(1):14-8.
69. Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1913-21.
70. Taanman JW, Bodnar AG, Cooper JM, Morris AA, Clayton PT, Leonard JV, et al. Molecular mechanisms in mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997 Jun;6(6):935-42.
71. Durham SE, Bonilla E, Samuels DC, DiMauro S, Chinnery PF. Mitochondrial DNA copy number threshold in mtDNA depletion myopathy. *Neurology.* 2005 Aug 9;65(3):453-5.

72. Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, et al. Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology*. 2002 Oct 22;59(8):1197-202.
73. Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol*. 2006 Aug;63(8):1122-6.
74. Tritschler HJ, Andreetta F, Moraes CT, Bonilla E, Arnaudo E, Danon MJ, et al. Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology*. 1992 Jan;42(1):209-17.
75. Vila MR, Segovia-Silvestre T, Gamez J, Marina A, Naini AB, Meseguer A, et al. Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1203-5.
76. Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 2001 Nov;29(3):337-41.
77. Mitsuya H, Yarchoan R, Broder S. Molecular targets for AIDS therapy. *Science*. 1990 Sep 28;249(4976):1533-44.
78. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, Gallo RC, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(20):7096-100.
79. Lim SE, Copeland WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23616-23.
80. Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet*. 1991 Mar 2;337(8740):508-10.
81. Casademont J, Barrientos A, Grau JM, Pedrol E, Estivill X, Urbano-Marquez A, et al. The effect of zidovudine on skeletal muscle mtDNA in HIV-1 infected patients with mild or no muscle dysfunction. *Brain*. 1996 Aug;119 (Pt 4):1357-64.
82. Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med*. 1990 Apr 19;322(16):1098-105.

83. Grau JM, Masanes F, Pedrol E, Casademont J, Fernandez-Sola J, Urbano-Marquez A. Human immunodeficiency virus type 1 infection and myopathy: clinical relevance of zidovudine therapy. *Ann Neurol*. 1993 Aug;34(2):206-11.
84. Masanes F, Pedrol E, Grau JM, Coll-Vinent B, Casademont J, Miro O, et al. Symptomatic myopathies in HIV-1 infected patients untreated with antiretroviral agents--a clinico-pathological study of 30 consecutive patients. *Clin Neuropathol*. 1996 Jul-Aug;15(4):221-5.
85. Masanes F, Barrientos A, Cebrian M, Pedrol E, Miro O, Casademont J, et al. Clinical, histological and molecular reversibility of zidovudine myopathy. *J Neurol Sci*. 1998 Aug 14;159(2):226-8.
86. de Mendoza C, de Ronde A, Smolders K, Blanco F, Garcia-Benayas T, de Baar M, et al. Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Mar;20(3):271-3.
87. Miro O, Lopez S, Pedrol E, Rodriguez-Santiago B, Martinez E, Soler A, et al. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antivir Ther*. 2003 Aug;8(4):333-8.
88. Walker UA, Bauerle J, Laguno M, Murillas J, Mauss S, Schmutz G, et al. Depletion of mitochondrial DNA in liver under antiretroviral therapy with didanosine, stavudine, or zalcitabine. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):311-7.
89. Haugaard SB, Andersen O, Pedersen SB, Dela F, Richelsen B, Nielsen JO, et al. Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol*. 2005 Sep;77(1):29-38.
90. Mitchell SW. Singular case of absence of adipose matter in the upper half of the body. *Am J Med Sci*. 1885:105-6.
91. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998 May 7;12(7):F51-8.
92. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*. 1995 Feb 17;267(5200):988-93.
93. Lo JC, Mulligan K, Tai VW, Algren H, Schambelan M. Body shape changes in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998 Nov 1;19(3):307-8.

94. Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet*. 1999 Jun 19;353(9170):2093-9.
95. Dube MP, Johnson DL, Currier JS, Leedom JM. Protease inhibitor-associated hyperglycaemia. *Lancet*. 1997 Sep 6;350(9079):713-4.
96. Sutinen J, Hakkinen AM, Westerbacka J, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Halavaara J, et al. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *AIDS*. 2002 Nov 8;16(16):2183-93.
97. Tong Q, Sankale JL, Hadigan CM, Tan G, Rosenberg ES, Kanki PJ, et al. Regulation of adiponectin in human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to body composition and metabolic indices. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr;88(4):1559-64.
98. Miller J, Carr A, Emery S, Law M, Mallal S, Baker D, et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Med*. 2003 Jul;4(3):293-301.
99. Villarroya F, Domingo P, Giralt M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 Feb;26(2):88-93.
100. Eriksson S, Cederlund E, Bergman T, Jornvall H, Bohman C. Characterization of human deoxycytidine kinase. Correlation with cDNA sequences. *FEBS Lett*. 1991 Mar 25;280(2):363-6.
101. Eriksson S, Kierdaszuk B, Munch-Petersen B, Oberg B, Johansson NG. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Apr 30;176(2):586-92.
102. Eriksson S, Munch-Petersen B, Kierdaszuk B, Arner E. Expression and substrate specificities of human thymidine kinase 1, thymidine kinase 2 and deoxycytidine kinase. *Adv Exp Med Biol*. 1991;309B:239-43.
103. Rylova SN, Albertioni F, Flygh G, Eriksson S. Activity profiles of deoxynucleoside kinases and 5'-nucleotidases in cultured adipocytes and myoblastic cells: insights into mitochondrial toxicity of nucleoside analogs. *Biochem Pharmacol*. 2005 Mar 15;69(6):951-60.
104. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
105. Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*. 1993 Oct 25;268(30):22369-76.

106. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1482-8.
107. Lewis W, Kohler JJ, Hosseini SH, Haase CP, Copeland WC, Bienstock RJ, et al. Antiretroviral nucleosides, deoxynucleotide carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *AIDS*. 2006 Mar 21;20(5):675-84.
108. Jan V, Cervera P, Maachi M, Baudrimont M, Kim M, Vidal H, et al. Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther*. 2004 Aug;9(4):555-64.
109. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, Francia E, Lagarda E, Sambeat MA, et al. Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy. *AIDS*. 1999 Nov 12;13(16):2261-7.
110. Domingo P, Vidal F, Domingo JC, Veloso S, Sambeat MA, Torres F, et al. Tumour necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients: potential role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest*. 2005 Dec;35(12):771-80.
111. McComsey GA, Paulsen DM, Lonergan JT, Hessenthaler SM, Hoppel CL, Williams VC, et al. Improvements in lipoatrophy, mitochondrial DNA levels and fat apoptosis after replacing stavudine with abacavir or zidovudine. *AIDS*. 2005 Jan 3;19(1):15-23.
112. Weaver JG, Tarze A, Moffat TC, Lebras M, Deniaud A, Brenner C, et al. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J Clin Invest*. 2005 Jul;115(7):1828-38.
113. Ben-Romano R, Rudich A, Etzion S, Potashnik R, Kagan E, Greenbaum U, et al. Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir Ther*. 2006;11(8):1051-60.
114. Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6770-5.
115. Lloreta J, Domingo P, Pujol RM, Arroyo JA, Baixeras N, Matias-Guiu X, et al. Ultrastructural features of highly active antiretroviral therapy-associated partial lipodystrophy. *Virchows Arch*. 2002 Dec;441(6):599-604.
116. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, Domingo JC, Arroyo JA, Sambeat MA, et al. Switching to nevirapine decreases insulin levels but does not improve subcutaneous adipocyte apoptosis in patients with highly active antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *J Infect Dis*. 2001 Nov 1;184(9):1197-201.

117. Dagon Y, Avraham Y, Berry EM. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2alpha in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 3;340(1):43-7.
118. Birk RZ, Rubinstein M. IFN-alpha induces apoptosis of adipose tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 30;345(2):669-74.
119. Lagathu Cea. PIs and NRTIs increase oxidative stress and proinflammatory cytokine and chemokine production in human and murine adipocytes and macrophages *Antivir Ther.* 2005;10.
120. Agrawal L, Louboutin JP, Strayer DS. Preventing HIV-1 Tat-induced neuronal apoptosis using antioxidant enzymes: mechanistic and therapeutic implications. *Virology.* 2007 Jul 5;363(2):462-72.
121. Prakash O, Teng S, Ali M, Zhu X, Coleman R, Dabdoub RA, et al. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein potentiates zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice. *Arch Biochem Biophys.* 1997 Jul 15;343(2):173-80.
122. Raidel SM, Haase C, Jansen NR, Russ RB, Sutliff RL, Velsor LW, et al. Targeted myocardial transgenic expression of HIV Tat causes cardiomyopathy and mitochondrial damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 May;282(5):H1672-8.
123. Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Dec 6;1659(2-3):178-89.
124. Muthumani K, Choo AY, Premkumar A, Hwang DS, Thieu KP, Desai BM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death Differ.* 2005 Aug;12 Suppl 1:962-70.
125. Villena JA, Carmona MC, Rodriguez de la Concepcion M, Rossmeisl M, Vinas O, Mampel T, et al. Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Nov;59(11):1934-44.
126. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006 May;3(5):333-41.
127. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, et al. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(3):1085-94.

128. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1281-9.
129. Shi X, Burkart A, Nicoloso SM, Czech MP, Straubhaar J, Corvera S. Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30658-67.
130. Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6650-6.
131. Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, et al. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. 2006 Apr;49(4):784-91.
132. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1751-60.
133. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2006 Feb;49(2):394-7.
134. Dahlman I, Forsgren M, Sjogren A, Nordstrom EA, Kaaman M, Naslund E, et al. Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1792-9.
135. Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjolín E, Dahlman I, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*. 2007 Dec;50(12):2526-33.
136. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes*. 2005 May;54(5):1392-9.
137. Pietilainen KH, Naukkarinen J, Rissanen A, Saharinen J, Ellonen P, Keranen H, et al. Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. *PLoS Med*. 2008 Mar 11;5(3):e51.
138. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum Genet*. 2003 Oct;113(5):432-6.

139. Liguori R, Mazzaccara C, Pasanisi F, Buono P, Oriani G, Finelli C, et al. The mtDNA 15497 G/A polymorphism in cytochrome b in severe obese subjects from Southern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Oct;16(7):466-70.
140. Rivera MA, Perusse L, Gagnon J, Dionne FT, Leon AS, Rao DC, et al. A mitochondrial DNA D-loop polymorphism and obesity in three cohorts of women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Jun;23(6):666-8.
141. Guo LJ, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, et al. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion*. 2005 Feb;5(1):15-33.
142. Parker E, Phillips DI, Cockington RA, Cull C, Poulton J. A common mitochondrial DNA variant is associated with thinness in mothers and their 20-yr-old offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Dec;289(6):E1110-4.
143. Casali C, Fabrizi GM, Santorelli FM, Colazza G, Villanova M, Dotti MT, et al. Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology*. 1999 Mar 23;52(5):1103-4.
144. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23;1658(1-2):80-8.
145. Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve*. 1995;3:S102-6.
146. Pineda M, Solano A, Artuch R, Andreu AL, Playan A, Vilaseca MA, et al. Peripheral neuropathy with ataxia in childhood as a result of the G8363A mutation in mitochondrial DNA. *Pediatr Res*. 2004 Jul;56(1):55-9.
147. Guallar JP, Vila MR, Lopez-Gallardo E, Solano A, Domingo JC, Gamez J, et al. Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA(Lys) point mutations in mitochondrial DNA. *Mol Genet Metab*. 2006 Nov;89(3):283-5.
148. Vila MR, Gamez J, Solano A, Playan A, Schwartz S, Santorelli FM, et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):800-2.
149. Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaForgue D, Timsit J, Virally M, Gin H, et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med*. 2001 May 1;134(9 Pt 1):721-8.
150. Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T, Kanatsuka A, Kuzuya T, Kobayashi M, et al. Clinical features of diabetes mellitus with the mitochondrial DNA 3243 (A-G) mutation in Japanese:

maternal inheritance and mitochondria-related complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 Mar;59(3):207-17.

151. Suzuki Y, Nishimaki K, Taniyama M, Muramatsu T, Atsumi Y, Matsuoka K, et al. Lipoma and ophthalmoplegia in mitochondrial diabetes associated with small heteroplasmy level of 3243 tRNA(Leu(UUR)) mutation. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004 Mar;63(3):225-9.

152. Suzuki Y, Tsukuda K, Taniyama M, Atsumi Y, Matsuoka K, Oka Y. Lipoma and sensory neuropathy in mitochondrial diabetes associated with tRNA mutation at position 3271. *Diabetes Care.* 2002 Feb;25(2):407-8.

153. Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamaki M, et al. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep;77(3):430-41.

154. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature.* 2004 May 27;429(6990):417-23.

155. Cote HC. Possible ways nucleoside analogues can affect mitochondrial DNA content and gene expression during HIV therapy. *Antivir Ther.* 2005;10(Suppl 2):M3-11.

156. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepcion ML, Alegre M, Domingo JC, et al. HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther.* 2006;11(6):729-40.

157. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Fontdevila J, Martinez E, et al. Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS.* 2008 Mar 12;22(5):575-84.

158. Kim MJ, Jardel C, Barthelemy C, Jan V, Bastard JP, Fillaut-Chapin S, et al. Mitochondrial DNA content, an inaccurate biomarker of mitochondrial alteration in human immunodeficiency virus-related lipodystrophy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1670-6.

159. Pace CS, Martin AM, Hammond EL, Mamotte CD, Nolan DA, Mallal SA. Mitochondrial proliferation, DNA depletion and adipocyte differentiation in subcutaneous adipose tissue of HIV-positive HAART recipients. *Antivir Ther.* 2003 Aug;8(4):323-31.

160. Kim MJ, Leclercq P, Lanoy E, Cervera P, Antuna-Puente B, Maachi M, et al. A 6-month interruption of antiretroviral therapy improves adipose tissue function in HIV-infected patients: the ANRS EP29 Lipostop Study. *Antivir Ther.* 2007;12(8):1273-83.

161. Boyd MA, Carr A, Ruxrungtham K, Srasuebku P, Bien D, Law M, et al. Changes in body composition and mitochondrial nucleic acid content in patients switched from failed

nucleoside analogue therapy to ritonavir-boosted indinavir and efavirenz. *J Infect Dis.* 2006 Sep 1;194(5):642-50.

162. Hammond E, McKinnon E, Mallal S, Nolan D. Pathogenesis of lipoatrophy: analysis of tissue and plasma. *Antivir Ther.* [Abstract]. 2008;13(Suppl 4).

163. McComsey GA, Lo Re V, 3rd, O'Riordan M, Walker UA, Lebrecht D, Baron E, et al. Effect of reducing the dose of stavudine on body composition, bone density, and markers of mitochondrial toxicity in HIV-infected subjects: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis.* 2008 Apr 15;46(8):1290-6.

164. Rodriguez de la Concepcion ML, Yubero P, Domingo JC, Iglesias R, Domingo P, Villarroya F, et al. Reverse transcriptase inhibitors alter uncoupling protein-1 and mitochondrial biogenesis in brown adipocytes. *Antivir Ther.* 2005;10(4):515-26.

165. Stankov MV, Lucke T, Das AM, Schmidt RE, Behrens GM. Relationship of mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in preadipocytes treated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther.* 2007;12(2):205-16.

166. Walker UA, Bickel M, Lutke Volksbeck SI, Ketelsen UP, Schofer H, Setzer B, et al. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor--associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Feb 1;29(2):117-21.

167. Gougeon ML, Penicaud L, Fromenty B, Leclercq P, Viard JP, Capeau J. Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther.* 2004 Apr;9(2):161-77.

168. Hendrickson SL, Kingsley LA, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Jacobson LP, Palella FJ, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence lipoatrophy after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009 Jun 1;51(2):111-6.

169. Nolan D, Hammond E, Martin A, Taylor L, Herrmann S, McKinnon E, et al. Mitochondrial DNA depletion and morphologic changes in adipocytes associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *AIDS.* 2003 Jun 13;17(9):1329-38.

170. Loffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C. Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem.* 1997 Sep;174(1-2):125-9.

171. Walker UA, Auclair M, Lebrecht D, Kornprobst M, Capeau J, Caron M. Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. *Antivir Ther.* 2006;11(1):25-34.

172. Lopez S, Garrabou G, Martinez E, Domingo P, Fontdevila J, Gatell JM, et al. Mitochondrial studies in adipose tissue of HIV-infected patients without fat redistribution. *Antivir Ther.* [Abstract]. 2004;9:L20.
173. McComsey GA, Libutti DE, O'Riordan M, Shelton JM, Storer N, Ganz J, et al. Mitochondrial RNA and DNA alterations in HIV lipodystrophy are linked to antiretroviral therapy and not to HIV infection. *Antivir Ther.* 2008;13(5):715-22.
174. Deveaud C, Beauvoit B, Hagry S, Galinier A, Carriere A, Salin B, et al. Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? *Biochem Pharmacol.* 2005 Jul 1;70(1):90-101.
175. Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(22):7947-56.
176. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 23;104(4):1418-23.
177. Barthelemy C, Ogier de Baulny H, Diaz J, Cheval MA, Frachon P, Romero N, et al. Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions, and compensation. *Ann Neurol.* 2001 May;49(5):607-17.
178. Vu TH, Tanji K, Valsamis H, DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial DNA depletion in a patient with long survival. *Neurology.* 1998 Oct;51(4):1190-3.
179. Wang L, Limongelli A, Vila MR, Carrara F, Zeviani M, Eriksson S. Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol Genet Metab.* 2005 Jan;84(1):75-82.
180. Miro O, Lopez S, Rodriguez de la Concepcion M, Martinez E, Pedrol E, Garrabou G, et al. Upregulatory mechanisms compensate for mitochondrial DNA depletion in asymptomatic individuals receiving stavudine plus didanosine. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Dec 15;37(5):1550-5.
181. Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonnqvist T. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain.* 2007 Nov;130(Pt 11):3032-40.
182. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol.* 2004 May;55(5):706-12.

183. Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, Mogensen B, Duno M, Shoubridge EA, et al. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2007 Aug;81(2):383-7.
184. Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, et al. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):570-5.
185. Pontarin G, Gallinaro L, Ferraro P, Reichard P, Bianchi V. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12159-64.
186. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 5;103(49):18586-91.
187. Pontarin G, Ferraro P, Hakansson P, Thelander L, Reichard P, Bianchi V. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):16820-8.
188. Rampazzo C, Fabris S, Franzolin E, Crovatto K, Frangini M, Bianchi V. Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells. *J Biol Chem.* 2007 Nov 30;282(48):34758-69.
189. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):735-43.
190. Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):4490-7.
191. Lee EW, Lai Y, Zhang H, Unadkat JD. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem.* 2006 Jun 16;281(24):16700-6.
192. Frangini M, Rampazzo C, Franzolin E, Lara MC, Vila MR, Marti R, et al. Unchanged thymidine triphosphate pools and thymidine metabolism in two lines of thymidine kinase 2-mutated fibroblasts. *FEBS J.* 2009 Feb;276(4):1104-13.
193. Hakansson P, Hofer A, Thelander L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem.* 2006 Mar 24;281(12):7834-41.

194. Larsson NG, Oldfors A, Holme E, Clayton DA. Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 May 16;200(3):1374-81.
195. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci.* 1980 Jul;47(1):117-33.
196. Akman HO, Dorado B, Lopez LC, Garcia-Cazorla A, Vila MR, Tanabe LM, et al. Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Hum Mol Genet.* 2008 Aug 15;17(16):2433-40.
197. Villarroya F, Domingo P, Giralt M. Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond).* 2007 Dec;31(12):1763-76.
198. Addy CL, Gavrilu A, Tsiodras S, Brodovicz K, Karchmer AW, Mantzoros CS. Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):627-36.
199. Hommes MJ, Romijn JA, Endert E, Eeftinck Schattenkerk JK, Sauerwein HP. Insulin sensitivity and insulin clearance in human immunodeficiency virus-infected men. *Metabolism.* 1991 Jun;40(6):651-6.
200. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, et al. Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipoatrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):1026-31.
201. Villarroya J, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Gutierrez MM, Mateo MG, et al. Differential alterations of gene expression in visceral versus subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected, HAART-treated patients with lipodystrophy: a pilot study. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 4:A3).
202. Arnould T, Mercy L, Houbion A, Vankoningsloo S, Renard P, Pascal T, et al. mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *FASEB J.* 2003 Nov;17(14):2145-7.
203. Zhou X, Solaroli N, Bjerke M, Stewart JB, Rozell B, Johansson M, et al. Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2008 Aug 1;17(15):2329-35.

204. Kopp JB, Klotman ME, Adler SH, Bruggeman LA, Dickie P, Marinos NJ, et al. Progressive glomerulosclerosis and enhanced renal accumulation of basement membrane components in mice transgenic for human immunodeficiency virus type 1 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1577-81.
205. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2009 Jul 28.
206. Deveaud C, Beauvoit B, Salin B, Schaeffer J, Rigoulet M. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. *Mol Cell Biochem*. 2004 Dec;267(1-2):157-66.
207. Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):2240-7.
208. Villarroya J, Giralt M, Villarroya F. Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Oct;17(10):1814-20.
209. Vila MR, Villarroya J, Garcia-Arumi E, Castellote A, Meseguer A, Hirano M, et al. Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency. *J Neurol Sci*. 2008 Apr 15;267(1-2):137-41.
210. Lesko N, Naess K, Wibom R, Solaroli N, Nennesmo I, von Döbeln U, et al. Two novel mutations in thymidine kinase-2 cause early onset fatal encephalomyopathy and severe mtDNA depletion. *Neuromuscul Disord*. 2010 Jan 16.
211. Sottocasa GL, Kuylénstierna B, Ernster L, Bergstrand A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol*. 1967 Feb;32(2):415-38.
212. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994 Jul;228(1):35-51.
213. Srere P. [1] Citrate synthase : [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)] *Methods in Enzymology* 1969;13:3-11.

Table 1. Body weight, BAT weight and serum parameters in TK2^{-/-} mice. Values are means \pm SEM of 3-8 mice. Statistically significant differences between TK2^{-/-} and control TK2^{+/+} mice are shown by * P<0.05. iBAT, interscapular brown adipose tissue.

	TK2 ^{+/+}	TK2 ^{-/-}
Body weight (g)	6,77 \pm 0,36	5,98 \pm 0,68
iBAT weight (mg)	26,3 \pm 3,11	17,66 \pm 1,71*
iBAT (mg) / body weight (g)	3,77 \pm 0,22	3,06 \pm 0,35
iBAT lipid droplet content (%)	74,3 \pm 17,0	75,2 \pm 17,0
iBAT protein/ tissue (mg/g)	110,6 \pm 39,1	61,5 \pm 28,4
iBAT total protein (mg)	3,56 \pm 1,50	1,30 \pm 0,61
Serum glucose (mg/dl)	139,8 \pm 20,3	123,3 \pm 17,4
Serum lactate (mM)	4,78 \pm 1,41	4,65 \pm 0,93
Serum adiponectin (mg/ml)	6,55 \pm 0,46	5,23 \pm 0,30

Table 2: Expression of the mRNA for nuclear genes encoding proteins involved in adipogenesis, metabolism, and mitochondrial function in brown adipose tissue from TK2 knock-in mice. Values are expressed as the means \pm SEM of the percent respect to control values that were set to 100. P values for statistical comparisons are shown. Bold lettering is depicted when differences were statistically significant ($P < 0.05$). RIP140, receptor interacting protein of 140 Kda.

	mean \pm SEM	P value	Change
13-day old			
mtDNA expression regulation			
<i>Transcription factor A, mitochondrial (TFAM)</i>	82 \pm 7	0,34	
<i>Transcription factor B1, mitochondrial (TFB1M)</i>	87 \pm 4	0,15	
<i>Transcription factor B2, mitochondrial (TFB2M)</i>	92 \pm 7	0,64	
<i>Mitochondrial transcription initiation 2</i>	102 \pm 10	1,00	
<i>Mitochondrial transcription initiation 3</i>	84 \pm 14	0,66	
Mitochondrial ROS			
<i>Uncoupling protein-2</i>	112 \pm 14	0,53	
<i>Uncoupling protein-3</i>	100 \pm 6	0,70	
<i>Superoxide dismutase 2</i>	90 \pm 7	0,20	
Thermogenesis			
<i>Uncoupling protein-1</i>	70 \pm 12	0,05	Decrease
<i>PPARγ coactivator-1α (PGC1α)</i>	71 \pm 10	0,04	Decrease
<i>RIP140</i>	113 \pm 8	0,46	
<i>β3 adrenergic receptor</i>	76 \pm 12	0,28	
<i>5'-Deiodinase-2</i>	81 \pm 21	0,93	
Adipogenesis			
<i>Fatty acid binding protein-4 (aP2)</i>	93 \pm 2	0,76	
<i>Peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPARγ)</i>	85 \pm 8	0,07	
<i>Adiponectin</i>	116 \pm 3	0,41	
Lipid metabolism			
<i>Acyl CoA oxidase</i>	113 \pm 5	0,24	
<i>Fibroblast growth factor-21</i>	103 \pm 8	0,96	
<i>CCAAT/Enhancer-binding protein-β</i>	85 \pm 11	0,34	
<i>Pyruvate dehydrogenase-kinase 4</i>	86 \pm 12	0,43	
Newborn (1-day-old)			
Thermogenesis			
<i>Uncoupling protein-1</i>	96 \pm 11	0,89	
<i>PPARγ coactivator-1α (PGC1α)</i>	128 \pm 9	0,34	

Figure 1

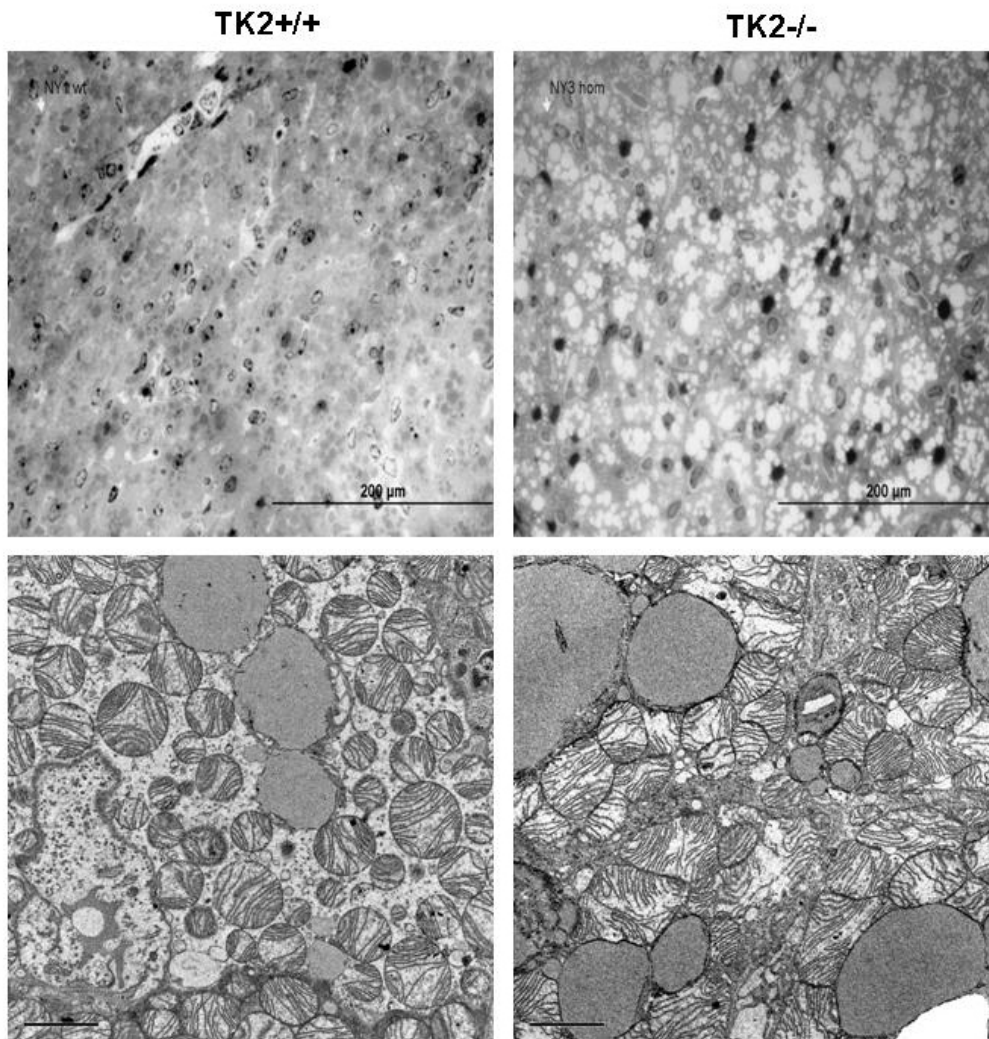


Figure 1. Representative pictures of optical (top panel) and transmission electron (bottom panel) microscopy slides of brown adipose tissue samples from TK2+/+ and TK2-/- 13-day-old mice. Scale bars: 200 μm, top panel; 2 μm, bottom panel.

Figure 2

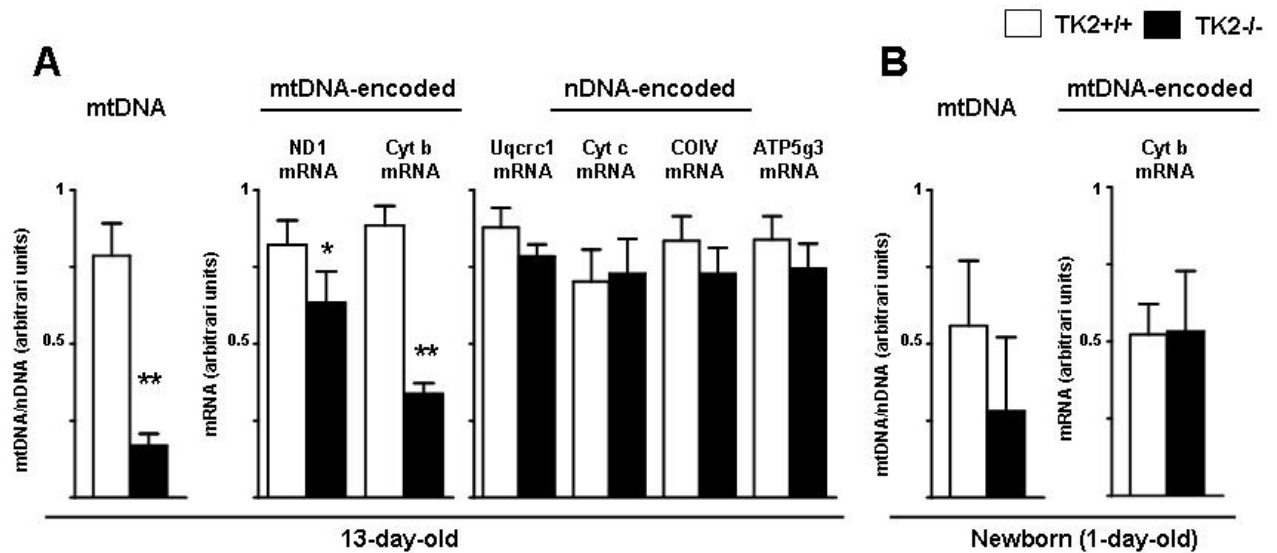


Figure 2. mtDNA relative abundance, mtDNA-encoded and nuclear DNA-encoded transcript levels in brown adipose tissue from TK2^{+/+} and TK2^{-/-} 13-day-old (A) and 1-day-old newborn (B) mice. Cyt b, cytochrome b; ND1, NADH dehydrogenase subunit 1; Uqcrc1, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1; Cyt c, cytochrome c; COIV, cytochrome c oxidase subunit IV; ATP5g3, ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F₀ complex, subunit c (subunit 9), isoform 3. Bars are means ± SEM of a 4-7 mice group. Statistically significant differences between TK2^{+/+} and TK2^{-/-} are denoted by * P<0.05; ** P<0.0001.

Figure 3

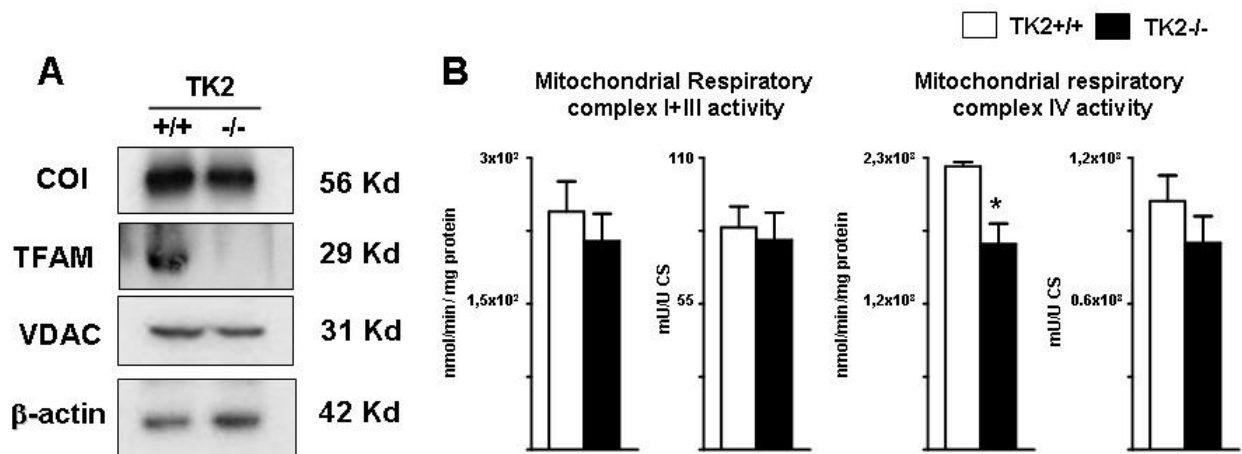


Figure 3. Representative western blot analysis of COI, TFAM, and VDAC protein (A), and mitochondrial respiratory complex activities (B) in brown adipose tissue from TK2+/+ and TK2-/- mice. Each lane corresponds to 15 mg of protein extracts. The size of the specific immunoreactive signals is indicated on the right. COI, cytochrome c oxidase subunit I; TFAM, mitochondrial transcription factor A; VDAC, voltage-dependent anion carrier. Each complex activity is expressed as nmol of final product/minutes/mg of protein and as mUnits of the complex activity/Units of citrate synthase (CS) activity. Bars are means \pm SEM of a 5-8 mice group. Statistically significant differences between TK2+/+ and TK2-/- are denoted by * $P < 0.05$.

Figure 4

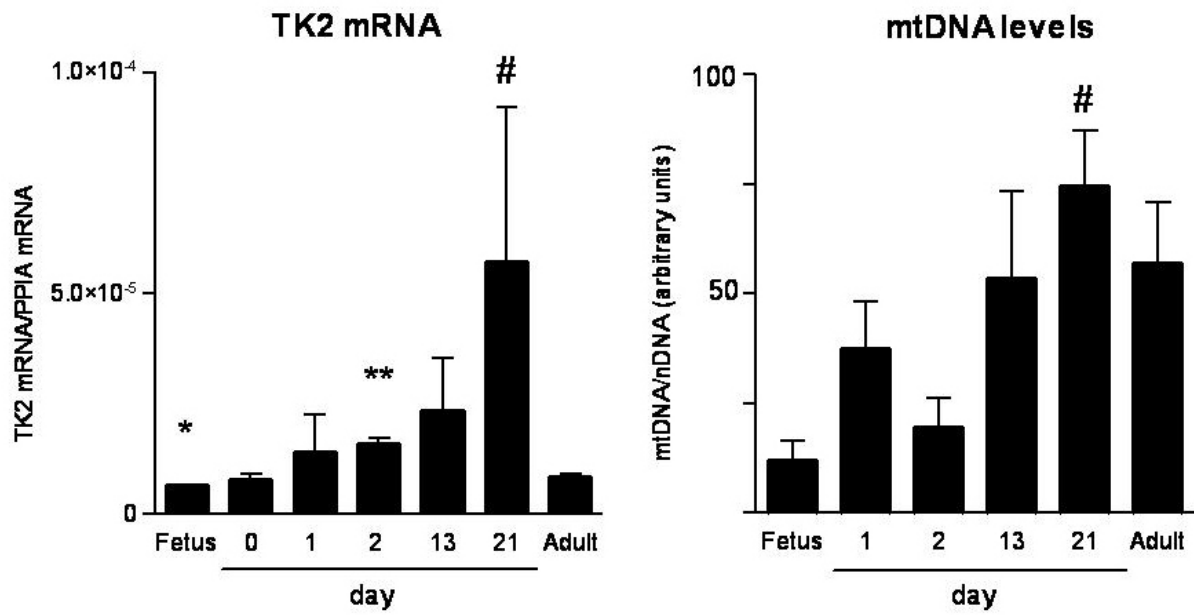


Figure 4. Thymidine kinase 2 (TK2) mRNA expression and mtDNA levels in brown adipose tissue during mice development. Bars are means \pm SEM of a 3-8 mice group. Statistically significant differences between BAT at different development stages respect to adult BAT are denoted a by * $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$, and those respect to fetal BAT by # $P < 0.05$.

HIV-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: towards a rodent model of HIV-1 lipodystrophy

Revista: Antiviral Therapy. 2010. Accepted.

L'expressió transgènica de l'HIV-1 a ratolí altera el teixit adipós i els nivells d'adipoquines: seguint un model animal de lipodistròfia associada a l'HIV-1

La lipodistròfia en pacients d'HIV-1 sembla ser conseqüència de la complexa interacció entre els efectes originats pel tractament antiretroviral i la infecció d'HIV-1. Nosaltres hem estudiat els teixits adiposos i paràmetres circulants de ratolins portadors d'un transgen de l'HIV-1 com a model experimental per a profunditzar en el paper dels events que succeeixen en el teixit adipós relacionats amb la infecció per part de l'HIV-1.

Ratolins transgènics heterozigots que expressen un constructe de l'HIV-1 de 7.7 kb (Tg26+/-) han estat objecte d'estudi. Els nivells de citoquines i adipoquines han estat quantificats utilitzant un tècnica multiplex. L'expressió gènica i l'abundància del DNA mitocondrial en teixit adipós marró, blanc visceral i blanc subcutani, va ser determinada utilitzant PCR quantitativa a temps real.

La mida del teixit visceral, però no del subcutani, era menor en els ratolins Tg26+/- respecte els controls. Els nivells de citoquines proinflamatories estaven augmentats en el sèrum dels ratolins Tg26+/-, mentre que l'adiponectina i la leptina es trobaven en menys abundància. L'expressió gènica de la proteïna quimioattractant de monòcits 1 es trobava induïda en el teixit adipós blanc, tant visceral com subcutani, mentre que el *tumor necrosis factor- α* i la interleucina-6 estaven preferencialment induïts en teixit adipós visceral i subcutani, respectivament. L'expressió gènica d'adiponectina i leptina es trobava reprimida en tots els diposits d'adipós blanc, en concordància amb una reduïda expressió de PPAR γ , que és un regulador mestre de l'adipogènesi. En teixit adipós marró es va observar una inducció coordinada en la expressió de gens marcadors de termogènesi.

Així, arribem a la conclusió que l'expressió transgènica de l'HIV-1 a ratolí causa canvis en el teixit adipós similars a les alteracions observades en pacients de lipodistròfia associada a l'HIV-1, i en particular a aquelles que tenen lloc abans del tractament. Aquestes dades donen suport al paper dels esdeveniments vinculats a la infecció per

l'HIV-1 que provoquen una disfunció en el teixit adipós, i suggereixen que el ratolí Tg26+/- podria tractar-se d'un model animal molt prometedor per a l'estudi de la lipodistròfia associada a l'HIV-1.

**HIV-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels:
towards a rodent model of HIV-1 lipodystrophy**

Joan Villarroya^{1*}, Julieta Diaz-Delfin^{1*}, Deborah Hyink², Pere Domingo³, Marta Giralt¹, Paul
E. Klotman², Francesc Villarroya¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; ²Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA, Department of Medicine, ³Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

*Both authors contributed equally to this study.

Running head: Adipose tissue in HIV-1 transgenic mice

Correspondence:

Francesc Villarroya, PhD

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia.

Universitat de Barcelona

Avda Diagonal 645. 08028-Barcelona. Spain

Tel. 34 934021525, FAX 34 934021559

E mail: fvillarroya@ub.edu

Abstract

Background: Lipodystrophy in HIV-1-infected patients appears to be the consequence of complex interactions between insults originating from antiretroviral treatment and HIV-1 infection. We have studied adipose tissues and circulating parameters in mice bearing HIV-1 transgene expression as an experimental model to get insight in the role of HIV-1 infection-related events in fat alterations.

Methods: Heterozygous transgenic mice expressing a 7.7kb HIV-1-construct (Tg26+/-) were used. Cytokine and adipokine levels were quantified using multiplex procedures. Gene expression and mitochondrial DNA abundance in visceral and subcutaneous white adipose tissues and in brown adipose tissue were determined using quantitative real-time-PCR.

Results: The size of visceral, but not subcutaneous, adipose depots was significantly lower in Tg26+/- mice. Serum pro-inflammatory cytokine levels were increased in Tg26+/- mice, whereas adiponectin and leptin levels were reduced. Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 was induced in visceral and subcutaneous white fat, whereas tumor necrosis factor- α and interleukin-6 were preferentially induced in visceral and subcutaneous white adipose tissues, respectively. Adiponectin and leptin gene expression was repressed in all white fat depots, in concert with reduced expression of PPAR γ , a master controller of adipogenesis. In brown fat, a coordinate induction in the expression of thermogenesis marker genes was observed.

Conclusions: HIV-1 transgene expression in mice causes changes in adipose tissue reminiscent of those in patients with HIV-1-lipodystrophy, particularly early pretreatment changes. These data support a role for HIV-1-infection-related events in eliciting adipose tissue dysfunction. The Tg26+/- mouse appears as a promising model to assess the own effects of HIV-1 infection on adipose tissue and for determining the impact of antiretroviral drugs on a HIV-1-infected background.

Introduction

A substantial number of HIV-1-infected patients undergoing antiretroviral treatment develop the so-called HIV-1/antiretroviral treatment-associated lipodystrophy syndrome (HALS). HALS is characterized by lipoatrophy in subcutaneous adipose tissue, visceral obesity, and lipomatosis [1], as well as systemic metabolic alterations, including insulin resistance, hypoadiponectinemia and dyslipidemia. HALS has a complex causal origin.

Antiretroviral drugs favor lipodystrophy and systemic metabolic disturbances, but there is growing evidence that events elicited directly by HIV-1-infection contribute to the development of the syndrome. Mild alterations of adipose tissue distribution and gene expression appear in HIV-1-infected, untreated (naïve), patients [2,3]. Moreover, HIV-1 infection in the absence of antiretroviral treatment may cause hypertriglyceridemia and enhanced lipolysis [4].

Rodent models of HIV-1-associated lipodystrophy are scarce and treatment of wild-type mice with antiretroviral drugs has been shown to cause minor alterations in adipose tissue [5,6]. Moreover, there is little information on the impact of HIV-1 infection on adipose tissue alterations and lipodystrophy in rodent models. A single report indicated that transgenic mice expressing the HIV-1 accessory viral protein R in liver and adipose tissue exhibit altered systemic lipid metabolism [7]. Transgenic mice expressing a 7.7 kb HIV-1 construct lacking the gag-pol genes region (Tg26 mice) have proven useful for studying disturbances associated with HIV-1 infection. Homozygous Tg26 mice exhibit an extreme phenotype that includes wasting syndrome and early mortality. However, heterozygous Tg26 mice (Tg26^{+/-}) show normal growth; their primary phenotypic abnormalities are nephropathy and skin lesion in adults [8]. Here we have analyzed Tg26^{+/-} mice for adipose tissue disturbances and related systemic alterations. Our focus was to assess whether HIV-1 infection-related events cause alterations similar to lipodystrophy, and the potential utility of Tg26^{+/-} mice as a model for HIV-1-infection-mediated adipose tissue alterations and lipodystrophy syndrome.

Materials and Methods

Mice were used in accordance with the European Community directive 86/609/EEC. Ten-week-old male Tg26^{+/-} mice and wild-type littermates were killed by decapitation, and epididymal white adipose tissue (WAT) representative of visceral, intra-abdominal, fat (vs-WAT), dorsal subcutaneous WAT (sc-WAT), and interscapular brown adipose tissue (BAT) were dissected. Plasma was obtained after centrifugation of heparinized blood. RNA was extracted (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and 0.5 µg RNA were reverse transcribed using random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR reactions were performed on an ABI/Prism-7700 Sequence-Detector System using reaction mixtures containing 1 µl of cDNA, 12.5 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix, 250 nM probes and 900 nM primers of specific TaqMan assay primers (Applied Biosystems) for the transcripts depicted in

Figure 2. Values were normalized to that of 18S rRNA using the comparative ($2^{-\Delta CT}$) method. For HIV-1 transgene expression, the Tat region of the HIV-1 transgene transcript was quantified using a Sybr-Green RT-PCR reaction and the primers 5' ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTA 3' and 5' GCTTTGATAGAGAAGCTTGATGAG 3'.

Leptin, insulin, monocyte chemoattractant protein-1, (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), total plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), resistin, and tumor necrosis factor- α (TNF α) were quantified in 20 μ l of plasma using a multiplex system (Linco Research/Millipore, Saint Charles, MO, USA) and a Luminex100ISv2 equipment. Adiponectin was quantified by ELISA (Linco Research/Millipore) and blood glucose was measured using Accutrend (Roche, Spain). Statistical comparisons were performed using the Student's t-test.

Results

The body weight of Tg26 \pm mice (28.08 ± 1.58 g) was not significantly different from that of wild-type littermates (28.17 ± 0.77 g). However, the amount of epididymal WAT was significantly lower in Tg26 \pm mice (0.42 ± 0.01 g) than in wild-type mice (0.64 ± 0.05 g, $p < 0.05$). There were no statistically significant differences in subcutaneous WAT between Tg26 \pm (0.43 ± 0.04 g) and wild-type mice (0.40 ± 0.03 g). The size of interscapular BAT was also similar in both groups (0.21 ± 0.01 g in Tg 26 \pm mice vs. 0.19 ± 0.01 g in wild-type mice). When data on tissue weight was referred to body weight, conclusions were the same.

Plasma adiponectin and leptin levels were significantly lower in Tg26 \pm mice than in wild-type mice (Fig 1). There were no statistically significant differences in plasma resistin and PAI-I levels. TNF α and IL-6 plasma levels were significantly increased in Tg26 \pm mice, consistent with previous reports [11], and MCP-1 levels were also significantly higher. Glucose and insulin levels were significantly lower in Tg26 \pm mice.

HIV-1 transgene transcript was expressed in visceral and subcutaneous WAT to a similar extent, whereas it was less expressed in BAT (Fig 2). Expression of the master adipogenesis gene, PPAR γ , was significantly reduced in both visceral and subcutaneous WAT depots of Tg26 \pm mice (Fig 2). Expression of the genes for the glucose transporter GLUT4, and adiponectin was also reduced in all WAT depots from Tg26 \pm mice. In the visceral WAT of Tg26 \pm mice, leptin gene expression was significantly lower and resistin gene expression was not significantly altered. TNF α and IL-6 gene expression was significantly higher in visceral and subcutaneous WAT from the Tg26 \pm mice, respectively.

MCP-1 gene expression was higher in all WAT depots from Tg26+/- mice whereas CD68 expression was unaltered. There were no changes in the expression of adipogenesis-related or inflammation-related genes in BAT of Tg26+/- mice. The expression of thermogenesis-related genes, indicative of the specific BAT-versus-WAT phenotype (uncoupling protein-1, UCP1; PPAR γ -coactivator-1 α , PGC-1 α ; and 5'-deiodinase) was significantly increased in BAT of Tg26+/- mice. Finally, mitochondrial DNA levels and mitochondrial transcripts were unaltered in WAT depots or BAT of Tg26+/- mice.

Discussion

HIV-1 transgene expression in mice caused changes in adipose tissue distribution, systemic adipokine and cytokine levels, and in adipose tissue gene expression, that are partially reminiscent of alterations associated with HALS or to alterations observed in HIV-1-infected patients before anti-retroviral treatment. Low levels of plasma adiponectin and increased levels of circulating pro-inflammatory cytokines, as found here in Tg26+/- mice, are typical of HALS patients [10]. The profound reduction in leptin levels in Tg26+/- mice is similar to that reported in some studies in HALS patients [11]. It cannot be explained by overall changes in WAT mass, and reflects specific impairment in leptin synthesis and release by WAT as a consequence of HIV-1 transgene expression. However, glucose and insulin levels were low in Tg26+/- mice, which contrasts with the pro-diabetogenic status often observed in patients with HALS [1], but is in agreement with the enhanced insulin sensitivity appearing often in non-treated, clinically stable, HIV-1 infected patients [12].

The alterations in gene expression found in adipose tissues from Tg26+/- mice closely follow the pattern of changes in HALS patients, especially the early alterations observed in HIV-1-infected, untreated, (naive) patients. Similar to the present findings in HIV-1-transgenic mice, reduced expression of PPAR γ , the master controller of adipogenesis, and of its targets (GLUT4 or adiponectin genes) has been shown not only in fat from HALS patients but also in subcutaneous WAT from HIV-1 infected, naive patients [2]. Moreover, the enhanced expression of pro-inflammatory cytokines (MCP-1, IL-6) in subcutaneous WAT from Tg26+/- mice parallels the observations in subcutaneous fat from both naïve patients and those with HALS [2,13,14].

Differential changes in subcutaneous versus visceral fat is a typical feature of HALS [1]. The preferential reduction in visceral WAT size in Tg26+/- mice and unaltered

subcutaneous WAT contrasts with the enlargement of visceral fat usually observed in HALS. Epididymal adipose tissue is usually considered as representative of visceral fat in mice, but species-dependent differences in fat distribution between rodents and humans may account for distinct alterations in intra-abdominal adipose tissue [15].

We found signs of depot-dependent alterations in gene expression as a consequence of HIV-1 transgene expression; for example, $\text{TNF}\alpha$ was induced in visceral WAT, whereas IL-6 was induced only in subcutaneous WAT. These depot-specific changes cannot be the consequence of differences in HIV-1-transgene expression in mice, that was similar in visceral and subcutaneous WAT. Whether these depot-specific changes in gene expression are similar to those in patients is not clear. There is a lack of studies in visceral fat from naïve patients and even lipodystrophic patients. A pilot study of visceral WAT from patients with overt HALS indicated enhanced expression of pro-inflammatory cytokines (i.e., $\text{TNF}\alpha$) [14]. Remarkably, increased cytokine expression in WAT from HIV-1 transgenic mice was not associated with modifications in CD68 expression, a macrophage marker. Although macrophage infiltration occurs in subcutaneous WAT of HALS patients [16], this occurs only in association with overt lipodystrophy, and despite local pro-inflammatory activation, naïve patients do not show evident macrophage infiltration in fat [17]. This observation is fully consistent with the present findings in Tg26 \pm mice.

We also noted an increase in the expression of genes related to BAT-specific, thermogenesis-related, function in the BAT of Tg26 \pm mice. Although BAT is considered more relevant in rodents, the importance of BAT in adult humans has recently undergone a re-evaluation [18]. Dorso-cervical fat accumulation, a common feature of HALS, is associated with abnormal activation of the expression of the brown fat marker gene, UCP1 [19]. This alteration is another feature of the Tg26 \pm model that is consistent with the adipose disturbances in HALS.

The changes in adipose tissue observed in Tg26 \pm mice occurred in the absence of mitochondrial DNA depletion or dysfunction of mitochondrial DNA expression. This is also in agreement with the current concept that mitochondrial toxicity occurs in HALS patients mainly as a consequence of antiretroviral treatment [1].

In summary, the present study establishes for the first time the effects of HIV-1 transgene expression in mice. It is shown that HIV-1 transgene causes multiple changes in adipose tissue gene expression that are partially consistent with alterations occurring in HIV-1-infected patients that ultimately result in HALS. Importantly, the present data support the notion that HIV-1 infection-related events alter adipose tissue, alterations that may be essential for the development of HALS. However, it should be taken into account

that the present model has several limitations. HIV-1 transgene expression in mice causes mild renal damage at the age at which mice were analyzed in the present study, as evidenced, among other signs, by increased plasma creatinine levels [8,20]. It cannot be excluded that some of the effects observed could be influenced by renal alterations.

Together, the results presented here suggest that Tg26+/- mice may be a suitable model for assessment of the own effects of HIV-1 infection on adipose tissue and for experimental assessment of the action of anti-retroviral drugs on a HIV-1-infected background.

Acknowledgements

Supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01896), Instituto de Salud Carlos III (PI081715 and Red de Investigación en SIDA) and FIPSE (36610/06), Spain.

Disclosure statement

There are no conflicts of interest among the authors.

References

1. Villarroya F, Domingo P, Giralt M. Lipodystrophy in HIV 1-infected patients: lessons for obesity research. *Int J Obes (Lond)* 2007; **31**:1763-1776.
2. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, *et al.* HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV- 1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 2006; **11**:729-740.
3. Visnegarwala F, Raghavan SS, Mullin CM, *et al.* Sex differences in the associations of HIV disease characteristics and body composition in antiretroviral-naive persons. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**:850–856.
4. Peck MD, Mantero-Atienza E, Miguez-Burbano MJ, *et al.* The esterified plasma fatty acid profile is altered in early HIV-1 infection. *Lipids* 1993; **28**:593–597.
5. Goetzman ES, Tian L, Nagy TR, *et al.* HIV protease inhibitor ritonavir induces lipotrophy in male mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; **19**:1141-1150.

6. Prot M, Heripret L, Cardot-Leccia N, *et al.* Long-term treatment with lopinavir-ritonavir induces a reduction in peripheral adipose depots in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:3998-4004.
7. Balasubramanyam A, Mersmann H, Jahoor F, *et al.* Effects of transgenic expression of HIV-1 Vpr on lipid and energy metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**:E40-E48.
8. Klotman PE, Rappaport J, Ray P, *et al.* Transgenic models of HIV-1. *AIDS* 1995; **9**:313-324.
9. De SK, Devadas K, Notkins AL. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice: prevention of death by antibody to TNF-alpha. *J Virol* 2002; **76**:11710-11714.
10. Addy CL, Gavrilu A, Tsiodras S, Brodovicz K, Karchmer AW, Mantzoros CS. Hypoadiponectinemia is associated with insulin resistance, hypertriglyceridemia, and fat redistribution in human immunodeficiency virus-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:627-636.
11. Nagy GS, Tsiodras S, Martin LD, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-related lipodystrophy and lipohypertrophy are associated with serum concentrations of leptin. *Clin Infect Dis.* 2003; **36**:795-802.
12. Hommes MJ, Romijn JA, Endert E, Eeftinck Schattenkerk JK, Sauerwein HP. Insulin sensitivity and insulin clearance in human immunodeficiency virus-infected men. *Metabolism* 1991;**40**:651-6
13. Jan V, Cervera P, Maachi M, *et al.* Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients. *Antivir Ther.* 2004, **9**:555-564.
14. Villarroya J, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, *et al.* 2008. Differential alterations of gene expression in visceral versus subcutaneous adipose tissue from HIV-1-infected, HAART-treated patients with lipodystrophy: a pilot study. *Antivir Ther* 13 Suppl 4: A3
15. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocyte in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; **297**:E977-E986
16. Domingo P, Matias-Guiu X, Pujol RM, *et al.* Subcutaneous adipocyte apoptosis in HIV-1 protease inhibitor-associated lipodystrophy. *AIDS* 1999; **13**: 2261–2267.
17. Domingo P, Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, *et al.* Genome-wide transcriptomic analysis reveals distinct patterns of altered gene expression in subcutaneous adipose tissue associated with HIV-1-infection, antiretroviral treatment and lipodystrophy. *Antivir Ther* 2008; **13** Suppl 4: A25.

18. Celi FS. Brown adipose tissue-when it pays to be inefficient. *N Engl J Med* 2009; **360**:1553-1556.
19. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, *et al.* Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS* 2008; **22**:575-584.
20. Ray PE, Tassi E, Liu XH, Wellstein A. Role of fibroblast growth factor-binding protein in the pathogenesis of HIV-associated hemolytic uremic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290:R105-13.

Figures

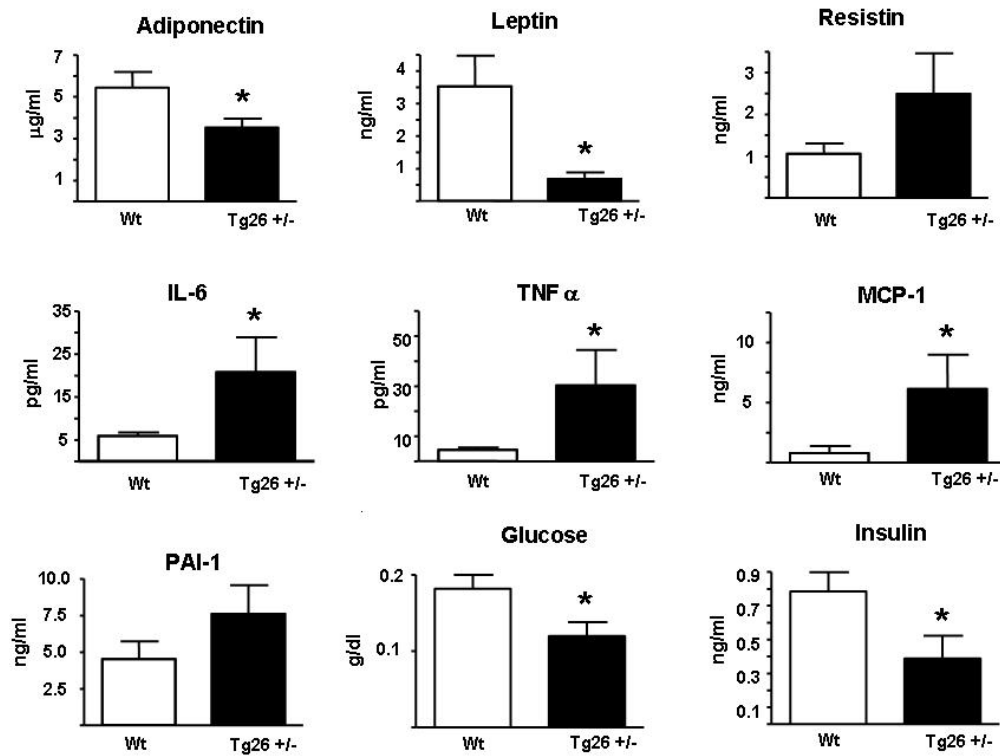
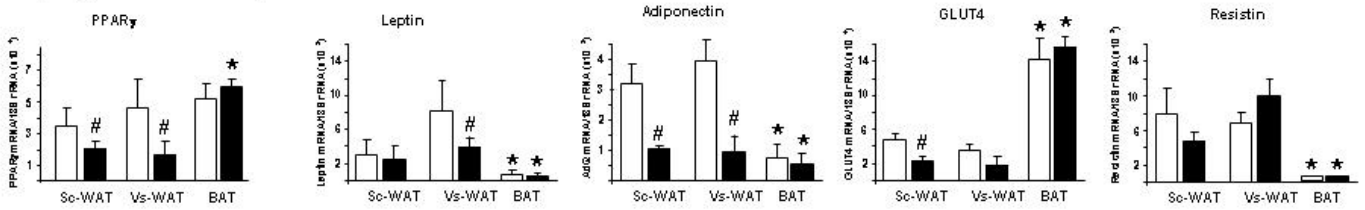
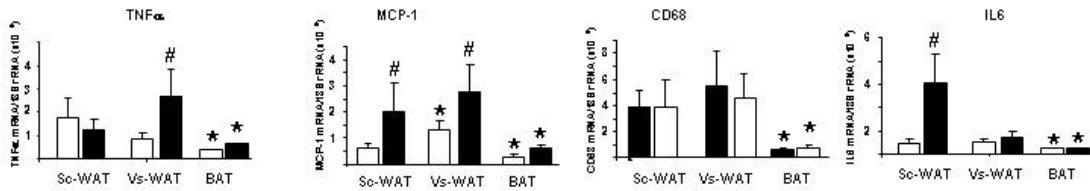


Figure 1. Levels of adipokines, cytokines, glucose and insulin in plasma from Tg26+/- mice and wild-type controls. Bars are means \pm SEM of values from 5-7 mice/group. Statistical significance of differences between Tg26+/- mice and controls are shown as * $p < 0.05$.

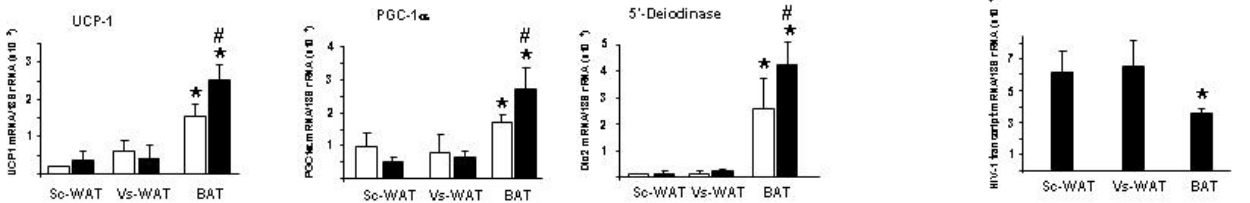
Adipogenesis and adipokines:



Inflammation:



Brown-versus-white adipose phenotype:



Mitochondrial toxicity:

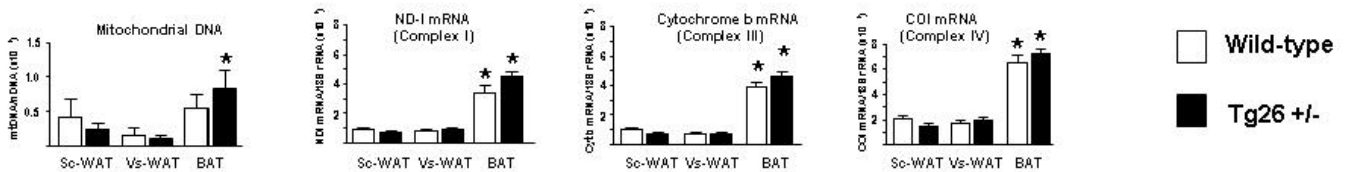


Figure 2. Transcript levels and mitochondrial DNA abundance in subcutaneous white adipose tissue (Sc-WAT), visceral white adipose tissue (Vs-WAT) and interscapular brown adipose tissue (BAT) from *Tg26*^{+/-} mice and wild-type controls. Data are means \pm SEM of values from 5-7 mice/group. Statistically significant differences respect to Sc-WAT values for every genotype are shown as * $p < 0.05$, and those between *Tg26*^{+/-} and wild-type controls for every adipose depots are shown as # $p < 0.05$. White bars, wt. Black bars, *Tg26*^{+/-}.

***In vivo* effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrial driven apoptosis**

Revista: Antiviral Therapy. 2005 Oct;10(8):945-51.

PMID: 16430200

Efectes *in vivo* de teràpies antiretrovirals altament actives que contenen l'inhibidor de proteasa nelfinavir sobre l'apoptosi mediada per mitocondria

Estudis *in vitro* han descrit efectes contradictoris dels inhibidors de proteasa (PIs) sobre l'apoptosi mediada per mitocondria. A més a més, des de que els PIs són administrats gairebé sempre, combinats amb anàlegs de nucleòsids, que poden donar lloc a efectes negatius sobre el DNA mitocondrial (mtDNA), l'impacte de la presència de PIs en la teràpia antiretroviral altament activa (HAART) sobre l'apoptosi i el contingut de DNA mitocondrial no està gens clar.

S'ha realitzat un estudi transversal amb 20 pacients negatius per l'HIV (HIV-), 16 pacients positius per l'HIV i *naïve* per antiretrovirals (HIV+), i 17 pacients positius per l'HIV i tractats amb el PI nelfinavir (NFV), més zidovudina i lamivudina (AZR + 3TC) o didanosina i estavudina (ddI + d4T), anomenats col·lectivament com HIV+PI, que rebien el primer tractament de 12 mesos. Se'n van aïllar cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica (PBMCs) i l'expressió de BCL2 (antiapoptòtica) i la forma truncada activa de la caspasa-9 (proapoptòtica) van ser determinades per western blot. El càlcul de la relació entre l'expressió de caspasa-9 i BCL2 va ser utilitzada com a estima de l'activació de l'apoptosi mediada per mitocondria. El contingut de mtDNA va ser determinat per PCR a temps real.

L'expressió de BCL2 era més baixa en els pacients HIV+ respecte als HIV- ($P < 0.01$), mentre que l'expressió de caspasa-9 era més elevada ($P = 0.001$). La relació entre caspasa-9 i BCL2 es trobava significativament incrementada en els pacients HIV+ respecte als individus HIV- ($P < 0.001$) i el contingut de mtDNA també es trobava disminuït en els pacients HIV+ respecte als HIV- ($P < 0.001$). El grup HIV+PI presentava una tendència a la normalització de l'expressió de BCL2 i caspasa-9 respecte al grup HIV+, mentre que la relació entre caspasa-9 i BCL2 millorava significativament (disminuïa, $P < 0.05$ respecte al grup HIV+). El contingut de mtDNA era similar entre els grup HIV+PI i HIV+, encara que variava en funció de si el NFV es trobava acompanyat de AZT+3TC

(preservat) o de ddl+d4T (deplecionat). Per contra, no es van observar diferències en els marcadors d'apoptosi entre els dos subgrups HIV+PI.

Amb aquests resultats podem concloure que els tractaments HAART que contenen PIs, i en concret NFV, podrien estar proporcionant efectes més beneficiosos, contrarestant així els nivells augmentats d'apoptosi mediada per mitocòndria presents en individus HIV+.

Índex

Contingut

Introducció general

1. Biologia de la mitocòndria
 - 1.1. Producció d'energia. El sistema de fosforilació oxidativa (OXPHOS)
 - 1.2. La funció mitocondrial. Els gens OXPHOS
 - 1.3. Regulació de la biogènesi mitocondrial
 - 1.3.1. Introducció
 - 1.3.2. Factors implicats en la biogènesi mitocondrial
 - 1.3.2.1. Factors de transcripció nuclears
 - 1.3.2.2. Coactivadors i correpressors nuclears
 - 1.4. Apoptosi dependent de mitocòndria. Via intracel·lular de senyalització
2. El DNA mitocondrial
 - 2.1. Estructura i organització genòmica
 - 2.2. Transcripció dels gens mitocondrials
 - 2.3. Replicació del DNA mitocondrial
 - 2.4. Traducció dels transcrits mitocondrials
 - 2.5. Característiques particulars de l'expressió del DNA mitocondrial
 - 2.6. Implicació de la depleció del DNA mitocondrial en el sistema OXPHOS i en l'apoptosi a nivell experimental

3. Patologies d'origen genètic associades a depleció del DNA mitocondrial
 - 3.1. Generalitats
 - 3.2. La síndrome de depleció del DNA mitocondrial (MDS) per deficiència de timidina quinasa 2 (TK2)
 - 3.3. La síndrome de depleció del DNA mitocondrial (MDS) per deficiència de desoxiguanosina quinasa (dGK)
4. Depleció del DNA mitocondrial d'origen farmacològic
5. Lipodistròfia en pacients HIV-1
 - 5.1. Introducció
 - 5.2. Fisiopatologia de la lipodistròfia adquirida associada a l'HIV-1
 - 5.2.1. Components de la teràpia HAART
 - 5.2.1.1. Introducció
 - 5.2.1.2. Inhibidors de proteases (PIs)
 - 5.2.1.3. Inhibidors de la transcriptasa reversa, anàlegs de nucleòsids (NRTIs)
 - 5.2.1.4. Inhibidors de la transcriptasa reversa, no anàlegs de nucleòsids (NNRTIs)
 - 5.2.2. Quadre Clínic
 - 5.2.3. Patogenicitat. Toxicitat mitocondrial
 - 5.2.3.1. La fosforilació dels NRTIs
 - 5.2.3.2. L'estrès oxidatiu
 - 5.2.3.3. L'apoptosi en la HALS
 - 5.2.3.4. La infecció de l'HIV-1
6. El paper del DNA mitocondrial en la patofisiologia del teixit adipós
 - 6.1. El DNA mitocondrial en els adipòcits
 - 6.2. El DNA mitocondrial en el desenvolupament i diferenciació de l'adipòcit
 - 6.3. Alteracions del DNA mitocondrial en l'obesitat
 - 6.4. Mutacions patogèniques del DNA mitocondrial i alteracions en el teixit adipós
 - 6.5. El DNA mitocondrial en les lipodistròfies
 - 6.5.1. Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology.

Objectius

Informe dels directors

Resum global i discussió general

Conclusions

Bibliografia

Publicacions

- a. Selective muscle fiber loss and molecular compensation in mitochondrial myopathy due to TK2 deficiency
- b. Altered gene transcription profiles in fibroblasts harboring either TK2 or DGUOK mutations indicate compensatory mechanisms
- c. An *in vitro* model of mitochondrial DNA depletion by down-regulation of thymidine kinase 2 expression
- d. Effects of thymidine kinase 2 loss-of-function and mitochondrial DNA depletion on brown adipose tissue development in mice
- e. HIV-1 transgene expression in mice alters adipose tissue and adipokine levels: towards a rodent model of HIV-1 lipodystrophy
- f. *In vivo* effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrial driven apoptosis

Índex

Apèndix

- a. Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression
- b. HIV-1-infected long-term non-progressors have milder mitochondrial impairment and lower mitochondrially-driven apoptosis in peripheral blood mononuclear cells than typical progressors

Apèndix

Durant la realització de la present Tesi doctoral s'ha col·laborat en la realització d'altres treballs experimentals que han donat lloc a les següents publicacions:

Developmental and tissue-specific involvement of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the control of mouse uncoupling protein-3 gene expression

Revista: Endocrinology. 2006 Oct;147(10):4695-704.

PMID: 16857752

Implicació teixit-específica durant el desenvolupament del receptor activat per proliferadors peroxisomals- α en el control de l'expressió gènica de la proteïna desacoblant 3 en ratolí

La proteïna desacoblant 3 (UCP3) és un membre de la família de transportadors mitocondrials que s'expressa preferencialment a múscul esquelètic i a cor. Sembla que aquesta proteïna està involucrada en la utilització metabòlica d'àcids grassos minimitzant la producció excessiva de espècies reactives de l'oxigen. Els àcids grassos són potents reguladors de la transcripció del gen UCP3. Nosaltres hem vist que el paper del receptor activat per proliferadors peroxisomals α (PPAR α) sobre el control de l'expressió gènica d'UCP3 depèn del teixit i de l'estadi de desenvolupament. En adults, l'expressió del mRNA de UCP3 es troba inalterada en múscul esquelètic de ratolins deficients per PPAR α , tant en condicions basals com en condicions de dejuni. Contràriament, el mRNA de UCP3 es troba disminuït en cor d'aquests animals, tant en condicions d'alimentació com de dejuni. Això succeeix tot i que els nivells d'àcids grassos lliures estan augmentats, resultat de la privació en els ratolins deficients per PPAR α . En nounats, els ratolins deficients per PPAR α mostren una alterada expressió del mRNA d'UCP3 en múscul esquelètic en resposta a la ingesta de llet, i això no és resultat de la disminució dels nivells d'àcids grassos lliures. En ratolí, el promotor d'UCP3 s'activa en presència d'àcids grassos a

través de PPAR α o PPAR δ , però no per PPAR γ o el receptor del retinoic X sol. L'activació depenent de PPAR δ podria tractar-se d'un putatiu mecanisme compensatori per a assegurar la correcta expressió del gen UCP3 en múscul esquelètic d'adults, en absència de PPAR α . Malgrat això, entre els transcrits d'altres dianes de PPAR α i PPAR δ , només aquells fortament induïts per la ingesta de llet en nounats control es trobaven alterats en múscul o cor dels nounats deficients per PPAR α . Així doncs, la regulació depenent de PPAR α és un requeriment per a la correcta regulació del gen UCP3, formant part d'un grup de gens que responen als àcids grassos en múscul i cor de nounats.

HIV-1-infected long-term non-progressors have milder mitochondrial impairment and lower mitochondrially-driven apoptosis in peripheral blood mononuclear cells than typical progressors

Revista: Current HIV Research. 2007 Sep;5(5):467-73.

PMID: 17896966

Individus infectats per l'HIV-1 no progressors -a de llarg termini presenten una suau disfunció mitocondrial i nivells més baixos d'apoptosi mediada per mitocòndria en cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica respecte els pacients que progressen normalment.

Paràmetres mitocondrials en cèl·lules mononucleades de la sang perifèrica (PBMC) i la seva relació amb l'apoptosi mediada per mitocòndria en PBMCs ha estat investigada en un grup d'individus infectats per l'HIV-1 no progressors –a de llarg termini (LTNP) i comparada amb pacients infectats per l'HIV-1 asimptomàtics, no tractats i que progressen normalment (TP), i individus control sans (HC).

Vint-i-sis LTNP, 27 TP i 31 HC van ser avaluats. L'estudi es va realitzar en PBMCs. El contingut de DNA mitocondrial (mtDNA) va ser mesurat per PCR quantitativa a temps real. L'activitat dels complexos de la cadena respiratòria (MRC) II, III i IV fou determinada per espectrofotometria. L'activitat caspasa-3 va se determinada per fluorimetria, i l'activació de caspasa-9 i l'abundància de Bcl-2 per immunodetecció.

L'abundància de mtDNA ($p < 0.05$), la MRC del complex II ($p < 0.001$), complex III ($p < 0.01$) i complex IV ($p = 0.01$) eren més baixes en el grup TP que en el grup HC. En el grup LTNP aquests paràmetres foren semblants als obtinguts pel grup HC, excepte pel complex II, que estava disminuït ($p < 0.01$). Les PBMC dels TP mostraren la major activació apoptòtica entre els 3 grups, ja que l'activitat caspasa-3 era major a les de HC ($p < 0.05$) i LTNP, tot i que en el cas de LTNP la diferència no resultar ser significativa. Tant la caspasa-9 com la relació entre caspasa-9 i Bcl-2 estaven augmentades en TP respecte HC ($p < 0.01$) i LTNP ($p < 0.05$). Aquestes dues mesures ens indiquen que l'apoptosi mediada per mitocòndria a TP es major que en LTNP i HC. Així doncs, es trobà una relació entre el dany mitocondrial i l'activació de l'apoptosi en el grup TP.

El dany mitocondrial està associat a un augment en l'apoptosi en PBMC de pacients amb una replicació activa de l'HIV-1 (TP). Aquestes alteracions són molt lleus o inexistents en LTNP.