



Universitat Autònoma de Barcelona

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

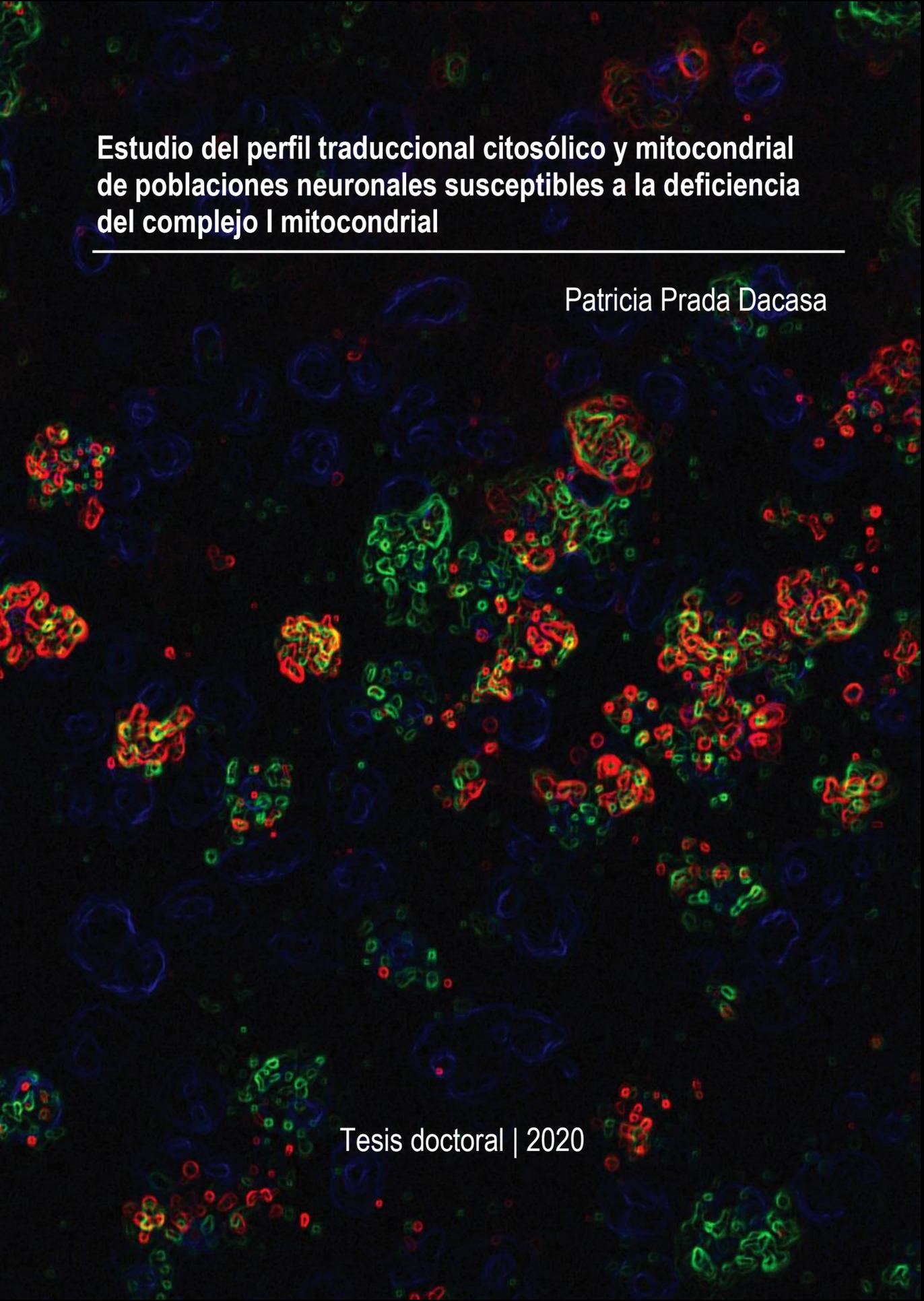
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

Estudio del perfil traduccional citosólico y mitocondrial de poblaciones neuronales susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial

Patricia Prada Dacasa

Tesis doctoral | 2020



Institut de Neurociències (INc)
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

**Estudio del perfil traduccional citosólico y
mitocondrial de poblaciones neuronales susceptibles
a la deficiencia del complejo I mitocondrial**

Patricia Prada Dacasa

2020

Memoria de la tesis doctoral presentada por Patricia Prada Dacasa con el fin de optar al título de doctora en Neurociencias con Mención Internacional por el programa de doctorado de Neurociencias de la UAB.

Director:

Dr. Albert Quintana

Directora:

Dra. Elisenda Sanz

Tutor:

Juan Hidalgo

*A los eternos incondicionales,
mis padres y mi abuelo José*

It's magic until it's science

Agradecimientos

Escribir los agradecimientos es equivalente al final de esta etapa, y aunque en ciertos momentos pensé que no se acababa nunca, el momento llegó. Después de cinco años de esfuerzo, toca poner punto final. Y digo esfuerzo, porque sí, lo ha sido y de los grandes. No obstante, no me arrepiento ni un segundo de haberme embarcado en esta maravillosa aventura que empezó un día de verano de 2015 en un despacho y laboratorio aún por montar. Y es que como dicen los sabios, el esfuerzo tiene siempre su recompensa. No obstante, debo reconocer que en la vida siempre he tenido la suerte de estar rodeada de gente extraordinaria que me ha allanado el terreno y me ha llenado de valor para seguir adelante pese a las dificultades. En estas páginas me gustaría dar las gracias a algunos de los más significativos, pese a que seguro me quedo corta en agradecimientos. Perdón de antemano por el popurrí de idiomas que se avecina...

En primer lloc, gràcies a **l'Albert** i **l'Eli** per donar-me la oportunitat de formar part d'un equip científic excel·lent i, sobre tot, d'una qualitat humana que m'ha fet sentir-me com a casa sempre. Albert sé que no t'agrada que et diguem *jefe*, però crec que hauries d'estar ben orgullós del que has aconseguit sent-ho. No és fàcil créixer i alhora deixar créixer els altres. Gràcies per l'oportunitat! Eli, sé que dius que un dels meus defectes és que li dono moltes voltes a les coses, però en part ho he *heretat* de tu. Sé que vagi on vagi, m'emportaré sempre un trosset de la teva capacitat crítica i que això em farà ser millor. De nou, gràcies per ser dos referents excel·lents, tant a nivell professional com personal.

Gracias también a **Pablo y Andrea**, con los que formo el trío *Pelvis reggeatonera* que empezó a la par las tesis doctorales siendo unos polluelos recién salidos del huevo. Pablo, gracias por estar en todo momento sosteniendo el barco, codo con codo, en esta dura travesía y crecer a mi lado. Andrea, gràcies per participar sempre en els diàlegs *Drama Queen* de la vida, he gaudit moltíssim plorant i rient amb tu, m'has demostrat sempre ser una imprescindible. Y a los dos, gracias por haber hecho que esta tesis doctoral tuviera momentos muy felices, siempre seréis mi apoyo y aquí estaré para lo mismo.

No less significant, a big thank you to the rest of QuintanaLab members. **Fab** and **Abel** you can conquer the world together, thank you tons for those crazy and lovely moments with you! **Patrizia**, siempre será un placer aprender idiomas contigo, grazie mille per tutto! **Emma**, gràcies per ser meravellosament diferent! **Kelsey, Laura, Mel** y **Adán**, gracias por ser parte de la esencia del laboratorio! ¡Mucha suerte en esta etapa! **Isabella** y **Roser**, gracias por siempre tender una eficiente mano en cualquier circunstancia. **Alex** e **Irene**, muchísimas gracias por aportarme experiencia, sensatez, ironía y alegría cada día en el despacho. No puedo dejar de dar las gracias también a **Javier, Núria, Cristina, Meri** y,

Agradecimientos

especialmente, a **Mar** por el soporte técnico y humano que me habéis dado desde que llegué. Gracias también a todo el equipo de coordinación y administración del **Institut de Neurociències** que, desde un mismo edificio han hecho posible la realización de esta tesis. Asimismo, gracias a **Patri, Kevin, Carla y Olaia** por compartir las penurias y alegrías de los doctorandos. Al **Dr. Juan Hidalgo, Dr. Carlos Barcia, Dr. Bernardo Castellano y Dr. Josep Saura** por vuestras críticas científicas siempre constructivas. Asimismo, también quisiera agradecer a la **Dra. Cristina Santos y Dra. Katrin Beyer** por abrirme las puertas al mundo académico.

Thank you as well to **Dr. Rita Horvath**, it has been an honour to join your lab in Cambridge to expand my knowledge with all your excellent team. Thank you very much **Matt, Ben, Sunitha and Juliane** for making me feel welcome and for the patience to teach me. Thanks as well to **Christine, Gabriele and Mirlinda** for making free time funnier and a multicultural experience during my stay, I miss a lot my bike! Finally, a special thanks to **Lil**, who has been more than a roommate and opened me the doors to *College's world*. Gracias **Marta** también por la acogida en Cambridge y bienvenida al QLab.

Saliendo del ambiente laboral, también debo agradecer a una larga lista de personas que me han apoyado en esta etapa de mi vida. A les nenes de SOLC, **Júlia, Sara, Aina i Laia**, que després de *mooolts* anys seguiu aquí, algunes compartint els contratemps de la tesis (Júlia i Sara) i, les altres (Aina i Laia), que sense saber de que va ni tan sols, us heu convertit en unes animadores excel·lents. A la **Mònica i l'Anna**, que s'han convertit en dues de les dones més increïbles que he conegut mai i m'han ensenyat que les coses que fan més por són per les que val més la pena lluitar. A las chicas de San Salvador, **Lorena y Ana** que siempre me traéis esa suave brisa de verano y libertad. A mis bailarines **Silvia, Andrea Muñoz**, y especialmente a **Christian, Andrea Moya** y a la invencible **Mireia**, con los que las emociones siempre fluyen sin necesitar de palabras. Gracias por siempre acompañarme en este camino. A **Albert, Giner y Eulàlia**, que doy gracias que Joan pusiera en mi vida, sois de esas personas que reírse un rato de las crisis existenciales de la vida o de una simple cuchara siempre es bienvenido.

Gracias también a la familia Bertolín-Gálvez, en especial a **Olga, Toni, Dani** y al **Avi**, que siempre han tenido una sonrisa y me han dado todo el apoyo que he necesitado. Gracias también a mi familia Prada-Dacasa, **titos, titas, primos y primas** que me habéis dado tanto amor que jamás podré devolveros en un simple gracias.

Especialmente, quería dar las gracias a mis padres, uno de los pilares más importantes de mi vida. **Mamá**, gracias por enseñarme que la perseverancia es

la base del éxito, que siempre debo levantarme más fuerte de lo que me he caído, y gracias por confiar siempre en mí más de lo que yo lo hago. **Papa**, que sé que sufres más tú que yo por mis propios miedos, gracias por enseñarme a amar desde la simplicidad la naturaleza y la ciencia. Sobre todo, gracias a los dos por darme las alas para poder volar libre. También gracias a mi hermano **Manel**, por mantener esa magia de los juegos de cuando éramos niños y estar siempre vigilante desde la distancia a mis inquietudes. A **Bea**, por normalizar mis momentos de desesperación por esta tesis. A mi pequeña favorita, **Paula**, que con cada carcajada tuya me has recordado que fácil es saber disfrutar y cuanto nos complicamos a veces. No puede faltar tampoco un gran gracias a mi **abuelo José**, mi amigo y timón, que, aunque no esté presente físicamente, me acompaña siempre. Yayo, sé que hoy serías de las personas más orgullosas al ver este trabajo finalizado. Esto es en parte gracias a ti, que pese a la diferencia generacional supiste como llegar a mí y transmitirme que la vida no es fácil, que hay que luchar, ser generoso y, sobre todo, disfrutar del camino. ¡Gracias yayo! También debo dar las gracias a mi **abuelo Manuel, yaya Carmela y yaya Margot** por haberme dado ese amor incondicional que te da fuerza y, sobre todo, por enseñarme lo que es la resiliencia, especialmente en estos últimos meses.

Finalmente, y no menos importante toca darle las gracias al otro pilar de mi vida, **Joan**. Gracias por escogerme como compañera de vida, sé que es fácil quererme en los buenos momentos, pero es complicado hacerlo en los duros, y en eso amigo, has demostrado ser extraordinario. Me has aportado la calma y la risa que he necesitado, incluso cuando no sabía que las requería. Gracias por apoyarme, entenderme y respetarme siempre. ¡Ya queda poco para poder volver a salir a comernos el mundo juntos con **Skye**!

Probablemente, mis agradecimientos como decía antes se queden cortos. Muchas otras personas han formado parte de este trabajo, directa o indirectamente. El estrés de estos últimos días juega malas pasadas a mi memoria, espero no haberme dejado a nadie importante. Así, por ejemplo, no debo olvidar de dar las gracias a todos los **ratoncillos** que han hecho posible este trabajo. Parece irónico que os dé las gracias sabiendo vuestro destino, pero espero de corazón que algún día vosotros y este trabajo contribuyáis a un beneficio mayor. En cualquier caso y para concluir, gracias a todos por dejarme crecer profesional y personalmente. Ha sido un magnífico viaje, y espero con ganas el que está por llegar.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al financiamiento recibido del **Ministerio de Economía y Competitividad** a través de la ayuda para contratos predoctorales BES-2015-073041 bajo el proyecto SAF2014-57981P.

Tabla de contenido

Abreviaciones y acrónimos.....	V
Resumen.....	IX
Summary.....	XI
Introducción.....	1
1. La mitocondria y su especialización multifuncional	3
1.1. La fosforilación oxidativa en la síntesis de ATP	4
2. Particularidades de la mitocondria en el sistema nervioso central	8
3. Enfermedades mitocondriales y su implicación en la neurodegeneración ..	10
4. El síndrome de Leigh como enfermedad mitocondrial primaria	12
4.1. Historia, prevalencia y prognosis del SL.....	13
4.2. Signos clínicos y diagnóstico del SL.....	14
4.3. Etiología genética del SL.....	17
4.4. Neuropatología en el SL.....	19
4.5. Tratamientos clínicos para el SL.....	21
4.6. Modelos animales para el estudio del SL.....	24
4.6.1. Generación del ratón Ndufs4KO.....	27
4.6.2. Caracterización de la patología mitocondrial en el ratón Ndufs4KO	29
4.7. Mecanismos moleculares subyacentes a la progresión patológica del SL....	32
4.7.1. Estrés oxidativo, neuroinflamación y regulación del oxígeno	32
4.7.2. Metabolismo de nutrientes.....	38
4.8. Contribución de diferentes tipos celulares en la neuropatología del SL ..	43
4.9. Caracterización de las alteraciones neuroquímicas y sinápticas en los ratones Ndufs4KO	48
5. Técnicas para el análisis del traductoma citosólico	55
5.1. Herramientas para el análisis del traductoma citosólico con resolución de tipo celular en tejidos complejos.....	59
6. Regulación de la expresión génica mitocondrial en mamíferos.....	63
6.1. Transcripción y traducción mitocondrial.....	63
6.2. Importancia de la coordinación núcleo-mitocondria en la homeostasis celular	71
6.3. Aproximaciones para el análisis del traductoma mitocondrial con resolución de tipo celular.....	74
Hipótesis y objetivos.....	79
Material y métodos	83

Tabla de contenido

1. Animales.....	85
1.1. Genotipado de los ratones transgénicos.....	85
1.2. Ratones con delección condicional de <i>Ndufs4</i> en las neuronas glutamatérgicas VGLUT2.....	88
1.3. Ratones transgénicos para el análisis del traductoma citosólico de tipo celular específico en el contexto de enfermedad mitocondrial.....	89
1.4. Protocolo de supervisión clínica de los ratones experimentales y control.....	90
2. Cultivo de células HEK293T.....	91
2.1. Mantenimiento de las células HEK293T.....	91
2.2. Congelación y descongelación de las células HEK293T.....	91
3. Extracción tejidos cerebrales: Bulbo olfatorio y núcleo vestibular.....	92
4. Análisis del traductoma citosólico de tipo celular específico.....	93
4.1. Aislamiento del ribosoma citosólico de poblaciones neuronales específicas (tecnología RiboTag).....	93
4.2. Extracción, cuantificación y control de calidad del ARN obtenido.....	96
4.3. Preparación de las librerías para la secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq).....	96
4.4. Secuenciación masiva del transcriptoma, RNA-Seq.....	97
4.5. Análisis bioinformático de los datos de RNA-Seq.....	98
5. Obtención del traductoma mitocondrial de tipo celular específico en tejidos complejos con la herramienta MitoRiboTag.....	100
5.1. Diseño del plásmido MitoRiboTag.....	100
5.2. Producción del vector viral adenoasociado AAV-DIO-MitoRiboTag.....	100
5.3. Transducción del AAV-DIO-MitoRiboTag en cultivo celular.....	102
5.4. Administración intracerebral del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag in vivo.....	102
5.5. Inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales de las neuronas glutamatérgicas vestibulares (metodología MitoRiboTag).....	103
6. Análisis de expresión génica diferencial.....	105
7. Western blot.....	108
8. Inmunofluorescencia.....	111
9. Hibridación <i>in situ</i>	113
10. Análisis estadístico.....	113
Resultados.....	115
1. Caracterización del traductoma citosólico de poblaciones neuronales susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial.....	117

1.1. Estrategia para la identificación del traductoma citosólico en poblaciones celulares genéticamente definidas	117
1.1.1. Validación del ensayo RiboTag para el aislamiento del traductoma citosólico de las neuronas GAD2 deficientes para NDUF54 en el BO.	120
1.1.2. Validación del ensayo RiboTag para el aislamiento del traductoma citosólico de las neuronas VGLUT2 del NV deficientes para NDUF54.	123
1.2. Análisis por RNA-Seq de las muestras obtenidas por el ensayo RiboTag de ratones con deficiencia del complejo I mitocondrial en poblaciones neuronales susceptibles	130
1.2.1. Perfil transcriptómico tisular del BO y del NV inducido por la deficiencia del complejo I mitocondrial en poblaciones neuronales susceptibles.....	131
1.2.2. Perfil traduccional citosólico inducido por la deficiencia del complejo I mitocondrial en dos poblaciones neuronales susceptibles	135
1.2.2.1. Identificación de los transcritos con asociación diferencial al ribosoma subyacentes a la deficiencia del complejo I mitocondrial en dos poblaciones neuronales susceptibles.	135
1.2.2.2. Variabilidad del perfil traduccional entre las neuronas glutamatérgicas vestibulares y las GABAérgicas del BO deficientes para <i>Ndufs4</i>	138
1.2.2.3. Análisis de las categorías funcionales alteradas por la deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO y las glutamatérgicas del NV.....	139
1.2.2.4. Análisis de las principales categorías funcionales enriquecidas en neuronas GABAérgicas del BO y glutamatérgicas del NV y afectadas por la deficiencia del complejo I mitocondrial.....	145
1.3. Validación de las categorías biológicas potencialmente sobrerrepresentadas por la deficiencia de complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares.....	148
1.3.1. Inducción de la vía de señalización de neuropéptidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia del complejo I mitocondrial.....	148
1.3.2. Comprobación de la activación de la biogénesis ribosomal en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de complejo I mitocondrial.....	154
2. Desarrollo y validación de un método para el aislamiento de transcritos asociados al ribosoma mitocondrial de tipos celulares específicos	158
2.1. Diseño y generación de la herramienta MitoRiboTag.....	158
2.2. Validación en cultivo celular de la técnica MitoRiboTag.....	161
2.3. Aplicabilidad de la tecnología MitoRiboTag en tejidos complejos <i>in vivo</i>	165

Tabla de contenido

3. Análisis del traductoma mitocondrial en las neuronas vestibulares glutamatérgicas con deficiencia de complejo I mitocondrial.....	170
Discusión	175
1. El perfil traduccional citosólico define la susceptibilidad neuronal a la deficiencia del complejo I mitocondrial	177
1.1. La deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO activa una respuesta antiviral	180
1.2. La disfunción del complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares y su posible impacto en la neurotransmisión excitatoria	185
1.2.1. El metabolismo lipídico como promotor de la neuropatología en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con disfunción del complejo I mitocondrial.....	186
1.2.2. Activación de la síntesis de neuropéptidos como respuesta de neuroprotección en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4	189
1.2.3. Posible implicación de la vía de mTORC1 en el control de la biogénesis ribosomal en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4	192
1.3. Relevancia y limitaciones de la aproximación de tipo celular específico	195
2. Obtención del perfil traduccional mitocondrial de poblaciones definidas genéticamente en tejidos complejos	199
3. La deficiencia del gen nuclear <i>Ndufs4</i> afecta la asociación al ribosoma del transcrito <i>Nd1</i> codificado en el genoma mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares	203
Conclusions	209
Referencias	213
ANEXO 1.	245

Abreviaciones y acrónimos

4E-BP	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i>
AAV	Virus adenoasociado
AD4	N-acetilcisteína amida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADP	Adenosín difosfato
AKT	<i>Protein kinase B</i>
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNmt	ARN codificado en el genoma mitocondrial
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN transferencia
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BO	Bulbo olfatorio
Ca²⁺	Calcio
c-JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
cKO	<i>Knock out</i> condicional
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
COX15	<i>Cytochrome C Oxidase Assembly Homolog 15</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CT	Control
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAR	Diferencialmente Asociado al Ribosoma
DE	Diferencialmente Expresado
DIO	<i>Double-floxed inverse open reading frame</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRP1	<i>Dynamin-1-like protein</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EF1a	<i>Elongation factor 1-alpha</i>
EF-G1mt	<i>Mitochondrial elongation factor G1</i>
EF-G2mt	<i>Mitochondrial elongation factor G2</i>
EF-Tsmt	<i>Mitochondrial elongation factor thermo stable</i>

Abreviaciones y acrónimos

EF-Tumt	<i>Mitochondrial elongation factor thermo unstable</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
eIF2α	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2-alpha</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EM_P	Enfermedad Mitocondrial Primaria
EM_S	Enfermedad Mitocondrial Secundaria
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
eYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FAD⁺	Flavín adenín dinucleótido oxidado
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FC	<i>Fold change</i> / Cambio relativo
FDR	False discovery rate
Fe-S	Grupo hierro-azufre
fMet	Metionina formilada
FMRP	<i>Fragile X mental retardation protein</i>
FOR	<i>Forward</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gad2	<i>Glutamate decarboxylase 2</i>
GDP	Guanosín difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GO	<i>Gene Ontology</i> / Ontología génica
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293 cells T</i>
HIF1-α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
iCre	<i>improved Cre recombinase</i>
IF3mt	<i>Mitochondrial Translational Initiation Factor 3</i>
IL	Interleucina
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP	ARNm inmunoprecipitado
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ISG	<i>Interferón Stimulated Genes</i>
ISR	<i>Integrated Stress Response</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
KI	<i>Knock in</i>
KO	<i>Knock out</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LS	<i>Leigh Syndrome</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MOTS-C	mitochondrial open reading frame of the twelve S rRNA-c
mRNA	messenger RNA
MRPL44	<i>Mitochondrial ribosomal protein L44</i>
mt-ARNm	ARN mensajero codificado en el genoma mitocondrial
MTERF1	<i>Mitochondrial Transcription Termination Factor 1</i>

MTFP1	<i>Mitochondrial fission process protein 1</i>
mTORC1/C2	<i>mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2</i>
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NDS	<i>Normal Donkey Serum</i>
NDUFS4	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4</i>
NEO	<i>Neomycin resistance gene</i>
NF	Núcleo fastigial
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NV	Núcleo vestibular
OI	Núcleo olivar inferior
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
pb	Pares de bases
PBST	<i>Phosphate-Buffered Saline + 0,1% Triton X-100</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehído
PGC1-α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α</i>
PHD	<i>Prolyl hydroxylase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
PKR	Proteína quinasa R
PNPasa	Polinucleótido fosforilasa
POLRmt	Polimerasa de ARN mitocondrial
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pS6	Proteína ribosomal S6 fosforilada
qRT-PCR	PCR con transcriptasa inversa
REV	<i>Reverse</i>
RF1mt	<i>Mitochondrial release factor 1</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RM	Resonancia magnética
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAsa	Ribonucleasa
RNA-Seq	Secuenciación masiva del transcriptoma
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL10a	<i>Ribosomal Protein L10a</i>
RPL22	<i>Ribosomal protein L22</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
RPS6	<i>Ribosomal protein S6</i>
RRF1mt	<i>Mitochondrial ribosome release factor 1</i>
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>

Abreviaciones y acrónimos

SC	Signos clínicos
SCO2	<i>Synthesis Of Cytochrome C Oxidase 2</i>
SEM	Error estándar
Ser	Serina
SL	Síndrome de Leigh
SNC	Sistema nervioso central
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
SURF1	<i>Surfeit Locus Protein 1</i>
TACO1	<i>Translational Activator Of Cytochrome C Oxidase 1</i>
TBST	<i>Tris buffered saline + 0,1% de Tween-20</i>
TEFM	<i>Transcription Elongation Factor, Mitochondrial</i>
TFAM	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TFB2M	<i>Mitochondrial Transcription Factor B2</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAP	<i>Translating ribosome affinity purification</i>
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
uORF	<i>Upstream open reading frame</i>
UPRmt	<i>mitochondrial Unfolded Protein Response</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VDAC1/2	<i>Voltage-dependent anion-selective channel 1/2</i>
VGLUT2	<i>Vesicular Glutamate Transporter 2</i>
vHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
YY1	<i>Yin And Yang 1 Protein</i>
α-	Anti-
Δ	Delección
Δψ_m	Potencial de membrana mitocondrial

Resumen

El síndrome de Leigh (SL) es la enfermedad mitocondrial más recurrente en infantes. Los pacientes con SL, a pesar de tener un clínica heterogénea, se caracterizan por desarrollar lesiones neurológicas bilaterales en el tronco encefálico y los ganglios basales que suelen derivar en una muerte prematura. La restricción neuroanatómica de estas lesiones ha revelado que no todas las neuronas son igual de susceptibles a la deficiencia mitocondrial. De acuerdo con esto, el uso de un ratón deficiente para *Ndufs4* (*Ndufs4KO*), una de las mutaciones más frecuentes en el SL, que recapitula fehacientemente la patología humana, ha establecido que las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas son especialmente vulnerables. Sin embargo, los determinantes de esta susceptibilidad están aún por resolver, resaltando la importancia de nuevas aproximaciones para el estudio del SL, dado que no existe cura para esta enfermedad. Por ello, en esta tesis doctoral hemos combinado un ensayo para el aislamiento del ARNm asociado a ribosomas de tipos celulares específicos con secuenciación masiva para caracterizar las alteraciones del perfil traduccional citosólico de estas dos poblaciones neuronales. El análisis bioinformático de estos datos ha revelado que, en respuesta a la deficiencia de *Ndufs4*, las neuronas GABAérgicas del bulbo olfatorio, un área con robusta afectación en el ratón *Ndufs4KO*, activan una respuesta antiviral. Por otro lado, la misma mutación en las neuronas glutamatérgicas de otra área igualmente afectada, el núcleo vestibular, se traduce en una alteración temprana del metabolismo lipídico seguido de un incremento progresivo de la señalización neuropeptídica y la biogénesis ribosomal. Así, estos datos resaltan la importancia de la especificidad de tipo celular y de la comunicación mitocondria-núcleo en la regulación de la disfunción mitocondrial. Para una mejor comprensión de las alteraciones subyacentes a la deficiencia mitocondrial, hemos desarrollado y validado una herramienta basada en un vector viral que permite de una manera rápida y

Resumen

eficiente aislar el ARNm asociado al ribosoma mitocondrial de tipos celulares específicos en tejidos complejos (MitoRiboTag). Con la aplicación de esta técnica hemos podido determinar que la deficiencia de *Ndufs4* en las neuronas glutamatérgicas vestibulares causa una reducción selectiva de la asociación al ribosoma del transcrito *Nd1*, probablemente bloqueando la biogénesis del complejo I mitocondrial. Esta tecnología permite, por primera vez, entender la regulación del perfil traduccional mitocondrial y evaluar la compleja comunicación mitocondria-núcleo en poblaciones celulares genéticamente definidas en condiciones fisiológicas y patológicas *in vivo*, facilitando el camino para el desarrollo de tratamientos efectivos para el SL.

Summary

Leigh syndrome (LS) is the most common childhood presentation of mitochondrial disease. Albeit clinically heterogeneous, LS is characterized by neurological damage, especially restricted to brainstem and basal ganglia, usually leading to early death. The anatomic restriction of brain lesions in LS has underscored that not all neurons are equally susceptible to mitochondrial deficiency. Accordingly, a well-established mouse model of LS presenting *Ndufs4* deficiency (Ndufs4KO), one of the most prevalent mutated genes in LS, recapitulates the human disease. Using this mouse model, it has been established that GABAergic and glutamatergic neurons are especially vulnerable to the disease. However, the determinants of this susceptibility remain unknown, highlighting the need for novel approaches to study LS since there is no cure for this pathology. Hence, in this doctoral thesis we have combined cell-type specific ribosome-bound mRNA isolation with next generation sequencing to profile the cytosolic translational alterations of these two neuronal populations. Bioinformatic analysis of these data revealed that in response to *Ndufs4* deficiency, GABAergic neurons in the olfactory bulb, a severely affected region in Ndufs4KO mice, activate an antiviral response. On the other hand, glutamatergic neurons in another affected area, the vestibular nuclei, lead to a premature impairment of lipid metabolism followed by a progressive increase in neuropeptide signaling and ribosome biogenesis. Thus, these results highlight the relevance of cell type specific regulation, and mitochondria-nuclear crosstalk in neuronal susceptibility to mitochondrial dysfunction. To further understand alterations in mitochondrial deficiency, we have developed and validated a novel viral vector-based approach to rapidly and efficiently isolate cell type-specific mitochondrial ribosome-bound mRNA from complex tissues (MitoRiboTag). Using this approach, we have identified that *Ndufs4* deficiency in vestibular glutamatergic neurons causes a selective reduction in the ribosomal loading of *Nd1* transcript, which may lead to blockage of complex I biogenesis. Thus, this

Summary

technology allows, for the first time, to understand the mitochondrial translational profile regulation and to evaluate the complex mitochondria-nucleus crosstalk of genetically-defined populations in physiological and pathological conditions *in vivo*, paving the way for the development of effective therapies for LS.

Introducción

1. La mitocondria y su especialización multifuncional

Hace aproximadamente 1.500 millones de años, en una biósfera cada vez más aeróbica, un precursor de célula eucariota incorporó por endosimbiosis una proteobacteria capaz de realizar, entre otras funciones, la respiración aeróbica (Sagan, 1967; Roger et al., 2017). Dicha proteobacteria se acabaría convirtiendo en la actual mitocondria, descubierta por primera vez por Richard Altmann y descrita, posteriormente, por Carl Benda a finales del siglo XIX (revisado en Ernster and Schatz, 1981). Actualmente, la mitocondria es considerada como el orgánulo encargado de generar más del 80% de la energía química (adenosín trifosfato o ATP) que sostiene las funciones celulares eucariotas, a través de la fosforilación oxidativa (Papa et al., 2012a). No obstante, evolutivamente, la mitocondria ha adquirido funciones adicionales a la producción y regulación bioenergética, fundamentales también para el mantenimiento de la homeostasis celular. De este modo, interviene de manera directa en la señalización celular (Ca^{2+} y estrés oxidativo) y en la iniciación de la apoptosis (Osellame et al., 2012; Herst et al., 2017), en la respuesta inmune a nivel metabólico y fisiológico (Breda et al., 2019), en el envejecimiento celular (Bratic and Larsson, 2013) y en la biosíntesis de esteroides (Miller, 2013), aminoácidos, lípidos y nucleótidos (Osellame et al., 2012; Herst et al., 2017), entre otras funciones.

La especialización multifuncional de la mitocondria ha sido posible gracias a la transferencia de la mayor parte del material genético mitocondrial al genoma nuclear (~1.100 proteínas) (Lane and Martin, 2010; Wang, 2012; Vafai and Mootha, 2012). Aproximadamente dos terceras partes del total de las proteínas con función mitocondrial conservan un origen filogenéticamente bacteriano, mientras que la parte restante procedería de variantes genéticas posteriormente adquiridas en la propia célula eucariota. Al mismo tiempo, el éxito del mantenimiento de las distintas funciones mitocondriales reside en una estrecha coordinación entre ambos genomas; nuclear y mitocondrial (Vafai and Mootha, 2012). Notablemente, esta coordinación depende del tipo celular o tejido y del

contexto ambiental (Dubinsky, 2009; Vafai and Mootha, 2012). Igualmente, factores como la edad, el sexo (Sanz et al., 2007; Sun et al., 2016; Khalifa et al., 2017), el fondo genético mitocondrial (haplotipo) o la cantidad de copias del ADN mitocondrial (ADNmt) y sus variantes genéticas (heteroplasmia) dirigen los cambios de expresión génica, tanto a nivel nuclear como mitocondrial (Stewart and Chinnery, 2015; Liu et al., 2017). En conjunto, estos factores gobiernan las distintas funciones fisiológicas y, especialmente, condicionan la severidad o progresión patológica (Pinto and Moraes; 2013; Hirose et al., 2018).

1.1. La fosforilación oxidativa en la síntesis de ATP

La fosforilación oxidativa, encargada de generar ATP, se considera la principal actividad de la mitocondria (Chance and Williams, 1956). En este proceso, la cadena de transporte de electrones es capaz de oxidar los cofactores NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido) y FADH₂ (Flavín adenín dinucleótido) generando un gradiente electroquímico de protones (potencial de membrana mitocondrial o $\Delta\psi_m$) en el espacio intermembrana mitocondrial. Estos iones acabarán traspasando por la ATP-sintetasa (Complejo V) a la matriz mitocondrial por quimiosmosis, promoviendo el paso de ADP (Adenosín difosfato) a ATP (Mitchell, 1961; Wallace, 1999; Poian et al., 2010). Notablemente, la fosforilación oxidativa es posible gracias a la reducción previa de los cofactores NAD⁺ y FAD⁺, a través de la glucólisis, ciclo de Krebs, β -oxidación de ácidos grasos y de la oxidación de aminoácidos (Wallace, 1999; Poian et al., 2010) (Figura 1).

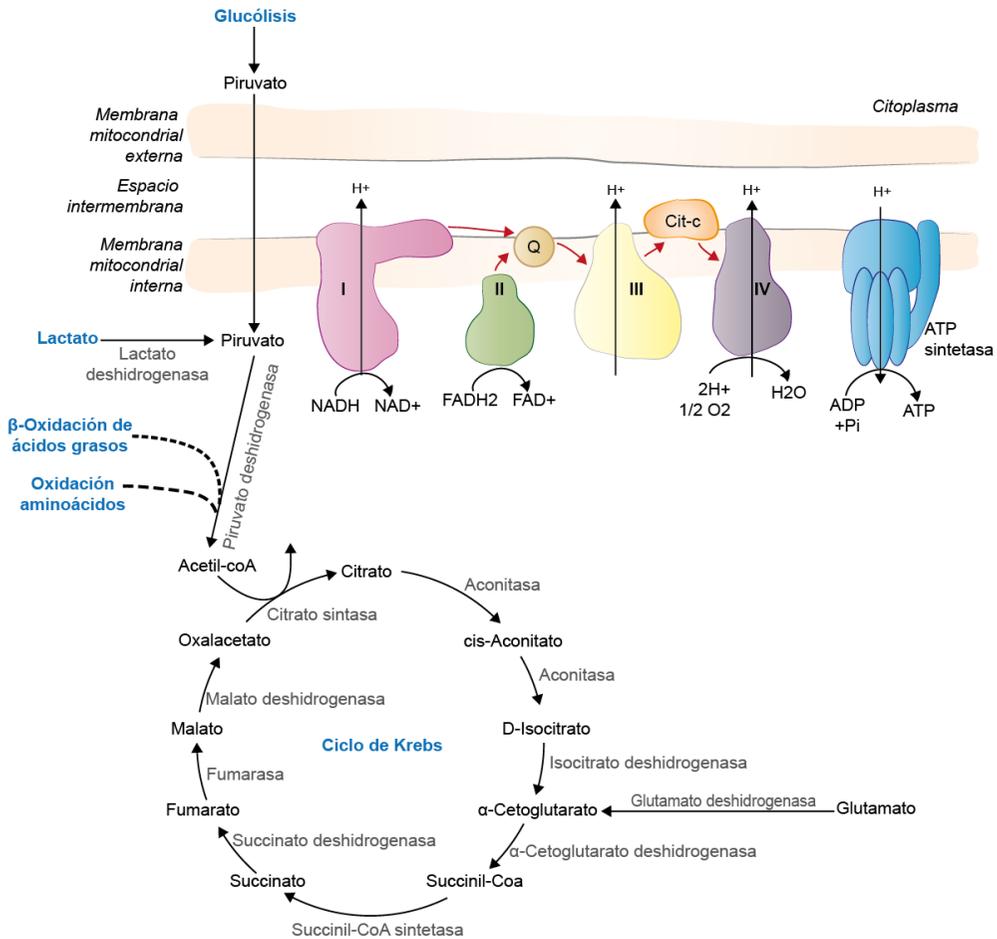


Figura 1. Esquematación de las vías implicadas en la fosforilación oxidativa. Se representan en azul los procesos involucrados, directa o indirectamente, en la reducción de los cofactores NADH y FADH₂. En gris se indican las principales enzimas implicadas. Estos cofactores son posteriormente utilizados en la cadena de transporte de electrones (complejo I-IV) para generar el gradiente de protones (H⁺) necesario para la síntesis de ATP, a través de la ATP sintetasa. Específicamente, la oxidación de estos cofactores permite el transporte de electrones oxidados (flechas rojas) y el bombeo de protones al espacio intermembrana. Q: Coenzima Q₁₀ y Cit-c: Citocromo c.

La cadena de transporte de electrones se compone por cuatro complejos (I-IV). De estos, solo los complejos I, III y IV son capaces de bombear protones al espacio intermembrana. Para ello, los distintos complejos necesitan cargarse negativamente a través del transporte de electrones, liberados de la oxidación de los cofactores NADH y FADH₂, entre centros redox de menor a mayor afinidad que contienen en sus estructuras (Papa et al., 2012; Zhao et al., 2019; Ramsay,

Introducción

2019). Los núcleos redox se componen por combinaciones variables de flavinas, Fe-S (hierro-azufre), diferentes grupos hemo y/o cobre (Ramsay, 2019).

Concretamente, en la fosforilación oxidativa el complejo I (NADH- ubiquinona oxidorreductasa) oxida la coenzima NADH. Los electrones que se desprenden saltan de un centro redox a otro, generando suficiente energía para el bombeo de protones. Posteriormente, la carga negativa se traslada a la coenzima Q₁₀ o ubiquinona. Al mismo tiempo, el complejo II (Succinato-Q oxidorreductasa) oxida FADH₂ y traspa, también, los electrones a la coenzima Q₁₀. Esta coenzima transporta las cargas al complejo III (Q-citocromo c oxidorreductasa) que de nuevo usa dichas cargas para bombear más protones. Finalmente, los electrones son transferidos al citocromo c, que los transfiere al complejo IV (Citocromo c oxidasa). Este último complejo, además de bombear protones termina con la reducción de oxígeno en H₂O. El gradiente generado de protones permite la síntesis de ATP. Por cada molécula de NADH se genera un total de ~2,5 moléculas de ATP, además de agua, CO₂ y NH₃ (Papa et al., 2012; Zhao et al., 2019; Ramsay, 2019).

Es importante destacar que la fosforilación oxidativa es posible gracias a la intervención de diversos factores de ensamblaje nucleares y otras proteínas auxiliares que coordinan la correcta conformación e inserción de los complejos de la cadena de transporte de electrones en las crestas mitocondriales (Tabla 1) (Alston et al., 2017), atendiendo la demanda energética celular de cada momento.

Tabla 1. Listado de genes que componen los distintos complejos de la fosforilación oxidativa, según sean codificados en el genoma nuclear o mitocondrial, y de los factores de ensamblaje o auxiliares relevantes para la actividad metabólica energética. ADNn=ADN nuclear (Adaptado de Alston et al, 2017).

Componente	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Complejo IV
Subunidades proteicas codificadas en el ADNmt	<i>MTND1, MTND2, MTND3, MTND4, MTND4L, MTND5, MTND6</i>	-	<i>MTCYB</i>	<i>MTCO1, MTCO2, MTCO3</i>	<i>MTAP6, MTAP8</i>
Subunidades proteicas codificadas en el ADNn	<i>NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA7, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFAB1, NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFB10, NDUFB11, NDUFC1, NDUFC2</i>	<i>SDHA, SDHB, SDHC, SDHD</i>	<i>UQCRB, UQCRC1, CYC1, UQCRC2, UQCRC3, UQCRH, UQCRQ, UQCR10, UQCR11</i>	<i>COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8</i>	<i>ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5D, ATP5E, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5H, ATP5I, ATP5O, ATP5J, ATP5J2, ATP5L, ATP5L2</i>
Factores de ensamblaje o auxiliares	<i>NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFAF7, FOXRED1, ACAD9, ECSIT, NUBPL, TMEM126B, TIMMDC1, C17orf89</i>	<i>SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3, SDHAF4</i>	<i>BCS1L, LYRM7, UQCC1, UQCC2, UQCC3, TTC19, PTCD2</i>	<i>COA1, COA3, COA4, COA5, COA6, COA7, COX10, COX11, COX14, COX15, COX16, COX17, COX18, COX19, COX20, SCO1, SCO2, SURF1, PET117, LRPPRC, PET100, CEP89, TACO1, OXAIL, APOPT1, NDUFA4, FASTKD2</i>	<i>ATPAF1, ATPAF2, TMEM70</i>

Introducción

Recientemente, se ha observado que estos complejos pueden organizarse en los llamados “supercomplejos” o “respirosomas”. Principalmente, se han podido determinar las siguientes estequiometrías: III_2IV_1 , I_1III_2 , $I_1III_2IV_1$, and $I_2III_2IV_{1-2}$ (Signes and Fernandez-vizarra, 2018), aunque se ha postulado que incluso sean más complejas. En cuanto a su formación, principalmente existen dos teorías: 1) Según el modelo de plasticidad, principal teoría aceptada, el ensamblaje individual de los complejos es previo a la formación de las super estructuras. Esto permite una rápida asociación-disociación adecuada a las necesidades bioenergéticas de cada momento (Acín-Pérez et al., 2008). En consecuencia, el complejo II, IV y parte del III se encontrarían principalmente libres, mientras que una gran proporción del III se uniría con el complejo I (Guo et al., 2018). 2) La segunda teoría más apoyada, postula que el montaje de las distintas estructuras individuales requiere de la formación en paralelo de los respirosomas. En este sentido, se ha hipotetizado que previamente a la formación del complejo I, se requeriría la formación de la estructura $III_2.IV$ -preI (Moreno-Lastres et al., 2012). No obstante, la función y regularización estricta de los respirosomas, a nivel basal y patológico, sigue siendo una incógnita hoy en día. En cualquier caso, alteraciones en el conjunto de estos complejos se han visto relacionadas con múltiples patologías (Alston et al., 2017).

2. Particularidades de la mitocondria en el sistema nervioso central

La función mitocondrial es especialmente relevante en aquellos tejidos con alta demanda energética, como el sistema nervioso central (SNC). Concretamente, la fosforilación oxidativa junto la capacidad de modular los niveles de Ca^{2+} , han convertido a la mitocondria en un organoide esencial en el SNC, dado que estos procesos intervienen en la sinaptogénesis, poda axonal y, especialmente, en la neurotransmisión (Devine and Kittler, 2018). En referencia a este último proceso, el mantenimiento de los circuitos neurológicos consume una gran cantidad de ATP. Específicamente, el reciclaje vesicular y el mantenimiento del

potencial de membrana en los terminales axonales se cree son los procesos con mayor gasto energético del SNC, en parte sujetos al bombeo de iones dependiente de ATP (Vos et al., 2010; Harris et al., 2012). Igualmente, en las dendritas, la integración de la respuesta postsináptica o plasticidad sináptica produce, entre otras respuestas, un incremento de la síntesis proteica, que también requiere de altos niveles de ATP, consumiendo específicamente ~4 moléculas de ATP por cada puente peptídico sintetizado (Rangaraju et al., 2019). Por tanto, la distribución de la mitocondria a lo largo de la neurona ha permitido su especialización funcional a niveles subcelulares, posibilitando el desarrollo de funciones complejas y heterogéneas en paralelo. En consecuencia, alteraciones en la maquinaria mitocondrial tienen un impacto múltiple en las distintas funciones neuronales (Stauch et al., 2014; Grimm et al., 2018).

Adicionalmente al papel que desarrolla la mitocondria a nivel neuronal, el metabolismo mitocondrial se ha relacionado con otros tipos celulares del SNC. Concretamente, en los astrocitos, clásicamente considerados glucolíticos, se ha observado un incremento de genes relacionados con la vía de oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (Eraso-Pichot et al., 2018), demostrando una especialización diferente del organelo en la gestión energética. Por otro lado, algunos estudios han demostrado la existencia del intercambio mitocondrial entre distintos tipos celulares del SNC. Específicamente, se ha observado que mitocondrias neuronales disfuncionales podrían degradarse fisiológicamente en el astrocito por transmitofagia (Davis et al., 2014) o, en casos patológicos, intercambiarse por mitocondrias sanas de origen glial (Hayakawa et al., 2017). Estos hechos añaden un nivel de complejidad adicional a la biología mitocondrial en este tejido, alejándose de la clásica visión en la que una mitocondria se crea y se destruye dentro de la misma célula. De este modo, es relevante entender el mantenimiento de la homeostasis bioenergética cerebral como el resultado de la integración de la función mitocondrial a nivel intra- e intercelular (Qi et al., 2020) (Figura 2).

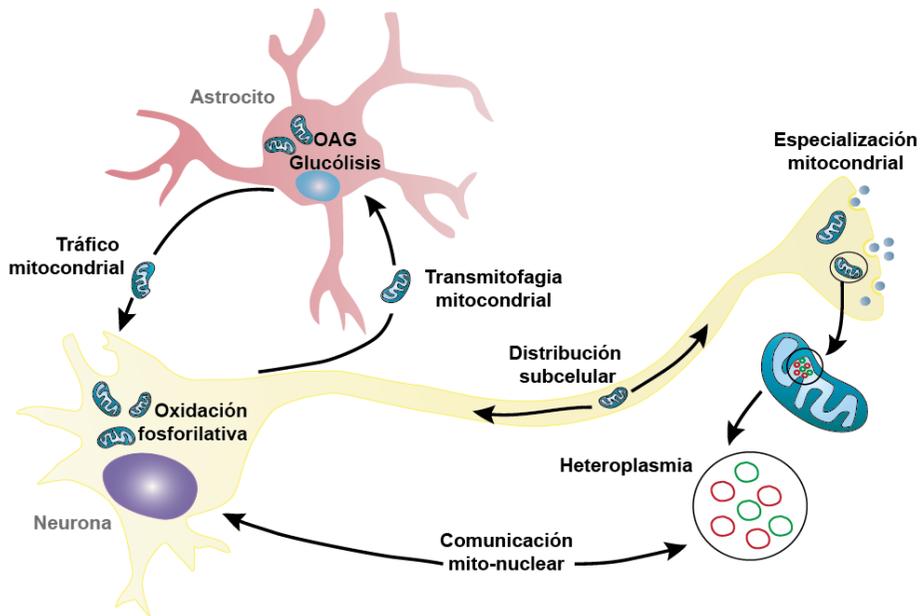


Figura 2. La mitocondria en el SNC. Representación de la compleja especialización mitocondrial a nivel subcelular e intercelular en el SNC (OAG: Oxidación ácidos grasos).

3. Enfermedades mitocondriales y su implicación en la neurodegeneración

La especialización multifuncional de la mitocondria en el SNC es especialmente evidente en caso patológico. Defectos en el metabolismo bioenergético suelen derivar en problemas neurológicos severos con un espectro heterogéneo de susceptibilidad celular y neuroanatómica (Dubinsky, 2009; Pinto and Moraes, 2013). Así, por ejemplo, en el caso de la Neuropatía óptica hereditaria de Leber, derivada de mutaciones en el ADNmt, se puede observar una degeneración restringida de las células ganglionares de la retina (Meyerson et al., 2015). Este conjunto de patologías son conocidas bajo el nombre de enfermedades mitocondriales, las cuales pueden clasificarse como primarias o secundarias. Las enfermedades mitocondriales primarias (EM_P) son consecuencia de mutaciones directamente relacionadas con la función de la fosforilación oxidativa, mientras que las secundarias (EM_S) representan aquellas alteraciones del funcionamiento

mitocondrial derivadas de otros errores genéticos o factores ambientales (Niyazov et al., 2016). Notablemente, la marcada restricción neuroanatómica y celular en la especialización de la función mitocondrial, tanto a nivel fisiológico como patológico, pone al organelo en una posición relevante para la investigación de un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas (Figura 3). Así, por ejemplo, en muestras de pacientes con Parkinson, que sufren una clara degeneración de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la región de la *Substantia nigra pars compacta*, se puede observar un incremento de la biogénesis mitocondrial a nivel axonal (Reeve et al., 2018). Por otro lado, en pacientes con Alzheimer, que se caracterizan por un detrimento de las neuronas colinérgicas con impacto en la corteza cerebral y del hipocampo, existe una disminución del contenido mitocondrial sináptico en regiones específicas corticales (Pickett et al., 2018). Por tanto, comprender el impacto directo del daño mitocondrial en las EM_P puede ser de utilidad para conocer las bases moleculares subyacentes en las EM_S, como el Alzheimer, Parkinson, Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (Cabral-Costa and Kowaltowski, 2020).

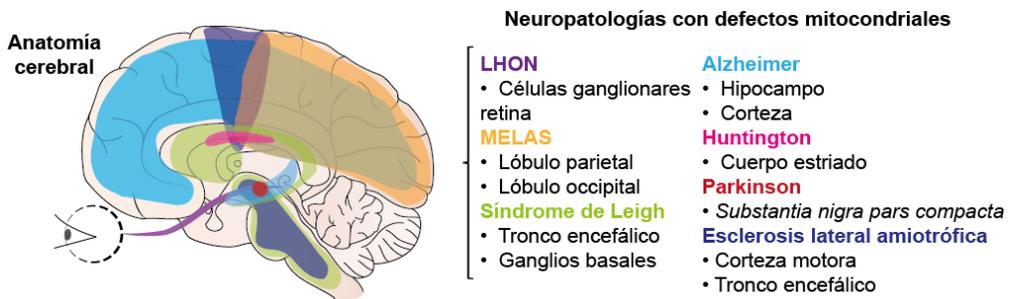


Figura 3. Representación del impacto de la disfunción mitocondrial en un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas. La restricción del daño neuroanatómico define las neuropatologías con disfunción primaria en la maquinaria mitocondrial (LHON: *Leber hereditary optic neuropathy*, MELAS: *Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes* y Síndrome de Leigh) o secundaria (Enfermedad de Parkinson, Alzheimer o Huntington y Esclerosis lateral amiotrófica).

Cabe destacar que, aunque las EM_P afectan principalmente a tejidos con alta demanda energética como los músculos, el corazón y/o el SNC, suelen tener también una afectación a nivel multisistémico (Suomalainen and Battersby,

Introducción

2017). Asimismo, la etiología genética de estas enfermedades suele ser diversa, afectando tanto el ADN nuclear (ADNn) como el mitocondrial. En conjunto con la heterogeneidad del tipo celular o tejido implicado, alteraciones en distintos genes pueden converger en un mismo signo clínico. Por otro lado, una misma mutación puede tener distintos efectos según el tejido donde se localice, especialmente, dependiendo del grado de heteroplasmia en el caso de las mutaciones del ADNmt (Wallace, 1999). En consecuencia, estas características de las EM_p dificultan establecer una correlación genotipo-fenotipo (Ng and Turnbull, 2016; Alston et al., 2017) y encontrar una cura efectiva (Zhang et al., 2020). Igualmente, pese a los numerosos avances científicos desde el primer diagnóstico genético para EM_p (Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988), establecer la prevalencia de estas enfermedades sigue siendo complicado. Actualmente, se estima que en adultos es de aproximadamente 1:4.300, teniendo en cuenta las mutaciones en el ADN nuclear y mitocondrial y aquellos individuos con riesgo de desarrollar EM_p durante su vida o de transmitir una mutación patológica (Gorman et al., 2015). Por otro lado, en menores de 16 años se encontrarían entre 5-15 casos por cada 100.000 habitantes (Darin et al., 2001; Skladal et al., 2003). Pese a estas dificultades, la gran diversidad de EM_p puede subclasificarse según el grado de deprivación energética, simplificando establecer un diagnóstico y, en extensión, un pronóstico. Asimismo, según el grado de heteroplasmia una misma mutación puede subclasificarse en distintas patologías mitocondriales (White et al., 1999), facilitando su estudio posterior.

4. El síndrome de Leigh como enfermedad mitocondrial primaria

Dentro de las EM_p, el Síndrome de Leigh (SL) es una de las manifestaciones clínicas de enfermedad mitocondrial con afectación neurológica más severas que existe (Finsterer, 2008). Adicionalmente, los pacientes con SL presentan un patrón muy restringido del daño neuroanatómico, ofreciendo una oportunidad única para entender el impacto patológico de la disfunción mitocondrial en el

SNC, incluso teniendo en cuenta la especialización multifuncional del organelo dependiente del contexto celular.

4.1. Historia, prevalencia y pronosis del SL

El SL, también conocido como encefalomielopatía necrotizante subaguda (OMIM: #256000), fue descrito por primera vez en 1951 por el Dr. Denis Leigh a través del caso de un infante varón, de 7 meses de edad, fallecido al cabo de 6 semanas por un trastorno severo del SNC. A nivel neuropatológico, se localizaron lesiones necróticas subagudas simétricas y bilaterales en áreas del tálamo, tronco encefálico y de la médula espinal. Lesiones que iban acompañadas de una prolífera vascularización, microglía y astrogía (Leigh, 1951).

Actualmente, el SL se conoce como la enfermedad mitocondrial infantil más recurrente con una prevalencia de 1 de cada 40.000 nacimientos vivos (Rahman et al., 1996; Chen et al., 2018). No obstante, existen algunas poblaciones con una incidencia mayor de casos debido a un efecto fundador, tales como la región canadiense de Saguenay-Lac-Saint-Jean (~1:2.000) (Morin et al., 1993) o las islas Feroe de Dinamarca (~1:1.700) (Ostergaard et al., 2007).

La aparición de la patología en el SL suele darse a edad propiamente infantil (<2 años) (Sofou et al., 2014). No obstante, también existen casos prenatales (Leshinsky-Silver et al., 2010), en menor frecuencia en adolescentes y, en raras ocasiones en adultos (Finsterer, 2008; Mckelvie et al., 2012; Wesolowska et al., 2015; Jabeen et al., 2016), sin que existan diferencias significativas relativas al sexo (Sofou et al., 2014).

La supervivencia en el SL es variable, aunque la mayoría de los pacientes tienen un mal pronóstico con una supervivencia media de ~1,8 años después de la primera aparición sintomatológica del SL (Sofou et al., 2014). Los casos con una pronosis más severa se han asociado principalmente a una aparición muy temprana de la enfermedad, con variantes genéticas definidas, como la

deficiencia del gen *NDUFS4* (Assouline et al., 2012), epilepsia y retraso significativo del crecimiento (Sofou et al., 2014).

4.2. Signos clínicos y diagnóstico del SL

Después de un desarrollo aparentemente normal, usualmente precedido por un episodio de alteración metabólica, como una infección o una intervención quirúrgica, los pacientes con el SL empiezan a desarrollar las primeras manifestaciones clínicas (Sofou et al., 2014; Schubert and Vilarinho, 2020). Raramente, algunos pacientes presentan en primer lugar hipertrichosis en extremidades y frente, atribuibles a mutaciones en el gen *SURF1* del complejo IV de la cadena de transporte de electrones (Baertling et al., 2013). No obstante, lo más frecuente es que antes de los dos años, estos pacientes manifiesten los signos clínicos correspondientes a la neurodegeneración propia del SL, que se traducen principalmente en daño neurológico y motor, derivando en pérdida de las aptitudes adquiridas psicomotoras; oftalmoplejía con nistagmo y/o atrofia ocular; disfagia con consecuente pérdida de peso, vómitos y retraso en el crecimiento; ataxia, hipotonía, distonía, parálisis de los nervios craneales, polineuropatía motora y miopatía; anomalías respiratorias severas y, en algunos casos, retinitis pigmentosa o sordera. Dentro de esta clínica, cabe destacar la prevalencia de las anomalías respiratorias con una representación del 64-72% del total de casos clínicos con SL, que suelen derivar en fallo respiratorio agudo, siendo la principal causa de fallecimiento en el SL. Dificultando aún más el pronóstico, la epilepsia también es un signo clínico habitual en el SL, pudiendo presentarse hasta en un 40-50% de los pacientes con SL. Además de los signos neurológicos y motores, los pacientes con SL pueden mostrar afectación cardíaca, gastrointestinal y endocrina, entre otros signos (Figura 4) (Finsterer, 2008; Sofou et al., 2014; Ruhoy and Saneto, 2014; Gerards et al., 2016; Lee et al., 2019). Los casos de aparición en adultos suelen derivar, además, en discapacidad

intelectual, pérdida de memoria, alucinaciones y dolores de cabeza (Gray et al., 1984; Mckelvie et al., 2012).

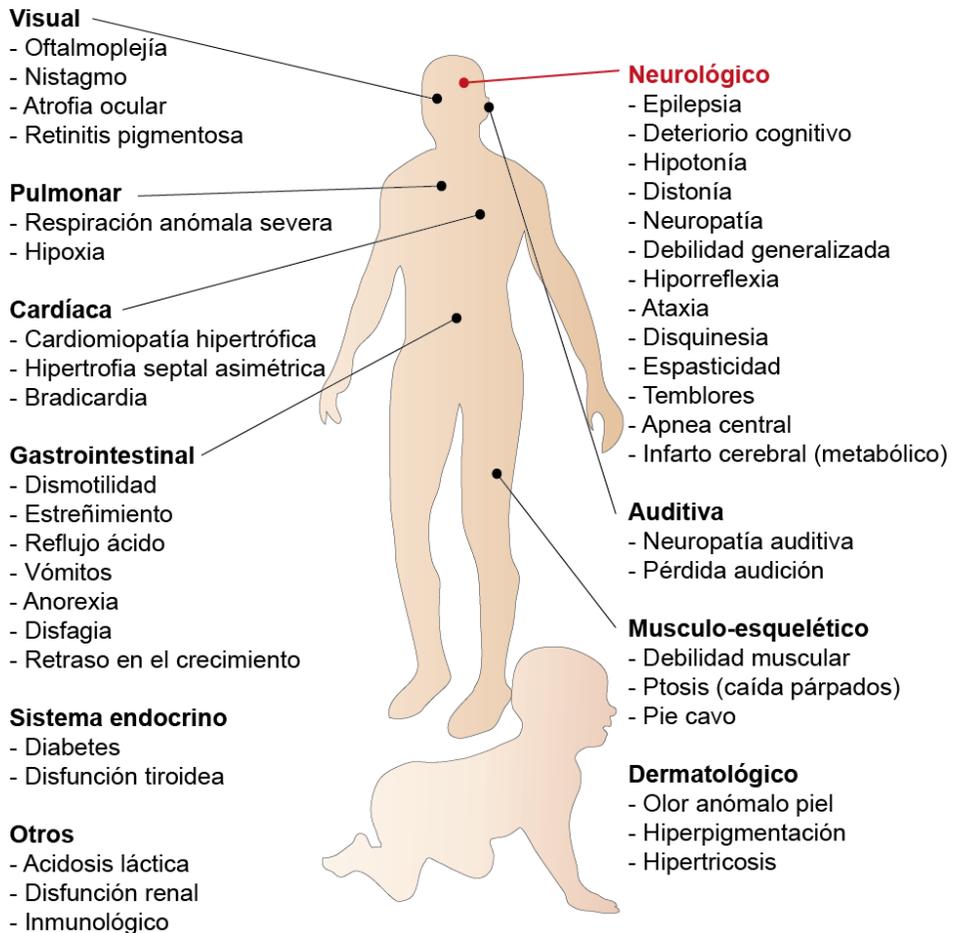


Figura 4. Signos clínicos presentes en la progresión del síndrome de Leigh siendo los problemas neurológicos (rojo) los más severos.

El diagnóstico del SL es complejo debido al gran solapamiento clínico y molecular de las EM_p. En 1996 Rahman et al., y, posteriormente, en 2016 Lake et al., establecieron los criterios para el diagnóstico del SL, definiéndolo como una enfermedad neurodegenerativa progresiva conteniente de 1) retraso motor e intelectual, 2) daño clínico asociado al tronco encefálico y/o los ganglios basales y 3) disfunción del metabolismo energético mitocondrial debido a errores en la

Introducción

fosforilación oxidativa o en la piruvato deshidrogenasa; en cualquier otro gen relacionado directamente con la producción energética mitocondrial; o niveles elevados de lactato en el suero o en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Por otra parte, en 2014 Baertling et al., propuso una guía detallada para el diagnóstico del SL, basada principalmente en imágenes de resonancia magnética (RM) para la detección de las lesiones neurológicas, análisis bioquímico de lactato y otros compuestos de la biosíntesis energética y, finalmente, en el diagnóstico genético (Tabla 2). Sin embargo, es importante tener en cuenta que ciertas pruebas metabólicas y bioquímicas pueden tener resultados negativos dependiendo del tejido estudiado. Por ello, es importante conocer la fisiopatología exacta de cada caso antes de determinar un diagnóstico definitivo (Gerards, 2014).

Tabla 2. Protocolo de diagnóstico para la detección de SL y exclusión de otras enfermedades metabólicas. Adaptado de Baertling et al., 2014; Schubert and Vilarinho, 2020.

Historial familiar	<ul style="list-style-type: none">• Aparición de la enfermedad (infección, cirugía, evento)• Detección de retroceso/pérdida psicomotora• Exclusión de diagnóstico diferencial
Exploración física	<ul style="list-style-type: none">• Afectación funcional ganglios basales o tronco encefálico (Nistagmo, disfunción autonómica, etc.)• Otros (Hipertriosis, etc.)
Parámetros bioquímicos	<ul style="list-style-type: none">• Acidosis láctica• Hiperalaninemia• Ácidos orgánicos en orina• Panel de Carnitina• Parámetros generales bioquímicos• Otros
Resonancia magnética	<ul style="list-style-type: none">• Lesiones simétricas bilaterales• Incremento de lactato por espectroscopia• Otros
Análisis genético	<ul style="list-style-type: none">• Gen específico de acuerdo con los resultados anteriores• Secuenciación masiva en caso de necesidad
Biopsia piel/músculo	<ul style="list-style-type: none">• Prueba invasiva solo en caso de necesidad

4.3. Etiología genética del SL

De igual modo que las manifestaciones clínicas, el origen genético en el SL es muy heterogéneo, traduciéndose en una amplia variabilidad en la progresión de la enfermedad sin una correlación genotipo-fenotipo clara. Aproximadamente un 20-25% de las mutaciones tienen lugar en el ADNmt, mientras que el resto se encuentran en el ADNn, resultado de la proporción de genes mitocondriales codificados en este genoma (Ruhoy and Saneto, 2014). Estas mutaciones pueden ser *de novo* o ser transmitidas por herencia materna, ligadas al cromosoma X, autosómicas dominantes o autosómicas recesivas (en la mayoría de los casos) (Lake et al., 2016). Desde el primer diagnóstico genético para SL (Hamman et al., 1991), se han identificado más de 75 genes como causa genética de SL. Prácticamente la mitad de estas aberraciones genéticas se han determinado en la última década gracias a los progresos en secuenciación genómica (Lake et al., 2016). Siguiendo con el criterio de diagnóstico establecido en 1996, comentado anteriormente, la mayoría de las mutaciones tienen un impacto directo en la fosforilación oxidativa o la actividad piruvato deshidrogenasa. No obstante, impactos en el mantenimiento del ADNmt, transcripción y traducción, así como, en procesos implicados en la importación o exportación de enzimas u otro material relevante en el metabolismo energético mitocondrial, pueden derivar en el SL (Finsterer, 2008). Se resumen en la Tabla 3, según la función biomolecular, los genes nucleares y mitocondriales relacionados con el SL descubiertos hasta la fecha.

que el complejo I, con 45 subunidades, es una de las enzimas transmembrana más grandes de la célula (Zhu et al., 2016). Por tanto, múltiples mutaciones pueden afectar esta estructura. En segundo lugar, aproximadamente con un ~15% de los casos, se encuentra la deficiencia del complejo IV. Comparativamente con el complejo I, el gen codificante para el factor de ensamblaje *SURF1* (*Surfeit Locus Protein 1*) sería el principal responsable, con >200 casos reportados (Lake et al., 2016). En tercer lugar, se encuentra la deficiencia en el complejo de la ATP sintetasa con un 10%-20% de los casos. Particularmente, en esta situación solo se han publicado mutaciones en el gen *MTATP6*, codificado en el ADNmt (Lopez-Gallardo et al., 2014). El resto de las mutaciones afectarían a los complejos II, III y Coenzima Q₁₀ con una representación <10% de los casos o a genes asociados con la piruvato deshidrogenasa (Rahman et al., 1996; Ma et al., 2013; Sofou et al., 2014; Lake et al., 2016). Es importante destacar que aún existen muchas variantes genéticas en el SL que no se han identificado, dificultando la caracterización del origen genético de esta enfermedad (Lake et al., 2016).

4.4. Neuropatología en el SL

Dentro de las EM_p, el SL se caracteriza principalmente por presentar lesiones focales, necróticas simétricas y bilaterales que se encuentran a lo largo del neuroaxis, principalmente a nivel de sustancia gris. La bilateralidad del daño neurológico es una particularidad que define el SL. Imágenes de RM han demostrado que los pacientes con SL típicamente presentan lesiones en regiones del tronco encefálico y/o en los ganglios basales, destacando la región del putamen y la *Substantia nigra*. En ciertos casos pueden encontrarse lesiones también en el tálamo, médula espinal y cerebelo, específicamente, en el núcleo dentado de éste (Figura 5) (Lake et al., 2015).

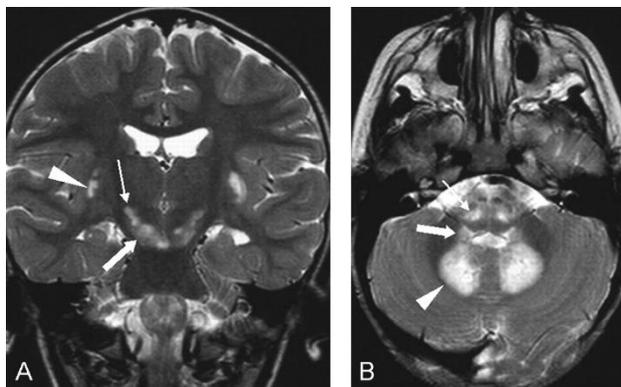


Figura 5. Imágenes de resonancia magnética T2 en paciente de 3 años con síndrome de Leigh. A) Imagen coronal muestra lesiones simétricas en el núcleo subtalámico (flecha fina), sustancia negra (flecha gruesa) y en parte del putamen (punta de flecha) de los ganglios basales. B) Prolongación axial con lesiones en la medula del tronco encefálico (flecha fina), pedúnculos cerebelosos inferiores (flecha gruesa) y en el núcleo dentado (punta de flecha). Adaptado de Rossi et al., 2003.

Otra particularidad del SL es la alta concentración de lactato en el LCR y en el parénquima cerebral. Esto correlaciona con que los pacientes con el SL muestran acidosis láctica en suero, aunque habitualmente las concentraciones altas de lactato son indetectables por esta vía (suero). En este sentido, la RM-espectroscópica tiene una sensibilidad superior (Chi et al., 2011).

A nivel histológico, las lesiones neuropatológicas muestran una preservación neuronal relativa, con neuropilos caracterizados por presentar vacuolización (que deriva en espongirosis), desmielinización, gliosis y proliferación e hipertrofia vascular, resultando en un patrón neurodegenerativo (Finsterer, 2008; Ruhoy and Saneto, 2014; Lake et al., 2015). La desmielinización es un rasgo propio de la leucoencefalopatía, que indica una interrupción de la transmisión neuronal por la pérdida de oligodendrocitos. Además, es una característica típica de la deficiencia del complejo I mitocondrial (Fassone and Rahman, 2012). En referencia al engrosamiento vascular, este va acompañado por una expansión del núcleo de las células endoteliales y una reducción del citoplasma. En algunos casos, se ha observado ensanchamiento ventricular antes de la aparición de los daños tisulares (Chi et al., 1994).

4.5. Tratamientos clínicos para el SL

Actualmente, la mayoría de los tratamientos para el SL son paliativos o están enfocados en ralentizar la progresión de la enfermedad (Tabla 4). No obstante, la mayoría de estos pierden su efectividad al interrumpirse su administración. Las distintas variantes genéticas, la baja incidencia de pacientes con SL y la diferencia en el rango de edad de estos han dificultado los ensayos clínicos longitudinales, complicando la búsqueda de una cura efectiva (Chen et al., 2018; Schubert and Vilarinho, 2020). Asimismo, cabe tener en cuenta que no todos los tratamientos son válidos para todo el espectro clínico del SL.

Tabla 4. Resumen de los principales tratamientos administrados a pacientes con el SL y sus beneficios principales.

Tratamiento	Efecto
Coenzima Q₁₀ o derivados (EPI-743 o Idebenona)	↑ Flujo de electrones ↓ Daño oxidativo
Vitamina B2 (riboflavina)	↓ Acidosis láctica (Complejo I)
Vitamina B1 (tiamina) o B7 (biotina)	↑ Piruvato deshidrogenasa ↑ Transportador <i>SLC19A3</i>
Piruvato	Regulación niveles NAD ⁺ ↑ Fosforilación oxidativa
Dicloroacetato	↑ Piruvato → Acetil-CoA ↓ Acidosis láctica
L-carnitina	↑ β-oxidación ácidos grasos ↑ Síntesis ATP
Dieta cetogénica	↑ β-oxidación ácidos grasos ↑ Síntesis ATP ↓ Epilepsia
Reducción valina en dieta	↓ Acumulación metabolitos intermedios de la mitocondria
Ejercicio moderado	↑ Fosforilación oxidativa ↑ Captación oxígeno ↑ Biogénesis mitocondrial ↓ Acidosis láctica

Continuación de la Tabla 4	
Tratamiento	Efecto
Antiepilépticos (levetiracetam, lamotrigina, oxcarbazepina, zonisamida, topiramato, perampanel o carbamazepina)	↓ Epilepsia

Principalmente, la terapia para el SL se basa en la administración de un *cóctel* de suplementos. La coenzima Q₁₀ o algunos de sus derivados (EPI-743 e Idebenona) han reportado resultados positivos modulando el flujo de electrones en la cadena respiratoria y disminuyendo el daño oxidativo (Martinelli et al., 2012; Chen et al., 2018). La administración de vitaminas, como la riboflavina (B2), ha resultado en una disminución de la acidosis láctica en casos con deficiencia del complejo I por mutación en el gen *ACAD9* (Gerards et al., 2011). De manera similar, la administración de tiamina (B1) y/o biotina (B7) promueven la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa o del transportador *SLC19A3*, demostrando probablemente los resultados con mejor pronóstico en pacientes con defectos en estas vías (Haack et al., 2014). Por otro lado, el tratamiento con piruvato normaliza los niveles de NAD⁺, potenciando la fosforilación oxidativa (Tanaka et al., 2007). Asimismo, la administración de dicloroacetato permite la rápida conversión de piruvato a acetyl-CoA y la disminución del contenido de lactato, útil en pacientes con la mutación T8993C en el gen *MTATP6*, deficiencias en el complejo piruvato deshidrogenasa y del complejo I (Stefano et al., 1995; Parikh et al., 2009). En raras ocasiones, la deficiencia de carnitina puede mejorarse con el suplemento L-carnitina, permitiendo la transferencia de ácidos grasos a la mitocondria y promoviendo así la β -oxidación (Parikh et al., 2009).

Cambios en el estilo de vida han resultado también beneficiosos. La aplicación de una dieta cetogénica promueve la síntesis de ATP, a través de potenciar la β -oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, en casos de deficiencia de la piruvato deshidrogenasa, la dieta cetogénica ha demostrado ser positiva para el

control de la epilepsia (Wijburg et al., 1992; Pereira and Sampaio, 2016). De manera similar, la reducción de la valina en la dieta parece tener resultados favorables en pacientes con errores genéticos en los genes *HIBCH* y *ECHS1*, relacionados con el catabolismo de la valina e implicados en la acumulación tóxica de metabolitos en la mitocondria (Distelmaier et al., 2017). Adicionalmente, la realización moderada de ejercicio promueve la actividad de la cadena de transporte de electrones, incrementando la captura de oxígeno (Taivassalo et al., 2001). A su vez, el ejercicio puede estimular la biogénesis mitocondrial, a través de la potenciación de PGC1- α (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α*), incrementando la actividad mitocondrial y regulando el contenido de lactato en sangre (Kang and Ji, 2012).

En referencia al tratamiento contra la epilepsia, hoy en día existen un gran número de fármacos. Sin embargo, muchos de ellos emplean la mitocondria como mecanismo de acción. En consecuencia, tienen un efecto tóxico en casos de deficiencia mitocondrial, siendo el ácido valproico el caso más representativo (Finsterer and Scorza, 2017; Schubert and Vilarinho, 2020). Teniendo en cuenta esto, algunos de los antiepilépticos más usados para el SL son el levetiracetam, lamotrigina, oxcarbazepina, zonisamida, topiramato, perampanel o la carbamazepina (Singh and Brashier, 2014; Lee et al., 2019). No obstante, los resultados obtenidos no son prometedores.

Finalmente, los avances en técnicas de reproducción asistida han permitido disminuir a niveles no patológicos el contenido de ADNmt mutante de herencia materna. Para evitar la transmisión de la mutación, se ha logrado transferir el núcleo genómico a un nuevo ovocito, con material mitocondrial sano, fecundado con el espermato del padre (Zhang et al., 2017). Siguiendo en la misma línea, se han empezado a implementar técnicas de edición genética para modificar variantes patológicas y evitar su transferencia por línea germinal (Schubert and Vilarinho, 2020).

Introducción

En la última década, estudios preclínicos han demostrado además que la administración de rapamicina (Johnson et al., 2013), de antioxidantes como el AD4 (N-acetilcisteína amida) o KH176 (Liu et al., 2015; De Haas et al., 2017), la inducción a un estado de hipoxia (Jain et al., 2016), la regulación de la fusión mitocondrial mediante sobreexpresión de *Opa1* (Civiletto et al., 2015), la inhibición de PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) mediante administración de PJ34 (Felici et al., 2014) o la terapia génica (Meo et al., 2017; Reynaud-Dulaurier et al., 2020) podrían, en el futuro, utilizarse como potenciales tratamientos. No obstante, en muchos casos, como se comenta más adelante, se desconocen los beneficios moleculares asociados a estas terapias y son muchos los efectos adversos en ciertos casos, dificultando su aplicabilidad en humanos.

4.6. Modelos animales para el estudio del SL

La primera caracterización de un modelo animal para el SL fue el *Canis lupus familiaris* Husky Alaska. Estos animales presentan una encefalopatía mortal acompañada de ataxia, epilepsia, anomalías del comportamiento, ceguera, hipoalgesia facial y disfagia, con manifestación aguda a edad temprana y evolución, principalmente, estática. A nivel histopatológico, las principales lesiones se encuentran en el tálamo, con incremento de vacuolización, hipertrofia e hiperplasia vascular y de gliosis (Brenner and Wakshlag, 2000). Posteriormente a su caracterización, se determinó que mutaciones en el gen *SLC19A3.1*, encargado del transporte de la tiamina necesaria para la actividad de la piruvato deshidrogenasa, eran probablemente las causantes de la neuropatología en estos perros (Vernau et al., 2013). No obstante, este animal no recapitula las lesiones principales del SL humano.

En este sentido, en los últimos años se ha puesto especial esfuerzo en el desarrollo de modelos animales que reproduzcan la patología humana con el objetivo de realizar una investigación traslacional. Principalmente, estos modelos se basan en ratones transgénicos con mutaciones similares a las

descritas en los pacientes humanos con el SL (se resumen los más significativos en la Tabla 5). Aunque también se han desarrollado en otras especies, como en *Drosophila melanogaster* (Hegde et al., 2014), los avances científicos en edición génica (Gurumurthy and Lloyd, 2019) y el alto grado de similitud genética, anatómica y fisiológica con los humanos que ofrece el ratón, además de un fácil mantenimiento y reproducción (Li and Auwerx, 2020), hacen especialmente útil a este animal como modelo en el estudio de enfermedades humanas (Rosenthal and Brown, 2007; Justice and Dhillon, 2016; Perlman, 2016).

Tabla 5. Principales modelos murinos para la investigación del SL según el gen mutado y la aparición de lesiones neuropatológicas, anomalías motoras y la esperanza de vida de cada modelo (Δ =deficiencia).

Signos clínicos SL/ Modelo murino	<i>Surf1</i>Δ/Δ	<i>Cox15</i>$m\Delta/m\Delta$	<i>Sco2</i>Δ/Δ	<i>Ndufs4</i>Δ/Δ
Lesiones cerebrales-SL	No	No ³	No	Sí
Anomalías motoras	Sí ¹	Sí	Sí	Sí
Reducción esperanza de vida	No ²	No	No	Sí

1. Leves.
2. Se observa una extensión de la esperanza de vida por encima de los controles.
3. Modelo murino con delección de *Cox15* condicional para músculo esquelético ($m\Delta$). La delección a nivel constitutivo no es viable.

Uno de los primeros ratones transgénicos creados para el estudio del SL presenta una disrupción del gen *Surf1*, factor de ensamblaje del complejo IV. De este modelo se crearon dos ratones, el primero con una alta mortalidad prenatal (Agostino et al., 2003), debido a la inserción de un casete NEO (*Neomycin resistance gene*) en el transgén, y el segundo con segregación mendeliana (Agnello et al., 2007). Pese a presentar una de las mutaciones más severas y comunes en pacientes con SL, la mutación en estos ratones deriva en una moderada disminución de la actividad del complejo IV a nivel multisistémico con un leve detrimento del músculo esquelético y la función motora, ausencia de anomalías cerebrales a nivel histológico y un claro incremento de la esperanza de vida en comparación al grupo control.

Introducción

Asimismo, la creación de un modelo murino deficiente para la subunidad COX15 (*Cytochrome C Oxidase Assembly Homolog 15*), implicada en la biosíntesis de grupos hemo del complejo IV, es letal a nivel constitutivo, limitando su uso. No obstante, la restricción de esta mutación a nivel del músculo esquelético se traduce en un tamaño corporal menor y anomalías motoras significativas (Viscomi et al., 2011). También afectando al complejo IV, se creó un ratón con disrupción del locus *Sco2* (*Synthesis Of Cytochrome C Oxidase 2*), mediante una doble estrategia KO/KI (*knock out/knock in*), portadora de la mutación más frecuente para este gen en humanos (E129K). Mientras mutaciones en este locus derivan en una cardioencefalomiopatía grave en humanos, en ratón producen únicamente debilidad muscular, sin afectación a nivel de peso o supervivencia (Yang et al., 2010). Por el contrario, la delección de *Taco1* (*Translational Activator Of Cytochrome C Oxidase I*), activador traduccional de *Cox1*, que en humanos deriva en el desarrollo tardío del SL, en ratones conlleva problemas visuales, degeneración de la retina, hipertrofia cardíaca y disfunción motora, también con desarrollo a largo plazo (Richman et al., 2016). Estos últimos animales presentan un nivel de actividad del complejo IV similar al modelo murino deficiente para *Surf1* y *Sco2*. No obstante, la falta de severidad de la deficiencia del complejo IV en estos animales comparativamente con lo que sucede en humanos podría explicarse por la presencia de proteínas con funciones redundantes presentes en el modelo murino que suplan la deficiencia.

A destacar, otros modelos murinos para el estudio del SL generados conllevan la deficiencia del gen *Slc25a46*, que promueve una hipoplasia cerebelar en ratones y una reducción significativa de la esperanza de vida (Terzenidou et al., 2017); la delección de *Foxred1*, asociada al complejo I, a nivel intracerebral a los seis meses de edad que deriva en una degeneración del estriado acompañada de temblores (Salama et al., 2019); o el silenciamiento de *Sdhc* del complejo II, después del destete, el cual promueve debilidad muscular, retraso del crecimiento y la muerte al mes desde la inducción, aunque sin anomalías cerebrales (Khazal et al., 2019). El diseño de estos ratones expone la relevancia del gen afectado y del

momento de la mutación en el fenotipo patológico final, señalando la complejidad del estudio de las EM_p. Esto unido a las diferencias entre ratones y humanos han dificultado la creación de un buen modelo murino para el estudio del SL.

En este sentido, el desarrollo del ratón deficiente para el exón 2 del gen *Ndufs4* del complejo I (Ndufs4KO), uno de los genes mutados con más incidencia en el SL humano, recapitula prácticamente todos los signos neuropatológicos y lesiones cerebrales, a nivel de tronco encefálico y ganglios basales, que caracterizan los pacientes humanos. Con una corta esperanza de vida y un fenotipo muy severo, este modelo es hasta la fecha el modelo animal más utilizado en la investigación del SL (Kruse et al., 2008; Quintana et al., 2010; Quintana et al., 2012). Significativamente, existe un gran paralelismo entre la disrupción de la subunidad NDUF54 murina y humana. Así, otros modelos murinos con disrupción en este mismo gen, ya sea por inserción espontánea retroviral en el exón 3 (*Ndufs4^{flky/flky}*, Leong et al., 2012) o por delección de los últimos 10-15 aminoácidos (Ingraham et al., 2009), también presentan fenotipos severos. Adicionalmente, recientemente se ha descrito otro modelo murino, deficiente para *Parl* (Cipolat et al., 2006; Spinazzi et al., 2019), que presenta una progresión patológica similar al ratón Ndufs4KO, en este caso con afectación directa a la biogénesis complejo III y a la coenzima Q₁₀.

4.6.1. Generación del ratón Ndufs4KO

El ratón transgénico Ndufs4KO se creó a partir de la inserción de dos secuencias loxP flanqueando al exón 2 del gen *Ndufs4* murino. Mediante el sistema Cre-loxP (Gu et al., 1993; Kim et al., 2018) se indujo la delección a nivel germinal de dicho exón (Figura 6), creando un ratón con el gen truncado (*Ndufs4^{Δ/Δ}* o Ndufs4KO) (Kruse et al., 2008).

Introducción

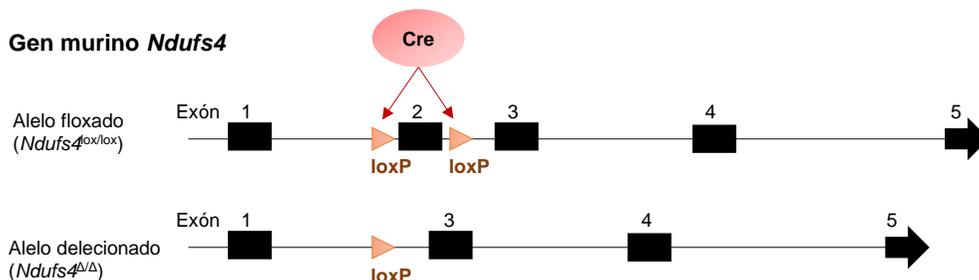


Figura 6. Estrategia genética para la delección del exón 2 murino del gen *Ndufs4* a partir del sistema Cre-loxP, en el cual el cruce de un animal con expresión constitutiva de la recombinasa Cre con el ratón *Ndufs4*^{lox/lox} induce la delección irreversible del exón flanqueado por las secuencias loxP, resultando en *Ndufs4*^{Δ/Δ}. Figura adaptada de Kruse et al., 2008.

A nivel basal, el gen nuclear *Ndufs4* codifica para una subunidad proteica no-enzimática de 18kDa del módulo N del complejo I mitocondrial, altamente conservada en mamíferos (Figura 7) (Mimaki et al., 2012). Así, la secuencia del promotor del gen humano presenta una similitud del 95% con el del ratón, con regiones de ensamblaje para los factores de transcripción NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), myoD (*myoblast determination protein 1*) e YY1 (*Yin And Yang 1 Protein*) (Petruzzella and Papa, 2002). A nivel funcional, la subunidad proteica NDUFS4 es fosforilada en el citoplasma en presencia de niveles elevados de AMP cíclico (AMPC), a través de la quinasa AMPC-dependiente (PKA), posiblemente, respondiendo a las necesidades metabólicas celulares (Petruzzella and Papa, 2002; Papa et al., 2012b). Esta fosforilación se ha sugerido que sería necesaria para permitir la entrada de esta proteína en la matriz mitocondrial y su posterior maduración. Una vez dentro del organelo, NDUFS4 se incorpora en el módulo N del complejo I, permitiendo el ensamblaje del resto del complejo y aportando estabilidad estructural (Petruzzella and Papa, 2002; Papa et al., 2012b). En consecuencia, la ausencia de esta subunidad en la holoenzima del complejo I tiene un impacto directo en la actividad mitocondrial, impidiendo la biogénesis del complejo I y, en extensión, impidiendo la transferencia de electrones (Lazarou et al., 2007; Calvaruso et al., 2012). En *Mus musculus*, concretamente el exón 2 codifica para la última parte del fragmento

diana a mitocondria y para los primeros 17 aminoácidos de la proteína madura. Así, su delección en este animal impediría su incorporación al complejo I.

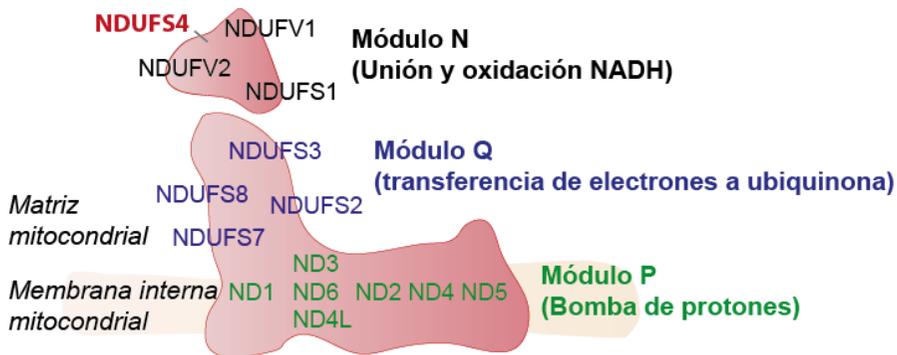


Figura 7. Representación de la estructura del complejo I mitocondrial en mamífero. Se detallan los tres módulos principales según función que componen el complejo I de la cadena de transporte de electrones. Se indica la posición aproximada de las 14 subunidades centrales para cada módulo (negro, azul o verde), altamente conservadas de procariotas a eucariotas. En rojo se indica la subunidad NDUFV4, perteneciente al módulo N. Adaptado de Mimaki et al., 2012.

4.6.2. Caracterización de la patología mitocondrial en el ratón *Ndufs4*KO

A nivel patológico, la delección del exón 2 en homocigosis del gen *Ndufs4* en ratón resulta en una encefalopatía similar al SL humano. Por el contrario, en heterocigosis, la mutación en este ratón no tiene ningún impacto sobre el fenotipo del animal (Kruse et al., 2008). A nivel de conducta, los ratones *Ndufs4*KO presentan un comportamiento normal, aunque es acompañado de un evidente retraso del crecimiento desde el nacimiento hasta el día postnatal 35 (P35). A partir de entonces, experimentan un progresivo deterioro motor, ataxia, pérdida de audición, disfunción visual, una rápida pérdida de peso, hipotermia (-2°C) y una muerte prematura a día \sim P50 (Kruse et al., 2008). Asimismo, estos animales desarrollan complicaciones respiratorias severas, acompañadas de una menor frecuencia respiratoria y cardíaca, pero con un mayor volumen corriente, traduciéndose en respiraciones más lentas y profundas a lo largo de la enfermedad (Quintana et al., 2012b). Además, presentan episodios epilépticos

que, en conjunto con los demás signos clínicos, recapitulan fehacientemente la neuropatología de los pacientes humanos con el SL (Quintana et al., 2010; Lake et al., 2015; Sofou et al., 2014).

Por otro lado, la expresión condicional de la deficiencia de *Ndufs4* bajo el promotor *Nestin*, expresado en las células precursoras neuronales y gliales, dio lugar a un ratón con afectación del complejo I únicamente en el SNC (ratón NesKO, Quintana et al., 2010). Este ratón puso de manifiesto que prácticamente todos los signos clínicos observados en el ratón *Ndufs4*KO tienen un origen neurológico. Particularmente, y en gran consonancia con los pacientes con el SL, ambos ratones desarrollan lesiones necróticas bilaterales con vacuolización espongiiforme especialmente en el tronco encefálico (núcleo vestibular, núcleo olivar inferior), bulbo olfatorio y cerebelo (vermis caudal y núcleo fastigial) y, con menor relevancia, en los ganglios basales a partir de P38 y en el hipocampo (Figura 8). Estas lesiones van acompañadas de una gliosis creciente, de acuerdo con la progresión de la enfermedad. Además, especialmente en el núcleo vestibular y la parte posterior del cerebelo, se ha observado un incremento de la vascularización, aunque sin leucoencefalopatía aparente (Quintana et al., 2010; Quintana et al., 2012).

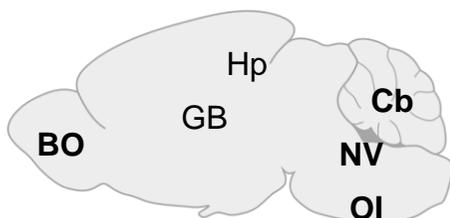


Figura 8. Localización esquemática de las principales lesiones neurológicas observadas en el ratón *Ndufs4*KO. Se representan en negrita aquellas más significativas. BO: bulbo olfatorio, GB: ganglios basales, Hp: hipocampo, Cb: cerebelo, NV: núcleo vestibular, OI: núcleo olivar inferior.

A nivel molecular, el ratón *Ndufs4*KO presenta la mitad de actividad para el complejo I respecto los controles, mientras que, dependiendo del ensayo utilizado, se mantiene o incrementa ligeramente la actividad de los complejos II-V. No obstante, cabe destacar que estas diferencias en el metabolismo energético son dependientes del tejido analizado, ya que, a nivel de músculo esquelético, por ejemplo, los niveles de ATP no difieren significativamente de los ratones control

(Kruse et al., 2008). Igualmente, diferencias técnicas podrían ser la causa de las diferencias observadas. En cualquier caso, la actividad residual del complejo I se ha atribuido a que, aunque el ensamblaje individual del complejo I está impedido por la falta de la subunidad NDUFS4 (Assouline et al., 2012), la formación de los supercomplejos mitocondriales, como por ejemplo la unión entre el pre-complejo I-III, podría aportar la estabilidad perdida en casos de deficiencia de NDUFS4 (Calvaruso et al., 2012).

Por otra parte, en las áreas con mayor lesión neuropatológica se detectó un incremento de la caspasa-8, perteneciente a la vía extrínseca de la apoptosis, probablemente mediada por la liberación de citoquinas derivadas de la gliosis. No obstante, no se detectaron incrementos en la caspasa-9 de la vía intrínseca de la apoptosis dependiente de ATP (Quintana et al., 2010). Adicionalmente, se detectó también un incremento de la succinación proteica de los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC1 y VDAC2) a etapas asintomáticas (P21) (Piroli et al., 2016). En condiciones normales, estos canales trafican iones, ATP, ADP y otros metabolitos mitocondriales a través de la membrana externa mitocondrial regulando una gran cantidad de señales metabólicas y celulares (Rostovtseva et al., 2020). De este modo, trafican Ca^{2+} modulando la vía extrínseca de la apoptosis (Rizzuto et al., 2012). Aunque se desconocen las vías moleculares que subyacen a la evasión de la apoptosis y la deriva a procesos necróticos en los animales *Ndufs4KO*, estos datos podrían señalar que la deficiencia mitocondrial del complejo I produciría una insuficiencia energética a nivel de ATP para llevar a cabo la apoptosis, traduciéndose en un incremento de la necrosis neuronal y/o de los circuitos asociados. Por otro lado, la succinación anómala de los canales VDAC1 y VDAC2, debida a una acumulación del fumarato por saturación del ciclo de Krebs, podrían también impedir el flujo de iones y ATP durante la apoptosis.

Finalmente, cabe mencionar que el análisis metabolómico del cerebro de los ratones *Ndufs4KO* reveló niveles elevados de piruvato, lactato y de varios

intermediarios de la glucólisis (Johnson et al., 2013), reflejando un posible incremento de la actividad glucolítica en compensación a la posible falta de producción de ATP asociada a la fosforilación oxidativa. En extensión, el lactato en altas concentraciones puede derivar en acidosis láctica, produciendo toxicidad celular (Goldman et al., 1989). No obstante, al contrario que en humanos con el SL, en los ratones *Ndufs4KO* los niveles de lactato no parecen ser lo suficientemente elevados para ser tóxicos (Kruse et al., 2008).

4.7. Mecanismos moleculares subyacentes a la progresión patológica del SL

Gracias a la investigación del SL se han descubierto algunos mecanismos subyacentes al transcurso de la enfermedad. Aunque aún se desconoce si son alteraciones primarias o secundarias a la deficiencia mitocondrial, han permitido la identificación de diversas dianas moleculares con posible interés terapéutico.

4.7.1. Estrés oxidativo, neuroinflamación y regulación del oxígeno

En condiciones fisiológicas, entre el 0,2-2% de los electrones transferidos durante la fosforilación oxidativa no finalizan en la reducción del oxígeno, produciendo de manera basal especies reactivas de oxígeno (ROS). Específicamente, los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones son las principales fuentes de ROS en el organelo (Zhao et al., 2019b). Con el fin de mantener la homeostasis celular, existen enzimas antioxidantes que modulan la señalización celular de ROS y evitan su toxicidad por acumulación, tales como la familia de las superóxido dismutasas (Wang et al., 2018), la catalasa o la glutatión peroxidasa (Ighodaro and Akinloye, 2018). No obstante, en casos de privación mitocondrial o envejecimiento celular, los niveles de ROS superan la capacidad de los antioxidantes, induciendo estrés oxidativo que puede derivar en la oxidación de lípidos, ADN, ARN y proteínas (Cadenas and Davies, 2000; Hayashi and Cortopassi, 2015).

En consonancia, en fibroblastos de pacientes con SL, especialmente con deficiencia del complejo I, se puede observar un incremento de los niveles de ROS (Verkaart et al., 2007; Koopman et al., 2008) y una disminución de las defensas antioxidantes (Karkucinska-Wieckowska et al., 2011). Asimismo, los niveles de estrés oxidativo en sangre de pacientes con SL, analizados a través de los niveles de glutatión, demostraron también un desbalance en esta vía (Enns et al., 2014). Este mismo análisis se aplicó a muestras de pacientes con EM_p, señalando que el estrés oxidativo es más acusado en los casos más críticos. No obstante, en otro estudio realizado en cultivos primarios de neuronas y de astrocitos y en fibroblastos derivados de embrión de ratones *Ndufs4*^{flky/flky}, se pudo observar que mientras en fibroblastos se producía una disminución de la síntesis de ATP, del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de ROS, en neuronas y astrocitos solo se observó una disminución de la síntesis de ATP, exponiendo diferencias significativas en la producción de ROS según el tipo celular estudiado, pese a presentar la misma disfunción mitocondrial (Bird et al., 2014). Estas diferencias también dependen del tipo de mutación, de esta manera, los ratones deficientes para *Surf1* muestran niveles inalterados de ROS en músculo esquelético y corazón. No obstante, cabe recordar, que estos animales presentan una esperanza de vida superior a los controles, acompañada de una activación de la vía de respuesta a proteínas desplegadas mitocondriales o UPR_{mt} (*Mitochondrial unfolded protein response*) en músculo esquelético y una inducción del factor de transcripción antioxidante neuroprotector *Nrf2* en corazón, señalando posibles vías protectoras a la disminución del complejo IV, indirecta o directamente conjuntas a los niveles de ROS (Pulliam et al., 2014).

Por otro lado, una de las vías moleculares que se ha relacionado directamente con un incremento del estrés oxidativo es la activación de la peroxidación lipídica. El incremento excesivo de ROS puede conducir a una sobreexpresión continuada de c-JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), que puede activar otros factores, los cuales estimularían a SREBP (*Sterol regulatory element-binding protein*), el cual sería el activador directo de la vía de peroxidación de lípidos (Liu et al.,

Introducción

2015). La activación de la cascada ROS/c-JNK/SREBP iniciada por disfunción mitocondrial se ha podido confirmar en varios modelos de *Drosophila melanogaster* con deficiencia mitocondrial. Estas moscas presentan un acúmulo de gotas lipídicas en la astrogliá a edad temprana (Liu et al., 2015). Asimismo, en fibroblastos de pacientes con SL, se ha hipotetizado que la quinasa JNK podría intervenir en la fosforilación de p66shc, proteína involucrada en la acumulación de ROS, promoviendo un bucle negativo de estrés oxidativo (Wojtala et al., 2017). Por otro lado, siguiendo en la línea con la peroxidación lipídica, los ratones Ndufs4KO a edades asintomáticas muestran también un acúmulo de gotas lipídicas, especialmente en la glía del bulbo olfatorio (BO) y del núcleo vestibular (NV) del tronco encefálico, áreas con prominente reactividad glial. Cabe destacar que a medida que la gliosis aumenta en estos ratones, este acúmulo lipídico disminuye, desapareciendo completamente en el NV. Además, mientras la vía ROS/c-JNK/SREBP se produce a nivel neuronal, el acúmulo lipídico se detecta a nivel de la astrogliá. Para ello, los astrocitos aportan lactato como soporte a la lipogénesis, que promueve la síntesis de gotas lipídicas en la neurona que, posteriormente, serán trasladadas al astrocito (Liu et al., 2015; Liu et al., 2017a).

Es importante tener en cuenta que los astrocitos juegan un papel clave en la regulación del estrés oxidativo en el SNC. Por un lado, en condiciones fisiológicas producen antioxidantes y activan mecanismos endógenos neuroprotectores (*Nrf2*), sosteniendo la función neuronal. Sin embargo, en caso de disfunción mitocondrial o daño neuronal, se activa la respuesta proinflamatoria (Chen et al., 2020). Igualmente, la microglía, principal defensa inmune del SNC, se activa en respuesta a una descompensación de la homeostasis celular, como sería un incremento excesivo de los niveles de estrés oxidativo (Rojo et al., 2014). Estas respuestas se caracterizan principalmente por desencadenar una cascada de citocinas que promueven la inflamación en el SNC, también llamada neuroinflamación, con la finalidad de recuperar la homeostasis celular. Sin embargo, la cronificación neuropatológica impide la reparación del sistema, provocando una neuroinflamación crónica, así como la liberación de ROS por

parte de las células gliales. Esto desencadenaría un bucle negativo de producción de estrés oxidativo, entre otras respuestas, derivando en neurodegeneración. De esta manera, el estrés oxidativo y la neuroinflamación serían los principales procesos metabólicos implicados en la neurodegeneración (Singh et al., 2011; Fischer and Maier, 2015; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018) (Figura 9). Estos procesos (neuroinflamación y estrés oxidativo), en los cuales contribuyen, además de astrocitos y microglía, otras células del parénquima nervioso tales como los oligodendrocitos, los macrófagos, las células dendríticas o los leucocitos periféricos (Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018), se ven usualmente implicados en la neurodegeneración de enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer (Di Filippo et al., 2010). Por tanto, es crítico elucidar los mecanismos moleculares subyacentes al estrés oxidativo mitocondrial para entender los procesos neurodegenerativos.

Con el fin de controlar dicho estrés oxidativo, se han administrado distintos agentes antioxidantes a pacientes con SL. Aunque por lo general, estos fármacos no han demostrado tener un beneficio significativo en el avance de la patología, algunos mejoran ligeramente el estado físico y cognitivo de estos pacientes, como el EPI-743 (Blankenberg et al., 2012; Kouga et al., 2018). No obstante, los mecanismos moleculares que gobiernan esta mejoría son aún desconocidos. Por otro lado, la administración del antioxidante AD4 (N-acetilcisteína amida o NACA), es capaz de incrementar los niveles de glutatión reducido y de revertir la peroxidación lipídica (Schimel et al., 2011) en ratones jóvenes *Ndufs4KO*, retrasando así el declive neurológico y motor (Liu et al., 2015). Así pues, el control de la peroxidación lipídica podría ayudar a controlar la progresión del SL. Asimismo, el antioxidante KH176 también es capaz de regular la peroxidación de lípidos, demostrando igualmente tener efectos positivos en el ratón *Ndufs4KO* (De Haas et al., 2017). Por tanto, el control de los efectos secundarios al estrés oxidativo podría ser beneficioso para ralentizar el progreso patológico en el SL.

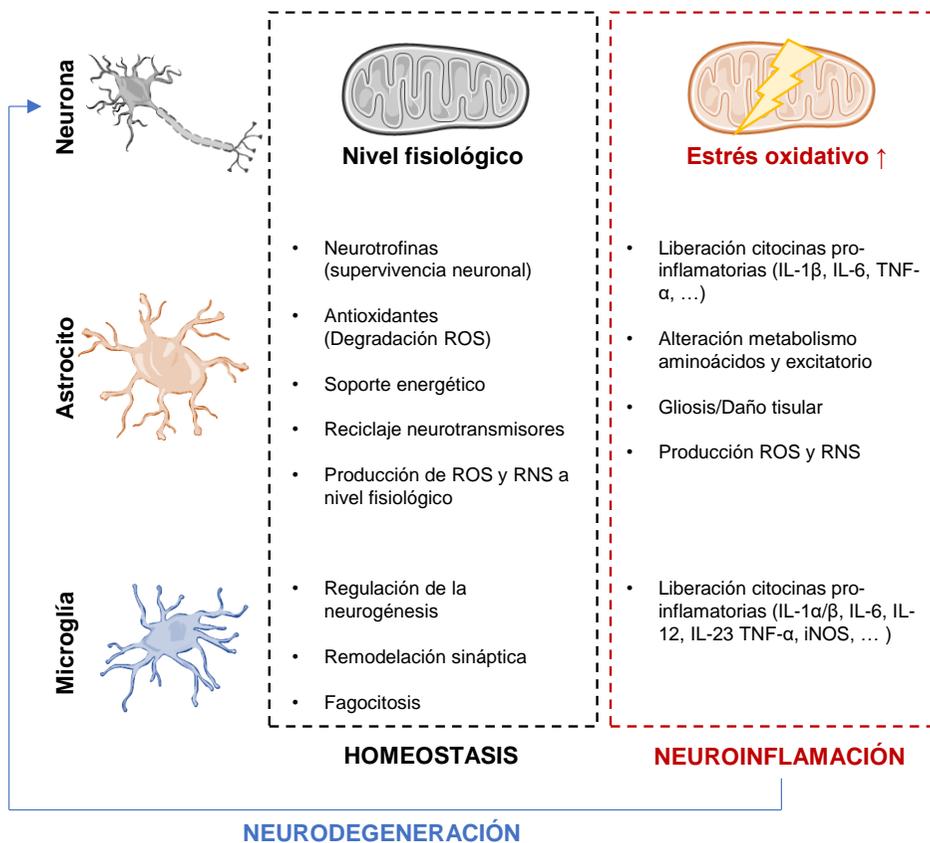


Figura 9. Impacto del estrés oxidativo en la neuroinflamación. La cronificación del estrés oxidativo debido a la deficiencia mitocondrial activa una cascada de citocinas proinflamatorias en astrocitos y microglía, promoviendo una gliosis aguda que acaba traducéndose en un proceso neurodegenerativo. Por el contrario, niveles fisiológicos mantienen el papel de soporte neuronal de los astrocitos y de defensa de la homeostasis de la microglía. RNS: *Reactive Nitrogen Species*, IL: Interleucina, TNF: *Tumor Necrosis Factor*, iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase (Salvi et al., 2017; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018; Chen et al., 2020).

Por otro lado, la comparativa de los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una de las especies reactivas del oxígeno, demostró niveles similares en mitocondrias del SNC de Ndufs4KO y controles. En este sentido, se ha postulado que sería la acumulación del oxígeno, y no la de ROS, la responsable de un efecto nocivo en el SL. Niveles anómalos de oxígeno pueden derivar en la oxidación, por ejemplo, de biomoléculas con grupos hemo, como la de los complejos de la cadena de transporte de electrones (Kayser et al., 2016; Ast et al., 2019; Jain et al., 2019). Dirigiendo la atención al uso del oxígeno en caso de deficiencia mitocondrial, se

ha observado que el aislamiento del ratón *Ndufs4KO* en un ambiente hipóxico crónico (11% O₂) es capaz de extender notablemente la supervivencia media del animal (~P270), desde un estadio temprano como tardío de la enfermedad. Además, permite regularizar la temperatura, peso corporal, coordinación y actividad motora media. Notablemente, la hipoxia reduce o bloquea las lesiones neuropatológicas observadas por RM, así como la reactividad de la microglía. En consonancia, el uso de CO (monóxido de carbono) o la inducción de una anemia severa, que disminuyen los niveles circulantes de oxígeno, tienen, de igual modo, un efecto positivo en la supervivencia del ratón *Ndufs4KO* (Jain et al., 2016; Ferrari et al., 2017; Jain et al., 2019). Igualmente, la inducción de un ambiente hipóxico en el ratón con disrupción del gen *Sdhc* del complejo II, también produce una extensión de la vida de estos animales (Khazal et al., 2019), señalando una potencial vía terapéutica para el SL. Acorde con esta teoría, un ambiente hiperóxico (55% O₂) en el ratón *Ndufs4KO* es directamente letal (Jain et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Sin embargo, el estudio de la función respiratoria en hipoxia en cortes del tronco encefálico de ratones con deficiencia para *Surf1* indicaría un efecto nocivo. Esta hipoxia derivaría en una disminución de la frecuencia respiratoria revelando posibles anomalías en la respuesta de los quimiorreceptores debida a la menor actividad del complejo IV (Stettner et al., 2011). Estos datos indicarían que el posible uso de la hipoxia como tratamiento para la disfunción mitocondrial dependería de la mutación y del modelo empleado.

A nivel molecular, la interrupción del metabolismo mitocondrial provoca un menor uso del oxígeno celular. Paradójicamente, a pesar de la disponibilidad del oxígeno, el desuso de este se interpretaría como una falta de oxígeno *per se*, activando la vía de hipoxia vHL/PHD/HIF (*von Hippel-Lindau/Prolyl hydroxylase/Hypoxia-inducible factor*), que regulariza el consumo metabólico celular acorde con los niveles de oxígeno celulares (Simon, 2016). En este sentido, se ha hipotetizado que en el ratón *Ndufs4KO* la vía de hipoxia se activaría en un estado de normoxia (21% O₂), produciendo un desequilibrio entre el

Introducción

ambiente y el contexto celular (Jain et al., 2016). En consonancia, fibroblastos de pacientes con la variante canadiense del SL presentan un incremento proteico del factor HIF1- α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) (Mukaneza et al., 2019). Asimismo, neuronas de *Drosophila melanogaster* con disfunción del complejo IV muestran un incremento del ortólogo para HIF1- α , *Sima* (Cagin et al., 2015). Curiosamente, la inactivación de *Sima* produce una mejora de la función neuronal, aun manteniendo la deficiencia mitocondrial. Por otro lado, la activación genética de la vía vHL-PHD-HIF en ratones Ndufs4KO no es suficiente para revertir el fenotipo patológico (Jain et al., 2019), sugiriendo que más que la regulación de HIF1- α sería la regulación de los niveles de oxígeno lo que produciría un beneficio en la progresión patológica. Por otro lado, otros procesos moleculares activados por la hipoxia podrían tener un efecto regenerativo, por ejemplo, a nivel axonal (Cho et al., 2015). En cualquier caso, el estrés oxidativo, conjunto a la neuroinflamación y la regulación de los niveles de oxígeno, intervendrían en el proceso patológico del SL, siendo un mecanismo común en distintas enfermedades mitocondriales.

4.7.2. Metabolismo de nutrientes

La vía de señalización de nutrientes mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) posee un efecto pleiotrópico a nivel metabólico regulando la proliferación y supervivencia celular, a través de los complejos mTORC1 y mTORC2. Entre otras funciones activa la síntesis proteica (traducción del ARN mensajero o ARNm y biogénesis ribosomal) y de lípidos (colesterol, etc.) e inhibe procesos como la autofagia o la apoptosis (Laplante and Sabatini, 2009). Asimismo, mTOR se ha visto directamente relacionado con la activación del metabolismo y de la biogénesis mitocondrial.

La síntesis proteica es uno de los procesos con más consumo energético a nivel celular (Buttgereit and Brandt, 1995; Rangaraju et al., 2019). En consonancia, no es raro que sea este mismo proceso el que regule la síntesis de ATP a varios

niveles. Por un lado, el metabolismo bioenergético oxidativo depende de proteínas codificadas en el genoma nuclear y el genoma mitocondrial (Priesnitz and Becker, 2018). En este sentido, en el citoplasma la vía PI3K/AKT/mTORC1 (*Phosphoinositide 3-kinases/Protein kinase B/Mammalian target of rapamycin complex 1*) produce la fosforilación de 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*) y S6K (*Ribosomal protein S6 kinase*) (Mamane et al., 2006), induciendo el inicio de la traducción de las proteínas mitocondriales, entre otras. Así, *in vitro* se ha demostrado que la inhibición de la vía de mTOR a través de diversos inhibidores suprime la traducción de ARNm relacionados con proteínas mitocondriales (Larsson et al., 2012). Asimismo, la inhibición de la proteína 4E-BP, a través de la activación de mTORC1, promueve la traducción específica de subunidades proteicas de la ATP sintetasa y TFAM (*Mitochondrial transcription factor A*, implicado en la replicación y transcripción del ADNmt) (Morita et al., 2013), controlando de manera directa el metabolismo y la biogénesis mitocondrial. Adicionalmente, una vez sintetizadas dichas proteínas, se ha sugerido que mTORC1 podría regular las secuencias diana a mitocondria, promoviendo su traslado al organelo (Lopez et al., 2019).

Por otro lado, el control de mTOR del metabolismo mitocondrial no sucede únicamente a nivel traduccional. De este modo, la inhibición de mTOR en cultivo de células leucémicas provoca una supresión directa de la fosforilación oxidativa, promoviendo la glucólisis. En este caso, se ha hipotetizado que la unión de mTORC1 con Bcl-xl (*B-cell lymphoma-extra large*) y VDAC1 en la membrana externa mitocondrial podría regular el metabolismo energético (Ramanathan and Schreiber, 2009). Asimismo, mTOR también se ha relacionado como un potenciador de la dinámica mitocondrial, a través del axis mTORC1/4E-BP/MTFP1/DRP1 (MTFP1: *Mitochondrial fission process protein 1*; DRP1: *Dynammin-1-like protein*) (Morita et al., 2017). Finalmente, la implicación de mTORC1 en la regulación mitocondrial también se ha relacionado a nivel transcripcional. Así, el factor transcripcional YY1, activado por la unión de los

Introducción

complejos mTORC1 junto con PGC1- α , promovería la transcripción nuclear de genes con función mitocondrial (Cunningham et al., 2007).

Con el fin de regular todos estos procesos, la vía de mTOR integra señales de factores de crecimiento, niveles de oxígeno, de aminoácidos, de ATP y de ADP para regular las necesidades metabólicas de cada momento (Laplante and Sabatini, 2009). En este sentido, niveles altos del ratio ADP/ATP pueden activar la vía de AMPK (*AMP-activated protein kinase*), que inhibe mTOR a través del complejo TSC1/TSC2 (*Tuberous sclerosis 1/2*). Al mismo tiempo, la activación de mTOR inhibe la actividad de AMPK, equilibrando así el metabolismo celular (Ling et al., 2020).

En relación con estos datos, la vía de mTOR se ha visto alterada en casos de deficiencia mitocondrial. Así, en fibroblastos de pacientes con la variante francesa del SL se ha podido observar un incremento de la actividad de mTOR (Mukaneza et al., 2019). Asimismo, en neuronas dopaminérgicas con deficiencia mitocondrial se demostró la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR a nivel transcriptómico (Elstner et al., 2011). Por otro lado, un estudio transcripcional realizado en cultivos primarios de fibroblastos y músculo esquelético derivados de pacientes con deficiencia mitocondrial demostró la implicación de esta vía, curiosamente, con efectos opuestos a nivel transcripcional y traduccional. En músculo, se observa una reducción de la transcripción de genes relacionados con la biogénesis ribosomal citosólica, un incremento de los relacionados con la biogénesis ribosomal mitocondrial, un acortamiento de los extremos no codificantes 5'-UTR, aumentando la eficiencia traduccional, y una mayor estabilización de los 3'-UTR ricos en adeninas y uracilos. Por el contrario, un efecto inverso se detectó en los fibroblastos, exponiendo la diversidad del impacto de la deficiencia mitocondrial según el tejido analizado (Zhang et al., 2013).

Notablemente, la inhibición de mTOR con rapamicina en (1) ratones con deficiencia para *Pdss2*, necesario para la síntesis de la coenzima Q₁₀, (2) *C.*

elegans deficientes para el homólogo de *NDUFS2* del complejo I y (3) cultivos celulares de podocitos renales deficientes para el complejo I, demuestra una extensión, aunque modesta, de la esperanza de vida de los animales y una mejora parcial de la deficiencia mitocondrial por inhibición de la autofagia. Asimismo, el tratamiento con el fármaco anti-lipídico probucol que activa PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*), promoviendo AMPK e inhibiendo parcialmente mTOR, muestra un efecto beneficioso en el tratamiento de la deficiencia mitocondrial en estos tres modelos. Notablemente, el tratamiento de estos modelos con cicloheximida, inhibidor parcial de la traducción citosólica, o con cloruro de litio, que inhibe la autofagia, se traduce en un incremento significativo de la biogénesis, traducción y metabolismo mitocondrial en ambas condiciones. Finalmente, el análisis por secuenciación masiva del transcriptoma de los cambios generados por los tratamientos en el modelo de *C. elegans*, demuestra que la inhibición de mTOR o de las vías subsiguientes a su activación, es capaz de normalizar los niveles de ARN relacionados con la traducción y la autofagia respecto a los controles. En conjunto, estos resultados señalan el potencial de la inhibición de la vía de mTOR en el tratamiento de la disfunción mitocondrial (Peng et al., 2015).

En consonancia, a pesar de que los niveles de AMPK no parecen alterados en el ratón *Ndufs4KO* (Quintana et al., 2010), sí que presentan un incremento significativo en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (RPS6), lo que se corresponde con una reducción de los niveles de aminoácidos, ácidos grasos libres y nucleótidos en este modelo, reflejando una activación del anabolismo celular (Johnson et al., 2013). Notablemente, la inhibición de la vía de señalización de mTOR en ratones *Ndufs4KO*, mediante administración intraperitoneal (8 mg/kg/día) o por dieta (42-378 partes por millón) de rapamicina, se traduce en una extensión de la esperanza de vida media (~P120). La rapamicina, además, es capaz de producir un retraso/bloqueo de la aparición de las lesiones cerebrales en NV, BO y cerebelo y una demora del detrimento

Introducción

motor, especialmente si se administra a edades muy tempranas (P10) (Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2015).

En este sentido, la investigación del beneficio de la rapamicina ha expuesto diferentes vías moleculares. Este fármaco es conocido, entre otras cosas, por su efecto inmunosupresor. Sin embargo, la administración de tacrolimus, un inmunosupresor con la misma diana que la rapamicina (FKBP12) pero que actúa por la vía de la calcineurina en vez de mTOR (Tamura et al., 1994), descartó el posible efecto de la rapamicina a nivel inmunológico. Como posible explicación del mecanismo, se sugirió que el efecto positivo de la rapamicina se debía quizás al cambio hacia un metabolismo catabólico de aminoácidos y ácidos grasos juntamente con una bajada en la acumulación citotóxica de los metabolitos intermediarios de la glucólisis. Alternativamente, también se propuso un incremento de la autofagia, consecuente a la inhibición de mTOR, como posible beneficio. No obstante, su efecto a nivel de la progresión patológica mitocondrial queda aún sin resolver en este modelo (Johnson et al., 2013).

Otra posible explicación para el beneficio del tratamiento con rapamicina podría simplemente implicar una reducción de la demanda energética asociada a la síntesis proteica inducida por mTOR, además de una menor proliferación celular, en concordancia con el menor peso corporal de los animales tratados con rapamicina, rebajando el impacto de la deficiencia mitocondrial en estos ratones (Johnson et al., 2013). En línea con esta interpretación, la administración de rapamicina *in vitro* produce un incremento de ATP en cultivo de células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes con SL, sugiriendo un bloqueo de actividades de alta demanda energética (Zheng et al., 2016). Asimismo, recientemente se ha evidenciado que la inactivación genética de la quinasa S6K1 en ratones con deficiencia de *Ndufs4* a nivel constitutivo también se traduce en un incremento de la supervivencia y un retraso de la aparición de los signos clínicos, si bien de forma más moderada que en el caso de administración de rapamicina (Ito et al., 2017). Por tanto, estos datos reforzarían la teoría de que

uno de los posibles beneficios de la administración de rapamicina sería la inhibición de los procesos asociados a la traducción en la vía de mTOR. Sorprendentemente, la inactivación de la quinasa S6K1 restringida en adipocitos o en neuronas no tiene ningún beneficio, mientras que su inactivación a nivel hepático promueve un retraso en la progresión de la patología, incluso a nivel cerebral. Aunque no se puede descartar que el beneficio de la rapamicina en el SNC esté mediado por tipos celulares no-neuronales, parece sorprendente que la inhibición de la quinasa S6K1 a nivel neuronal no tuviera ningún efecto, teniendo en cuenta la relevancia de la neuropatología en el SL. Por otro lado, estos datos resaltaron la importancia de tejidos periféricos, como el hígado, en el transcurso patológico (Ito et al., 2017).

En conclusión, la vía de mTOR, pese a tener efectos dispares en la progresión de la enfermedad mitocondrial, probablemente sujetos a las diferencias de expresión génica de cada tipo celular, es un candidato excelente para investigar en el contexto de la patología mitocondrial, tanto a nivel transcripcional como traduccional. Lamentablemente, su inhibición por rapamicina produce diversos efectos secundarios tales como hiperglicemia, hiperlipidemia e inmunosupresión, que limitan su uso en humanos (Johnson et al., 2015; Apelo and Lamming, 2016). Por otra parte, estudios de eficacia con algunos análogos aprobados no han dado resultados especialmente positivos en pacientes con EM_P (Sage-Schwaede et al., 2019) o en un modelo murino con deficiencia de la coenzima Q₁₀ (Barriocanal-Casado et al., 2019), indicando que el bloqueo de mTOR no tiene siempre un beneficio terapéutico generalizado en EM_P.

4.8. Contribución de diferentes tipos celulares en la neuropatología del SL

Los pacientes con SL, usualmente pediátricos, suelen presentar una marcada restricción anatómica de las lesiones neuropatológicas. En este sentido, el gasto energético total del cerebro en reposo en niños es muy superior que en adultos,

Introducción

traduciéndose en una mayor susceptibilidad a la disfunción mitocondrial (Leonard et al., 2003; Kuzawa et al., 2014). No obstante, aunque los ganglios basales y el tronco encefálico son regiones con una alta demanda energética a edades tempranas, no difieren significativamente de otras regiones, como el córtex cerebral (Chugani et al., 1987). Así pues, la falta de energía no explicaría, en este caso, porque existen regiones neuroanatómicas más sensibles en el SL. En este sentido, la disrupción del ADNmt restringida en el hipocampo, corteza y cuerpo estriado (Pickrell et al., 2011) o la delección inducida de FOXRED1 (Salama et al., 2019), relacionado con el ensamblaje del complejo I, han señalado la especial susceptibilidad del cuerpo estriado a la deficiencia mitocondrial. De este modo, se ha propuesto que las neuronas del cuerpo estriado sostienen un elevado potencial de membrana mitocondrial para mantener altos niveles de Ca^{2+} que, en caso de deficiencia mitocondrial, se liberarían promoviendo la muerte celular (Pickrell et al., 2011). Por tanto, la susceptibilidad neuroanatómica podría explicarse por otros procesos moleculares subyacentes a la actividad mitocondrial y específicos de tipo celular.

En este contexto, la delección condicional del gen *Ndufs4* en tipos celulares definidos genéticamente en ratón ha permitido diseccionar la contribución de diferentes tipos neuronales a la patología mitocondrial. Así, la deficiencia mitocondrial del complejo I en las neuronas dopaminérgicas (*Slc6a3*) o colinérgicas (*Chat*) no provoca anomalías patológicas (Choi et al., 2008; Kim et al., 2015; Bolea et al., 2019). Por el contrario, la misma deficiencia en las neuronas GABAérgicas (*Gad2*) resulta en una neuroinflamación prominente de los ganglios basales y del BO acompañada de la aparición de ataques epilépticos severos o fatales (Bolea et al., 2019). No obstante, la delección de *Ndufs4* de manera específica en las neuronas glutamatérgicas (*Slc17a6*) induce una importante reactividad glial en el núcleo fastigial (cerebelo), en el NV y en el núcleo olivar inferior (tronco encefálico) acompañada de una deficiencia motora y respiratoria graves (Bolea et al., 2019). Paralelamente, la delección condicional del complejo I en las neuronas espinosas medias del estriado (*Gpr88*) supone un

declive motor moderado sin neurodegeneración aparente, sugiriendo que también existen poblaciones neuronales afectadas sin neuroinflamación o muerte neuronal (Chen et al., 2017). Asimismo, la delección de *Ndufs4* en las neuronas de Purkinje (*Pcp2*) deriva en una progresión patológica suave que termina en muerte neuronal (Quintana et al., 2010).

Complicando aún más el escenario, las mitocondrias de los sinaptosomas del NV, BO y cerebelo en ratones *Ndufs4*KO tienen una capacidad respiratoria significativamente menor que las de los sinaptosomas de las regiones sin neuroinflamación y, mucho menor comparativamente con ratones control. Así pues, en concordancia a las distintas especializaciones de este orgánulo en el SNC, además del tipo celular, la sublocalización celular de las distintas mitocondrias pueden contribuir diferencialmente a la progresión patológica del SL (Kayser et al., 2016).

Por otro lado, no debemos olvidar la contribución de las células gliales en la progresión patológica del SL, especialmente de los astrocitos. Así, la deficiencia del ND75 (homólogo de *NDUFS1* humano, complejo I) restringida en la glía en *Drosophila melanogaster* se traduce en pérdida neuronal con vacuolización del neuropilo. Además, dentro de los casos más severos, la pérdida del ADNmt en astrocitos de ratón deriva rápidamente en una encefalopatía esponjiforme fatal (Hegde et al., 2014; Ignatenko et al., 2018). Estos resultados resaltarían el papel de la astrogliá en el progreso patológico en caso de disfunción mitocondrial. Sin embargo, la inactivación de *Ndufs4* en astrocitos no da lugar a neurodegeneración (Ramadasan-Nair et al., 2019). De la misma manera, la reexpresión de *Ndufs4* por terapia génica principalmente a nivel de glía es insuficiente para promover una mejora clínica en ratones *Ndufs4*KO (Meo et al., 2017), siendo necesaria también el rescate en neuronas para obtener resultados beneficiosos (Silva-Pinheiro et al., 2020). Por otra parte, la disfunción mitocondrial exclusivamente en las neuronas por si sola, tanto en *Drosophila melanogaster* como en ratón, es suficiente para derivar en complicaciones

Introducción

motoras y la muerte (Hegde et al., 2014; Ignatenko et al., 2018). Estos resultados, por tanto, ponen de manifiesto la complejidad y la elevada heterogeneidad celular de la neuropatología causada por mutaciones mitocondriales.

Por otro lado, es importante tener en cuenta la interacción celular del SNC en la contribución patológica. En este sentido, la reducción de la gliosis en el ratón *Ndufs4*KO se encuentra acompañada por una ralentización de la aparición de las lesiones cerebrales, extendiendo significativamente la esperanza de vida del animal (Johnson et al., 2013; Jain et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Por tanto, la glía podría desarrollar un papel fundamental en la misma neurodegeneración. En este sentido, la gliosis puede promover la muerte neuronal en ciertas poblaciones, como las células ganglionares de la retina (Yu et al., 2015). Asimismo, la delección de una de las subunidades de la proteasa m-AAA que modula la homeostasis mitocondrial restringida en los astrocitos (*Gfap*) de ratón, aunque no produce una menor actividad oxidativa, deriva con el tiempo en una disfunción motora y reactividad de la glía de Bergmann (astrocitos del cerebelo que conectan con las neuronas de Purkinje), acompañada además de disfunción del transporte de glutamato y una degeneración de las células de Purkinje (Murrú et al., 2019). En conjunto, estos estudios demuestran que debido a la relación estrecha intercelular entre neurona-glía, la gliosis juega un papel dicotómico en la neurodegeneración causada por la disfunción mitocondrial, como causa y/o consecuencia.

Por último, cabe mencionar también el papel que diferentes tipos celulares a nivel periférico puedan tener en el desarrollo de la patología. En este sentido, se ha demostrado que la reexpresión de *Ndufs4* por administración del vector viral adenoasociado AAV-2/9-*hNdufs4*, conjuntamente en el SNC (principalmente restringida en la glía) y los órganos periféricos en ratones *Ndufs4*KO, produce una mejora de los signos neurológicos y una extensión de la supervivencia de estos animales, en comparación con la reexpresión restringida principalmente en la glía (Meo et al., 2017). En la misma línea, la administración intravenosa de

dos vectores virales codificantes para *Ndufs4*, capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, y con un elevado grado de transducción a nivel periférico, han demostrado la recuperación parcial de la actividad del complejo I en diferentes órganos, incluido el SNC, retrasando el progreso patológico y extendiendo la esperanza de vida de los ratones *Ndufs4*KO (Silva-Pinheiro et al., 2020; Reynaud-Dulaurier et al., 2020). Esto pondría de manifiesto que otros tejidos periféricos pueden intervenir de igual modo en la progresión del SL. En este sentido, la delección condicional de *Ndufs4* en el corazón en ratones resulta en problemas cardíacos de aparición tardía (>P360) (Sterky et al., 2012; Karamanlidis et al., 2013). Aunque la cardiomiopatía en pacientes con SL es un signo clínico poco frecuente, no se puede descartar su participación ni la de otros componentes no neuronales en la progresión del SL, incluso a pesar de que no tengan una aparición temprana, ya que el diseño terapéutico en cualquier enfermedad debe debería tener como objetivo tratar la patología en su totalidad.

En resumen, la restricción neuroanatómica de las lesiones cerebrales en el SL podría explicarse por la heterogeneidad del perfil de expresión génica de las distintas subpoblaciones celulares en el SNC, que derivan en un mayor o menor grado de susceptibilidad a la disfunción mitocondrial, de acuerdo con el nivel de demanda energética y la especialización multifuncional de la mitocondria en cada tipo celular (DiMauro and Schon, 2008; Dubinsky, 2009; DiMauro et al., 2013). A pesar de las dificultades que imponen la heterogeneidad del SNC en términos de composición celular, especialización funcional a nivel regional y las diferencias bioquímicas para el análisis de las bases moleculares que gobiernan la disfunción bioenergética, es crucial caracterizar cada grupo celular de manera individual y a nivel de circuito para poder entender la progresión de la patología, sin olvidar, que es el conjunto de la red celular el que lidera el fenotipo patológico final.

4.9. Caracterización de las alteraciones neuroquímicas y sinápticas en los ratones *Ndufs4*KO

El fallo respiratorio de los pacientes con SL, descrito como la primera causa de muerte en esta patología, se suele atribuir a las lesiones observadas en el tronco encefálico (Arii and Tanabe, 2000). Esta estructura contiene redes neuronales o generadores centrales de patrones que producen salidas con respuestas motoras rítmicas. Específicamente, el tronco encefálico controla la frecuencia respiratoria modulándola según las necesidades fisiológicas de cada momento (Smith et al., 2013). Notablemente, la inactivación de *Ndufs4* únicamente en el NV del tronco encefálico de ratones sanos deriva en las anomalías respiratorias observadas en el modelo *Ndufs4*KO. De la misma manera, la reexpresión de *Ndufs4* únicamente en el NV del ratón *Ndufs4*KO es suficiente para corregir los problemas respiratorios y prolongar su supervivencia significativamente (Quintana et al., 2012b), señalando que el NV dentro del tronco encefálico tendría un papel fundamental en el desarrollo de los problemas respiratorios observados. En este sentido, a nivel fisiológico, las neuronas del NV medial e inferior integran señales externas relativas a la posición corporal a través del sistema vestibular, somatosensorial, visceral y visual con el fin de regular la función respiratoria y cardiovascular (Yates and Bronstein, 2005). Para ello, el NV se conecta con varios núcleos respiratorios, como el núcleo fastigial del cerebelo (Hernandez et al., 2004), regulando la función autonómica final. Así pues, no se debe descartar que defectos en el NV impacten en este circuito, agravando las anomalías respiratorias (Quintana et al., 2012; Bolea et al., 2019).

Recientemente, la caracterización de un ratón deficiente para *Ndufs4* en las neuronas VGLUT2-positivas (*Slc17a6*) ha permitido asociar los problemas respiratorios a las neuronas glutamatérgicas. Así, la deficiencia mitocondrial en este tipo neuronal deriva en la formación de lesiones neuropatológicas en el núcleo olivar inferior, en el núcleo fastigial y, especialmente, en el NV, además de traducirse en anomalías motoras y respiratorias letales (~P75). Igualmente,

estos ratones presentan un menor peso corporal asociado a una menor ingesta (Bolea et al., 2019). Dado que las neuronas glutamatérgicas son el tipo neuronal excitatorio mayoritario en el NV (Kodama et al., 2012), la disfunción mitocondrial en este tipo celular podría ser el origen del daño neuropatológico observado en esta región, el cual se traduciría en las anomalías respiratorias fatales observadas en el SL. No obstante, el por qué las neuronas glutamatérgicas vestibulares parecen especialmente vulnerables a la deficiencia mitocondrial continúa siendo una incógnita. En referencia a esto, el nivel de actividad mitocondrial del NV no difiere de otras áreas cerebrales como el cerebelo (Ashton et al., 2005), sugiriendo que el déficit de ATP *per se* no sería la causa de la susceptibilidad. Sin embargo, la estimulación vestibular en un modelo murino de epilepsia resulta en un incremento de los niveles de ARNm codificantes de subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial (Yamada and Nakano, 1999). Esto indica que la activación neuronal vestibular requiere de un incremento de la demanda bioenergética regulado, como mínimo, a nivel transcripcional. Específicamente, la vulnerabilidad de las neuronas glutamatérgicas a la deficiencia mitocondrial podría deberse a la incapacidad de suplir el aumento de demanda energética durante la neurotransmisión. En este sentido, se ha observado que las neuronas glutamatérgicas con deficiencia de *Ndufs4* son más sensibles a anestésicos volátiles (Quintana et al., 2012a; Zimin et al., 2016; Zimin et al., 2018), los cuales se han propuesto que actúan inactivando directamente el complejo I (Falk et al., 2006). La doble inhibición mitocondrial del complejo I, a nivel genético y farmacológico, imposibilitaría la producción energética y, en extensión, la neurotransmisión excitatoria.

Por otro lado, la transmisión glutamatérgica podría verse afectada también por la excitotoxicidad por glutamato. La acumulación de este neurotransmisor en el espacio sináptico puede provocar una sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos postsinápticos, que derivaría en una cascada masiva de Ca^{2+} y, subsiguientemente, en la activación de los procesos de muerte neuronal (Johnston, 2005). Así, la inactivación parcial del complejo I en rata es suficiente

Introducción

para observar una segregación excesiva de glutamato seguida de flujos de Ca^{2+} (Kilbride et al., 2008). Además, la doble inhibición de la glucólisis y la fosforilación oxidativa a nivel neuronal produce una liberación masiva de vesículas en el espacio sináptico (Sobieski et al., 2017), indicando un mecanismo potencialmente patológico en las neuronas glutamatérgicas a la disfunción bioenergética. Una posible explicación al motivo de la acumulación del glutamato en el espacio sináptico es la deficiencia del bombeo de iones para su reciclaje. Las bombas de sodio son las encargadas de generar el gradiente necesario para la recuperación del glutamato liberado. No obstante, estas bombas recaen directamente en el gradiente generado por las bombas de iones Na^+/K^+ ATP-dependientes. Se ha estimado que estas últimas consumen un 40% de la energía total producida durante la respiración aeróbica en el SNC (Rose et al., 2009). En este sentido, la falta de ATP tendría un impacto directo en la capacidad de bombeo de iones, impidiendo la recuperación del neurotransmisor.

Adicionalmente, es interesante remarcar que la excitotoxicidad por glutamato no es un proceso único de la deficiencia mitocondrial. En episodios de hipoxia isquémica, que recapitulan la gliosis, vacuolización y proliferación de la vascularización observados en el SL, también se observa esta despolarización anómala y excitotoxicidad (Johnston, 2005; Perry and Brat, 2017). Notablemente, la mayoría de los casos neonatales de hipoxia-isquémica presentan lesiones en los ganglios basales y en el tronco encefálico (Quattrocchi et al., 2016; Millar et al., 2017). Estas similitudes ponen de manifiesto que la transmisión glutamatérgica es sensible no únicamente a la deficiencia energética, sino, como se ha comentado anteriormente, a los niveles de oxígeno.

Por otro lado, la disfunción mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas puede alterar la propia formación de vesículas de glutamato. En este sentido, la regulación del reciclaje y empaquetamiento del glutamato consume por vesícula unas 11.000 moléculas de ATP (Attwell and Laughlin, 2001). Esto, en conjunto a la alta demanda energética del mantenimiento del potencial de membrana y al

bombeo de iones (Harris et al., 2012), hacen que los terminales presinápticos de las neuronas glutamatérgicas sean extremadamente dependientes del metabolismo bioenergético, especialmente en momentos de intensa actividad sináptica. En estas situaciones, se ha podido observar que la fosforilación oxidativa juega un papel crucial, más incluso que la glucólisis, en la recuperación del estado basal después de la liberación de los transmisores (Sobieski et al., 2017).

Finalmente, además de las posibles alteraciones en la sinapsis neuronal y la síntesis de vesículas de glutamato, la deprivación mitocondrial puede alterar la fisiología neuronal glutamatérgica directamente por el propio metabolismo oxidativo y su relación con el glutamato. Aunque clásicamente se ha estipulado que la glucosa es la principal fuente energética en las neuronas, la fosforilación oxidativa puede adaptarse a diferentes situaciones metabólicas y utilizar otros nutrientes como el lactato derivado de los astrocitos o el mismo glutamato (Sobieski et al., 2017). Así, se ha observado que en casos de excitotoxicidad por glutamato, la mitocondria podría bloquear la entrada de piruvato derivado de la glucosa y activar el consumo de glutamato, el cual es convertido a α -cetoglutarato entrando en el ciclo de Krebs y, en extensión, en la cadena de transporte de electrones (Fendt and Verstreken, 2017; Plaitakis et al., 2017). De este modo, reduciría así la posibilidad de liberar más glutamato protegiendo la sinapsis neuronal. En consecuencia, la inhibición del metabolismo mitocondrial podría promover la acumulación de glutamato. Asimismo, es interesante mencionar que los ratones *Ndufs4KO* presentan un bloqueo de la vía glutamina/glutamato/ α -cetoglutarato debido a la deficiencia mitocondrial y que la administración de rapamicina, mediante el bloqueo de la vía de mTOR, es capaz de revertir este efecto (Johnson et al., 2020). En consonancia, la administración de dimetil α -cetoglutarato en el ratón *Ndufs4KO* tiene un efecto beneficioso a nivel de supervivencia (Lee et al., 2019a). Concretamente, se cree que la utilización de α -cetoglutarato como sustrato en la fosforilación oxidativa podría estimular la actividad del complejo II en casos de disfunción del complejo

Introducción

I (Kayser et al., 2016; Lee et al., 2019a). Por otro lado, cabe destacar que de igual modo que del glutamato se puede sintetizar α -cetoglutarato, esta reacción puede también darse en sentido inverso (Plaitakis et al., 2017). En esta última reacción se oxida la coenzima NADH en NAD^+ , rebajando la posible acumulación de NADH en casos de disfunción del complejo I, principal implicado en la oxidación de esta molécula. En este sentido, se ha observado que neuronas con incrementos en la NADPH-diaforasa, capaz de transferir electrones en moléculas como NADPH y NADH, son más resistentes a la apoptosis en caso de deficiencia mitocondrial (Behrens et al., 1996). En resumen, la relación metabólica del glutamato con el α -cetoglutarato podría también jugar un papel en la susceptibilidad de las neuronas glutamatérgicas a la deficiencia mitocondrial y, en extensión, controlar el déficit motor y respiratorio observado en el SL.

En consonancia con el metabolismo del glutamato y la disfunción mitocondrial, es importante mencionar que otros neurotransmisores juegan también un papel importante en el metabolismo mitocondrial. Así, del ácido γ -aminobutírico o GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, un $\sim 90\%$ del contenido de este tendría un papel dentro del metabolismo bioenergético (Roth and Draguhn, 2012). Específicamente, el neurotransmisor GABAérgico procede del precursor glutamato. A su vez, GABA puede procesarse a succinato, entrando en el ciclo de Krebs y contribuyendo en la síntesis de ATP. Concretamente, se cree que al menos un 30% de la producción del ciclo de Krebs proviene del eje α -cetoglutarato-glutamato-GABA-succinato (Hinton and Johnston, 2018). En consonancia, anomalías en el metabolismo mitocondrial, y en extensión, en el metabolismo de GABA, pueden inducir problemas neurológicos mayores. Así, por ejemplo, la acumulación anómala de GABA por la disrupción del proceso $\text{GABA} \rightarrow \text{succinato}$ en ratón deriva en una disminución específica de la mitofagia, relacionada con un incremento de la actividad de mTOR, y en un incremento consecuente de los niveles de ROS. La inhibición de mTOR por rapamicina en estos ratones permite restablecer los niveles de estrés oxidativo y recuperar los niveles basales del organelo en el cerebro (Lakhani et al., 2014). Asimismo, es

importante tener en cuenta que los niveles de ROS mitocondriales modulan la expresión de los receptores postsinápticos GABAérgicos, regulando la neurotransmisión inhibitoria (Accardi et al., 2014). Del mismo modo, aunque quizás no tan dependiente de la producción de ATP, el reciclaje de GABA en el espacio sináptico también recae indirectamente en las bombas de iones Na^+/K^+ ATP-dependiente (Scimemi, 2014). En consecuencia, alteraciones en el metabolismo mitocondrial en las neuronas GABAérgicas pueden tener un impacto en el sistema neurotransmisor.

A tal efecto, la caracterización de un ratón deficiente para *Ndufs4* en las neuronas GABAérgicas (GAD2-positivas) permitió el estudio de una marcada reactividad glial en los ganglios basales, concretamente en la *Substantia nigra* y en el *Globus pallidus* y, especialmente, en el BO. Estos ratones, a diferencia del fenotipo patológico progresivo observado en los animales con la misma deficiencia en las neuronas glutamatérgicas, presentan un desarrollo aparentemente normal hasta el momento de su repentina muerte a la temprana edad de \sim P55, causada por un severo ataque epiléptico (Bolea et al., 2019). Adicionalmente, estos animales muestran un ligero retraso en el crecimiento, una menor ingesta e hipotermia, signos clínicos, a excepción de la hipotermia, también encontrados en el modelo murino glutamatérgico, comentado anteriormente (Bolea et al., 2019). Por tanto, este modelo podría sugerir que la disfunción mitocondrial en las neuronas GABAérgicas mediaría específicamente la epilepsia observada en los pacientes con el SL. En consonancia, los pacientes con el Síndrome de Alper, que presentan principalmente errores en la replicación del ADNmt y sufren epilepsia intratable, también presentan una mayor vulnerabilidad a la disfunción mitocondrial en las neuronas GABAérgicas (Hayhurst et al., 2019). Aunque probablemente las lesiones observadas en los ganglios basales sean las principales responsables de la epilepsia (Vuong and Devergnas, 2018), lesiones en el bulbo olfatorio también se han visto relacionadas con circuitos neuronales complejos de diferentes áreas cerebrales implicados en la epilepsia, como la epilepsia asociada al lóbulo temporal (Espinosa-Jovel et al., 2019). Asimismo, las profundas lesiones en el BO,

Introducción

a diferencia de la de los ganglios basales, se observan también en el ratón *Ndufs4KO* (Quintana et al., 2010), señalando una especial vulnerabilidad a la disfunción mitocondrial en esta área. En este sentido, anomalías en el bulbo olfatorio suelen ser una de las primeras alteraciones en enfermedades neurodegenerativas, tal como el Parkinson, donde la región del bulbo olfatorio es la primera en la que se observa acumulación de α -sinucleína (Gardner et al., 2017). Así, la temprana afectación a la disfunción mitocondrial en el bulbo olfatorio podría revelar mecanismos moleculares que dirigirían la progresión patológica en el SL, a pesar de no ser un área aparentemente afectada en los pacientes humanos.

No obstante, las características moleculares que definen la susceptibilidad de las neuronas GABAérgicas en el bulbo olfatorio a la deficiencia mitocondrial sigue siendo un enigma. En este sentido, el ácido γ -aminobutírico se ha visto significativamente relacionado con el proceso de diferenciación neuronal (Jelitai and Madarasz, 2005), no solo a nivel embrionario sino también en procesos de neurogénesis en adulto. Específicamente, en roedores adultos se ha observado que el bulbo olfatorio recibe neuroblastos, los cuales maduran e integran en el circuito neuronal ya diferenciado, principalmente en la capa más interna del bulbo o capa granular (Nagayama et al., 2014; Pallotto and Deprez, 2014), compuesta principalmente por neuronas GABAérgicas. Para ello, los niveles circulantes de GABA juegan un papel crucial en el bulbo olfatorio, pudiendo ser más sensibles a los defectos de este. Asimismo, el factor transcripcional AMPc-dependiente CREB o la quinasa PI3K (directamente relacionada con la vía de mTOR) podrían también modular el destino de estos neuroblastos a nivel transcripcional y proteómico, respectivamente (Pallotto and Deprez, 2014). Así, la alteración del sistema GABAérgico en el bulbo olfatorio por la disfunción mitocondrial podría tener un impacto múltiple, a nivel metabólico y neurotransmisor, alterando así la neurogénesis.

En conjunto, la deficiencia mitocondrial tiene un impacto mayor en las neuronas GABAérgicas del bulbo olfatorio y las glutamatérgicas del núcleo vestibular en el modelo *Ndufs4KO*. Dada la similitud clínica de este modelo con los pacientes con SL, las neuronas glutamatérgicas serían especialmente relevantes por su posible implicación en los problemas respiratorios que usualmente derivan en la muerte de los pacientes con SL. No obstante, los mecanismos celulares subyacentes que motivan que estas neuronas en dichas regiones sean más susceptibles a la deficiencia mitocondrial sigue siendo una cuestión por resolver. En este sentido, teniendo en cuenta la fisiopatología en el SL y los datos comentados anteriormente, las alteraciones mitocondriales derivan en cambios de expresión en los perfiles transcripcionales y postrcripcionales, como la vía de síntesis de proteínas mediada por mTOR o el control de la hipoxia. Igualmente, el control del metabolismo mitocondrial a nivel transcripcional se ha relacionado íntimamente con la regulación de la actividad neuronal (Mehrabian et al., 2005; Dhar et al., 2009; Onyango et al., 2010). Así, la caracterización de los perfiles de expresión que gobiernan estas dos poblaciones neuronales con disfunción mitocondrial podría elucidar los mecanismos neuropatológicos asociados, permitiendo desarrollar terapias efectivas, quizás enfocadas al tratamiento de cada signo clínico del SL.

5. Técnicas para el análisis del traductoma citosólico

Por definición, el transcriptoma engloba el estudio de todo tipo de ARN, en cualquier forma y localización. Dentro de esta *ómica*, el traductoma o perfil traduccional se centra únicamente en aquel ARNm asociado al ribosoma para la síntesis proteica o en sus mecanismos de regulación (Piccirillo et al., 2014; Zhao et al., 2019a). No obstante, algunos expertos definen al traductoma como aquel ARNm que está efectivamente siendo traducido, ya que la asociación ribosomal no refleja necesariamente actividad traduccional (Zhao et al., 2019a). La regulación traduccional de un transcrito es un proceso complejo que puede

determinar el destino de la proteína de manera significativa, sobre todo al inicio de la síntesis (Jackson et al., 2010). Igualmente, durante la elongación peptídica existen varios controles de calidad que pueden provocar el bloqueo de la actividad ribosomal (Nota 1). Estos procesos regulan los niveles proteicos promoviendo los cambios conformacionales peptídicos adecuados o la degradación del transcrito en cuestión y el reciclaje ribosomal (Collart and Weiss, 2020). A nivel citosólico, el ARNm que se encuentra activamente traducido suele estar unido a varios ribosomas (Warner et al., 1962). En este sentido, se cree que a mayor número de ribosomas más actividad de síntesis proteica existe, teniendo en cuenta una velocidad de elongación constante. No obstante, se ha podido observar que, en ciertos modelos con una alta tasa de síntesis proteica, como las células embrionarias de riñón humano, HEK293T, la fracción monosómica (ARNm unido a un solo ribosoma) es dominante (Morello et al., 2011). Igualmente, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha determinado que los monosomas no solo son capaces de iniciar la traducción si no que principalmente dominan el proceso de elongación peptídica. Además, en este modelo la mayoría de transcritos poco abundantes que son traducidos son asociados únicamente a un ribosoma, demostrando la gran variabilidad del

Nota 1. Principales reguladores de la traducción citosólica.

La regulación de la traducción citosólica (iniciación, elongación y terminación) depende de la interacción de los elementos-cis del propio ARNm a traducir (a nivel de secuencia o estructura) con los elementos de regulación-trans, compuestos por un conjunto de factores reguladores de la iniciación (eIF), elongación (eEF) y terminación (eTF) de la síntesis peptídica. Asimismo, otros elementos reguladores como los RBP (*RNA binding proteins*), IRES (*Internal ribosome entry site*), miRNAs (*microRNAs*) y los lncRNAs (*long non coding RNAs*) pueden también contribuir en la activación o inhibición de la traducción. Es importante destacar, que el proceso más crítico durante la síntesis peptídica es la etapa de iniciación, altamente regulada por la activación de la vía de mTOR. Finalmente, cabe mencionar que el escenario de la síntesis peptídica es cada vez más complejo a nivel de regulación. Cambios en la composición proteica de los ribosomas pueden contribuir a activar la síntesis peptídica de ciertos grupos de ARNm (Venezia et al., 2019).

proceso de traducción entre transcritos (Heyer and Moore, 2016). Así, el hecho de que un transcrito se encuentre asociado a un ribosoma no debe tomarse como una medida directa de actividad traduccional. En esta tesis doctoral, con el fin de evitar confusiones, se referirá como traductoma o perfil traduccional al conjunto de ARNm asociado a ribosoma estando o no en proceso activo de síntesis proteica.

A pesar de la discordancia entre traducción activa o inactiva, la unión de un transcrito con el complejo ribosomal presenta una mejor correlación con los niveles proteicos que el estudio de este transcrito a nivel transcriptómico. Así, el estudio del traductoma o perfil traduccional se sitúa como una potente herramienta entre la transcriptómica y la proteómica.

Actualmente, los métodos para el estudio del ARNm asociado a ribosoma junto los avances en secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq) han marcado un punto de inflexión en la investigación de los cambios en el perfil de expresión genético asociados al desarrollo, fisiología o patología (King and Gerber, 2016). En las dos últimas décadas las principales aproximaciones en la investigación del traductoma se basan en el perfil polisómico y/o ribosomal (Piccirillo et al., 2014). La primera técnica se basa en el fraccionamiento por gradiente de sacarosa del ARNm. Según la cantidad de ribosomas al que se encuentre asociado, el ARNm quedará en una u otra fracción. Esta técnica permite hacer una estimación de la actividad y la regulación traduccional de cada transcrito por técnicas de expresión génica como la PCR con transcriptasa inversa (qRT-PCR), *microarray* o RNA-Seq (Piccirillo et al., 2014). Por otro lado, la técnica del análisis del perfil ribosomal se basa en la digestión de los transcritos asociados a ribosoma con la ribonucleasa I, permitiendo extraer los fragmentos de ARNm protegidos (~22-35 nucleótidos) (Ingolia et al., 2009; Ingolia et al., 2012). La secuenciación de estas secuencias de nucleótidos ha puesto de manifiesto nuevas posiciones de unión entre ARNm:Ribosoma (codones de inicio alternativos, marcos de lectura

Introducción

o lugares de pausa/bloqueo) relevantes en la regulación traduccional (Lian et al., 2016).

A nivel general, ambas técnicas han permitido un gran progreso científico en el campo de la traducción. Sin embargo, estas requieren de equipos especializados, de un análisis bioinformático complejo y de una extensiva manipulación de las muestras. Esto último puede alterar fácilmente el perfil traduccional *in situ*, ya que se adapta rápidamente a los cambios del medio (Zhao et al., 2019a). Además, en el gradiente de sacarosa, pese que los ribosomas sean de las macromoléculas más grandes a nivel celular, se puede detectar contaminación de otros complejos no ribosomales. Del mismo modo, la no-digestión del ARNm de doble cadena por parte de la ribonucleasa I puede dar lugar a falsos positivos en los perfiles ribosomales (King and Gerber, 2016; Zhao et al., 2019a).

Por otro lado, cabe tener en cuenta que estas técnicas no tienen resolución de tipo celular. Por tanto, en investigaciones relacionadas con tejidos complejos, como el SNC, en que la inferencia del perfil de expresión de cada tipo celular es crucial para entender los procesos moleculares subyacentes, el potencial de estas técnicas es limitado. Clásicamente, con la finalidad de aislar el ARNm asociado a ribosoma de subpoblaciones celulares definidas genéticamente en el SNC se han utilizado métodos de aislamientos físico-celulares seguidos de la separación del complejo ARNm:Ribosoma. Las herramientas más usadas son la clasificación de células activadas por fluorescencia por citometría de flujo (Paden et al., 1986); la purificación por marcadores de membrana de tipo celular específico en placa (*immunopanning*) (Barres et al., 1988); la microdissección por captura láser de grupos celulares mediante la fijación del tejido y la selección microscópica por morfología (Emmert-Buck et al., 1996) y/o marcadores fluorescentes (Rocco et al., 2017); o la succión del citoplasma a través de pipeta fijada a membrana después de un registro electrofisiológico (*patch clamp*) (Toledo-Rodríguez et al., 2004). A pesar de las virtudes de estos métodos, son procesos que requieren también de una alta manipulación de la muestra

(fijación, disociación, disección...), con la consiguiente alteración del traductoma original. Además, la separación de células con morfologías complejas, como en el caso del SNC, suele centrarse en la captación del soma, perdiendo el perfil de expresión genético a nivel del terminal neuronal. Así, solo aquellos transcritos con expresión estable cerca del núcleo podrían ser analizados mediante estas tecnologías (Heiman et al., 2014; Jung and Jung, 2016). En consecuencia, en los últimos años, se ha puesto especial énfasis en el desarrollo de herramientas que, de una manera rápida y eficiente, permitan la purificación del ARNm asociado a ribosoma de grupos celulares concretos del SNC.

5.1. Herramientas para el análisis del traductoma citosólico con resolución de tipo celular en tejidos complejos

En el año 2008 se publicó por primera vez la creación de un ratón transgénico que permitía la purificación ribosomal (TRAP: *translating ribosome affinity purification*) de tipos celulares concretos y el subsiguiente aislamiento del ARNm asociado (Heiman et al., 2008). Este animal fue diseñado a través de la inserción del cromosoma bacteriano artificial (BAC) codificante para la subunidad ribosomal RPL10a seguido de la proteína fluorescente verde EGFP. Con la finalidad de que la expresión de esta proteína fuera en determinados tipos celulares se añadió en el cromosoma un promotor de expresión restringida para determinados grupos neuronales. Así, de una manera rápida y sencilla, se consiguió inmunaislar los ribosomas RPL10a·EGFP positivos y analizar el ARNm asociado (Heiman et al., 2014). La creación de distintas líneas de ratones bacTRAP han permitido determinar que existe un patrón traduccional específico en subpoblaciones celulares del SNC. No solo entre neurona y glía, sino también entre grupos neuronales (Doyle et al., 2008).

Con el fin de evitar crear una línea bacTRAP para cada tipo celular a estudiar, la tecnología TRAP ha sacado partido a la gran cantidad de líneas murinas que expresan la recombinasa Cre bajo distintos promotores y de la tecnología Cre-loxP (Gong et al., 2007; Luo et al., 2008; Kumar et al., 2009). Para ello, se han

Introducción

creado principalmente dos ratones que codifican para una subunidad ribosomal seguida de un epítipo con expresión Cre-dependiente. Así, solo en aquellas células con expresión de la recombinasa Cre se marcarán los ribosomas, permitiendo la inmunoprecipitación posterior. El primero de los ratones presenta el transgén *RPL10a^{EGFP}* en el locus murino *Rosa26* (Zhou et al., 2013). El segundo ratón o ratón RiboTag codifica en el locus de la subunidad ribosomal *Rpl22* un epítipo de hemaglutinina (3xHA) (Sanz et al., 2009). Ambos modelos permiten el marcaje de la subunidad grande ribosomal citosólica, optimizando las posibilidades de inmunoprecipitar el complejo ARNm:Ribosoma, dado que este complejo solo se forma si previamente el ARNm ha sido ensamblado en la subunidad pequeña (Venezia et al., 2019). La principal diferencia entre ambos roedores es que, mientras que en el primero la expresión de la proteína ribosomal marcada debe competir con la producción constitutiva de RPL10, la expresión de RPL22·HA en el ratón es proporcional a los niveles endógenos de RPL22, aumentando las posibilidades de incorporarse en el ribosoma final. Comparativamente, la tecnología RiboTag sería, en este sentido, una mejor opción para investigar el traductoma a nivel de tipo celular en el SNC (Figura 10). La proteína de fusión RPL22·HA (23 kDa), igual que RPL22 (15 kDa), puede expresarse de manera estable en todos los tejidos, incorporándose preferentemente en la fracción polisómica. Además, a diferencia de las tecnologías de separación celular físicas, este ratón permite el aislamiento del ARNm a nivel de soma y terminal, dado que el marcaje ribosomal sucede de manera endógena (Sanz et al., 2009). No obstante, se debe tener en cuenta que las líneas murinas Cre pueden expresar la recombinasa de manera indeseada durante algunas etapas del desarrollo, sea por causas fisiológicas o artefactos del diseño del transgén. Así pues, es crucial una correcta caracterización del modelo animal antes de proceder al análisis del perfil traduccional (Song and Palmiter, 2018; Luo et al., 2020; Stifter and Greter, 2020) y determinar el nivel de enriquecimiento de la muestra inmunoprecipitada (IP) para el marcador del tipo celular de estudio. Para ello, siempre se debe extraer una porción del ARN total

(*Input*) presente en la muestra para poder realizar la comparativa. Pequeñas contaminaciones son fácilmente detectadas en las tecnologías de secuenciación actuales. En este sentido, el protocolo de inmunoprecipitación para la herramienta TRAP ha sido extensamente optimizado, permitiendo la obtención de un perfil traduccional *in situ* y reproducible (Heiman et al., 2014; Sanz et al., 2019).

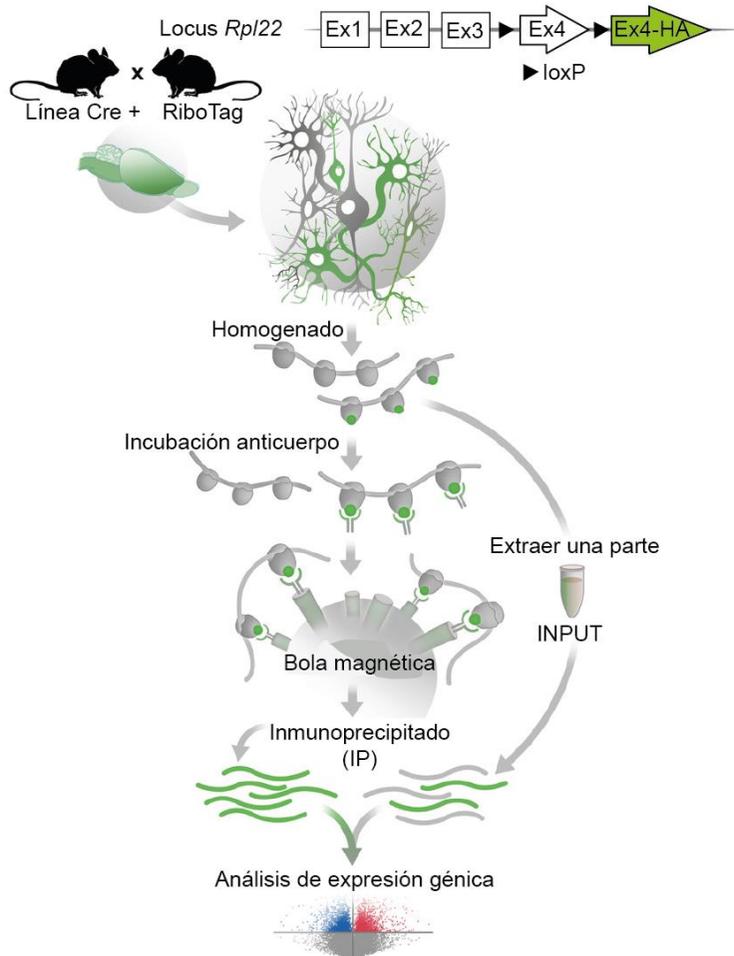


Figura 10. Esquema de la estrategia RiboTag. El cruce del ratón RiboTag con una línea murina con expresión de Cre recombinasa producirá la recombinación del último exón (Ex4-HA). Esto se traducirá en la expresión del epítipo HA únicamente en los ribosomas citosólicos del tipo celular de interés. Después de diseccionar la región cerebral de interés se procede a realizar un homogenado del tejido. Este se incuba en primer lugar con el anticuerpo anti-HA y, posteriormente, se conjuga con las bolas magnéticas permitiendo la inmunoprecipitación del ARNm asociado del tipo celular de interés (IP). Al mismo tiempo, se extrae del homogenado inicial una pequeña porción que representará todo el ARN del área diseccionada (INPUT). Finalmente, se procede a realizar el análisis de expresión génica del ARNm asociado a ribosoma citosólico de la población celular en investigación. Figura adaptada de Sanz et al., 2019.

Introducción

Por extensión, cabe mencionar que tanto para la estrategia con marcaje RPL10a·EGFP (Nectow et al., 2017), como para RPL22·HA (Sanz et al., 2015) se han desarrollado vectores virales basados en virus adenoasociados (AAVs) que permiten estudiar el perfil traduccional de poblaciones celulares en un espacio-tiempo concreto, evitando la expresión no deseada del marcaje ribosomal debido a la expresión transitoria de la recombinasa Cre durante ciertas etapas del desarrollo. Estos vectores virales, a pesar de no ser integrativos, tienen serotipos distintos (1, 5, 8, 9 o 10) con la capacidad de transducir eficientemente en el SNC y expresarse de manera estable durante un largo período de tiempo (Stoica et al., 2013). No obstante, la inyección de vectores virales es laboriosa, ya que requiere de cirugía estereotáxica en las coordenadas correctas. Esto puede introducir variabilidad en los resultados (Armstrong and Tasker, 2014), además de activar procesos inflamatorios (Mastakov et al., 2002). Últimamente, la tecnología TRAP se ha combinado con la técnica del análisis del perfil ribosomal, permitiendo la caracterización del perfil de expresión génica en procesos de actividad neuronal de tipo celular específico e incluso con resolución subcelular (dendritas, soma o axón) (Dougherty, 2017).

Finalmente, para definir un perfil traduccional citosólico con resolución de tipo celular es necesario combinar la tecnología RiboTag con un análisis por RNA-Seq. Los datos obtenidos a través de esta tecnología son evaluados a nivel de calidad y procesados con herramientas bioinformáticas que permiten realizar un análisis de expresión diferencial (Conesa et al., 2016). Asimismo, estas herramientas permiten la integración y visualización de los datos obtenidos con el fin de rebajar la complejidad y aportar relevancia biológica a un largo listado de transcritos. Entre otros, el análisis de ontología génica (GO) agrupa los diferentes transcritos en categorías biológicas comunes e identifica aquellas significativamente sobrerrepresentadas entre el listado de transcritos diferencialmente expresados (Young et al., 2010), ofreciendo la oportunidad de entender los mecanismos moleculares subyacentes a la condición biológica analizada.

6. Regulación de la expresión génica mitocondrial en mamíferos

Una de las características principales de la mitocondria es que esta posee su propia maquinaria transcripcional y traduccional que le permite atender de una manera rápida las necesidades bioenergéticas de la célula en cada momento (D'Souza and Minczuk, 2018). Estos procesos se modulan por una precisa coordinación molecular entre el genoma nuclear y el mitocondrial (Vafai and Mootha, 2012). Por tanto, alteraciones en un sistema tienen un impacto directo en el otro (Pearce et al., 2017). A su vez, esta comunicación coordina funciones secundarias del organelo, que no son menos relevantes, como la integración de señales en situaciones de estrés (Quirós et al., 2016; Mottis et al., 2019). Procesos como la biogénesis del organelo, dinámica mitocondrial (fusión/fisión) y mitofagia contribuyen, igualmente, en el mantenimiento del metabolismo oxidativo (Benard et al., 2007; Herst et al., 2017).

6.1. Transcripción y traducción mitocondrial

El ADNmt o genoma mitocondrial se sitúa en la matriz mitocondrial, espacio delimitado por la membrana interna. Principalmente, es heredado por vía materna, aunque recientemente algunos estudios señalan la transmisión de este genoma por vía paterna (Luo et al., 2018; McWilliams and Suomalainen, 2019). El ADNmt se compone por ~16,6k pares de bases (pb) en una estructura circular de doble cadena, formada por una cadena ligera, rica en guanina que codifica para la mayoría de los genes y; cadena pesada, principal hebra molde para la transcripción (D'Souza and Minczuk, 2018). Estas secuencias codifican para 37 genes; 13 proteínas de la fosforilación oxidativa, 22 ARN de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosomales (ARNr) (Mercer et al., 2011; Rusecka et al., 2018). Por tanto, el genoma mitocondrial clásicamente está especializado en el mantenimiento de la traducción de las subunidades proteicas del metabolismo energético. Sin embargo, recientemente se han identificado en el ADNmt humano tres péptidos cortos que podrían tener funciones adicionales; Humanin, MOTS-C y GAU, codificados en el ARNr 16S, 12S y en la cadena complementaria del gen *MTCO1*,

Proporciones elevadas de mutaciones mitocondriales nocivas pueden derivar en enfermedades severas (Stefano and Kream, 2016). A fin de proteger y mantener las distintas copias del ADNmt, este se compacta en los llamados nucleoides mitocondriales en conjunto con distintas proteínas. En estas estructuras, se encuentran los principales componentes de la maquinaria replicativa y transcripcional mitocondrial (Gilkerson et al., 2013; Bonekamp and Larsson, 2018). En contacto con los nucleoides se encuentran los llamados gránulos de ARN mitocondrial, donde se procesan y maduran (por ejemplo, mediante la adición de las colas poli(A)) los distintos transcritos obtenidos del ADNmt (Iborra et al., 2004). Asimismo, cercano a los gránulos de ARN se concentran en los llamado D-foci proteínas encargadas de la estabilización o degradación de los transcritos (Rorbach and Minczuk, 2012; Borowski et al., 2013). Esta compartimentación (Figura 12) permite de una manera rápida y organizada la expresión y la traducción de la maquinaria oxidativa, permitiendo la activación o inhibición del metabolismo mitocondrial en respuesta a las señales del genoma nuclear, manteniendo la homeostasis celular.

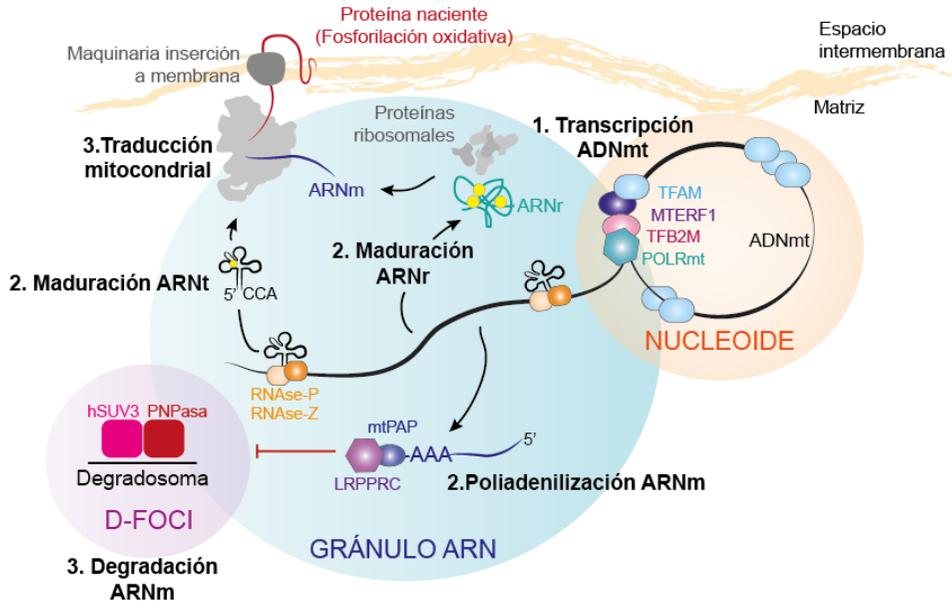


Figura 12. Representación del proceso de expresión génica del ADNmt. El proceso se inicia con (1) la transcripción en los nucleoides. El factor TFAM es la principal proteína activadora de la transcripción, así como POLRmt y TFBM2. MTERF1 se considera el factor terminador. A continuación, (2) se realiza la poliadenilación del ARNm, la maduración del ARNr y del ARNt. Finalmente, (3) el ARNm producido puede ser traducido a proteína e insertado en los complejos de la fosforilación oxidativa o ser degradado en el D-foci con las enzimas hSUV3 y PNPasa (Adaptado de Barchiesi and Vascotto, 2019).

Específicamente, bajo las señales celulares adecuadas, la ARN polimerasa mitocondrial (POLRmt) se encarga de sintetizar la cadena complementaria de ARN (transcripción mitocondrial) en los nucleoides mitocondriales. Para ello, se une con el promotor de la cadena ligera o pesada situados en la región no codificante D-loop. Cabe destacar que hay indicios que señalan la existencia de un promotor adicional entre el ARNr y el resto de los genes, explicando los distintos niveles de expresión del ARNr y el ARNm, que clásicamente se cree se transcriben como una única cadena policistrónica (Shokolenko and Alexeyev, 2018). En cualquier caso, aunque filogenéticamente la POLRmt presenta una gran similitud en la secuencia catalítica con los bacteriófagos T7 y T3 (Ringel et al., 2011; D’Souza and Minczuk, 2018), esta no es capaz de unirse por si sola al ADNmt. Para ello, ha incorporado dos péptidos pentátricos en el extremo N-terminal que permiten la unión de los factores de inicio de transcripción TFAM

y TFB2M (*Transcription Factor B2, Mitochondrial*) (Hillen et al., 2018). La proteína TFAM puede unirse a la región control del ADNmt, en la que se desliza hasta encontrar el promotor de interés, permitiendo la unión de POLRmt. En este momento, el factor TFB2M modificaría la estructura de la polimerasa permitiendo la apertura de la doble cadena de ADNmt y el inicio de la transcripción (D'Souza and Minczuk, 2018). A continuación, un cambio de conformación del ADNmt promovería la escisión de TFAM y TFB2M (Hillen et al., 2018), permitiendo la entrada del factor de elongación mitocondrial TEFM. Este factor podría conferir una mayor estabilidad a POLRmt, facilitando la salida del ARN e impidiendo la terminación prematura de la síntesis del ARN (Minczuk et al., 2011, Agaronyan et al., 2015). Una vez sintetizada la cadena de ARN en forma policistrónica, el proceso de elongación termina. Para ello, se ha sugerido que el factor MTERF1 podría unirse al ARN provocando su escisión. Aunque este proceso es aún desconocido, en humanos el ARNt-Leucina de la cadena ligera, se cree podría ser el punto de unión con el factor MTERF1 (Hillen et al., 2018; Shokolenko and Alexeyev, 2018; D'Souza and Minczuk, 2018).

Una vez concluida la transcripción, los distintos tipos de ARN unidos en la secuencia policistrónica se separan, principalmente por el modelo de puntuación, el cual propone que la ribonucleasa RNAsa-P se uniría al extremo 5' de los ARNt y la ribonucleasa RNAsa-Z al extremo 3', produciendo la escisión de los distintos fragmentos del ARN (Ojala et al., 1981; Lopez-Sanchez et al., 2011). No obstante, dado que no todos los extremos 5' y 3' contienen las secuencias de reconocimiento para estas ribonucleasas otros mecanismos aún desconocidos podrían también intervenir en este proceso (Rackham et al., 2012). Esta fragmentación da lugar a 22 ARNt, 2 ARNr y 11 ARNm, dos de los cuales son bicistrónicos (*MTND4/MTND4L* y *MTATP8/MTATP6*). Posteriormente, todos los ARN sufren un conjunto de modificaciones con propósitos escasamente conocidos. Por lo general, los ARNt incorporan la terminación CCA en el extremo 3' para ser funcionales. Los ARNr son modificados mediante la adición de nuevos nucleótidos y cambios de conformación para su inserción en el ribosoma

Introducción

mitocondrial. Finalmente, los ARNm, a excepción del *MTND6* en humanos y *Nd6* en ratón, son modificados mediante la inserción de una cola poli(A), de longitud variable, en el extremo 3' (Figura 12) (Temperley et al., 2010; Rackham et al., 2012; Rorbach and Minczuk, 2012). En referencia a esto último, mientras en bacteria la poliadenilación es una señal de degradación y en el citoplasma eucariota es una medida de estabilización, en mitocondria la incorporación de este fragmento puede tener múltiples funciones. Una posibilidad es que la cola poli(A) completa el codón de terminación para la traducción, dado que 7 de los 11 transcritos no lo poseen (Ojala et al., 1981; D'Souza and Minczuk, 2018) (Figura 13).

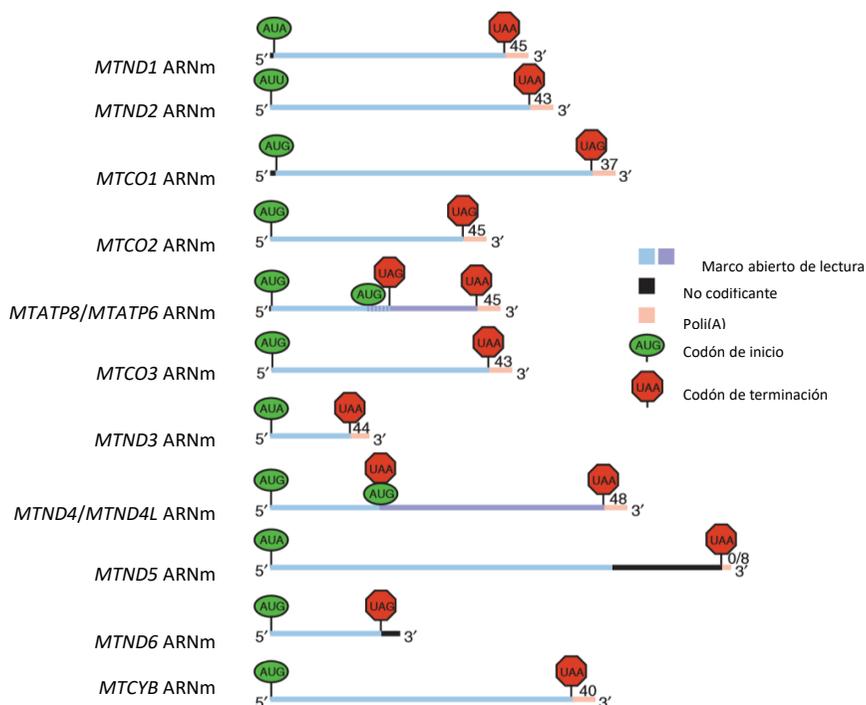


Figura 13. Poliadenilación del ARNm mitocondrial. Representación del largo medio de la cola poli(A) incorporada en los transcritos mitocondriales en células HepG2 indicado en el extremo 3'. Adaptado de Rackham et al., 2012.

Después de las modificaciones postranscripcionales se produce la traducción mitocondrial. No obstante, esta solo ocurre bajo las señales nucleares adecuadas que controlan la biogénesis y actividad ribosomal mitocondrial. Para que esto

sea posible, el ribosoma mitocondrial en mamíferos se ha especializado distanciándose de sus orígenes procariotas. En comparativa, presenta una mayor proporción de proteínas en su composición (82 proteínas totales) (Amunts et al., 2015; D'Souza and Minczuk, 2018), entre las cuales destaca la proteína ML45 que permite la unión del ribosoma mitocondrial con la membrana interna mitocondrial. De este modo, se produce una rápida inserción de las proteínas nacientes transmembrana en su destino final (Englmeier et al., 2017), optimizando el control de la expresión génica y la activación del metabolismo energético. Notablemente, la especialización de la traducción mitocondrial se ha extendido hasta el punto de poseer un código genético ligeramente diferente al universal (Barrell et al., 1979; Knight et al., 2001). En este sentido, a diferencia de la traducción bacteriana, el ARNt-Metionina en mitocondria es el mismo tanto para la iniciación como para la elongación de la traducción. La diferencia reside en que una proporción de estos presenta un grupo formilo (fMet) que le permite iniciar la síntesis proteica (Tucker et al., 2011). Estas características, entre otras, hacen de la traducción mitocondrial un proceso complejo y poco conocido hasta la fecha. Así, aunque la finalidad de esta maquinaria es sintetizar tan solo 13 proteínas con función en la fosforilación oxidativa, los mecanismos de activación/inhibición y organización orquestados desde el núcleo siguen siendo un campo por investigar. De este modo, por ejemplo, la regulación de la síntesis peptídica de los dos transcritos bicistrónicos es desconcertante. Estos transcritos presentan marcos de lectura abiertos solapantes, en consecuencia, el marco de lectura abierto del segundo transcrito tiene una secuencia no traducida en el extremo 5' que los otros transcritos no presentan, suponiendo un reto en la comprensión de su regulación (Mai et al., 2017). La complejidad de estos procesos y la gran cantidad de factores nucleares que intervienen hacen que alteraciones en la traducción mitocondrial tengan un gran impacto funcional.

En cualquier caso, el modelo clásico de traducción mitocondrial señala que el ribosoma mitocondrial se compone por una subunidad mayor con un coeficiente de sedimentación de 39S, una menor de 28S y de dos ARNt: el 16S y el 12S,

Introducción

localizados respectivamente, en la subunidad mayor y menor (Greber and Ban, 2016). La subunidad mayor contiene el centro catalítico, evolutivamente conservado, con la peptidil transferasa (sitio P) y el canal de salida del péptido nascente (Greber et al., 2014). La subunidad menor contiene un túnel especializado para la unión con el ARNm y el centro de unión aminoacil para los ARNt (sitio A). En bacteria, ambas subunidades se interconectan por el ARNr 5S. Sin embargo, en el ribosoma mitocondrial de mamífero no se ha encontrado dicha estructura. En su defecto, un ARNt tendría esa función. En humanos se ha propuesto que el ARNt-Valina, ya codificado entre ambos ARNr en el genoma mitocondrial, podría tener dicha función (Brown et al., 2014).

Al inicio de la traducción, el factor de iniciación IF3mt se une al ARNm junto a la subunidad menor, impidiendo la unión de la subunidad mayor. A continuación, se reconoce el codón de inicio (AUG, AUU o AUA) del ARNm al que se une el primer residuo de fMet con la ayuda del factor de iniciación IF2mt (Tucker et al., 2011; Ott et al., 2016), produciendo así la síntesis del primer aminoácido. Seguidamente, se produce la escisión de los factores de iniciación permitiendo el ensamblaje con la subunidad mayor y el inicio de la fase de elongación. Esta etapa depende de tres factores: EF-Tumt, EF-Tsmt y EF-G1mt. El primer factor, GTP-dependiente, coloca en el sitio A un ARNt cargado con el aminoácido correspondiente. El segundo factor permite la regeneración de GDP a GTP promoviendo la carga de residuos. Cuando el aminoácido cargado es reconocido por el codón, EF-G1mt produce la translocación del sitio A al sitio P, donde se produce la unión a la cadena peptídica. La consiguiente translocación produciría la salida del ARNt para ser reciclado. Finalmente, en el momento que aparece el codón de terminación, el factor RF1mt detiene la síntesis proteica mediante la escisión de la cadena nascente. La unión posterior de los factores RRF1mt y EF-G2mt producen la separación de las dos subunidades ribosomales. En este momento, el factor IF3mt se vuelve a unir a la subunidad menor bloqueando el ensamblaje ribosomal (Boczonadi and Horvath, 2014; Ott et al., 2016; Mai et al., 2017). Así pues, la traducción mitocondrial culmina con la síntesis de 13

subunidades proteicas de los complejos mitocondriales I, III, IV y V, permitiendo la síntesis de ATP.

6.2. Importancia de la coordinación núcleo-mitocondria en la homeostasis celular

La correcta expresión del ADNmt depende únicamente de proteínas codificadas en el núcleo. Aproximadamente, entre 250-300 proteínas nucleares tienen dedicación exclusiva en la regulación del perfil de expresión génica mitocondrial, revelando un proceso altamente estructurado (Pearce et al., 2017). Así, una sinergia mitocondria-núcleo o mito-nuclear es crucial para la síntesis de un proteoma mitocondrial eficiente que, por retroalimentación, impactará directamente en la homeostasis celular. En este sentido, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha podido determinar por secuenciación masiva genómica que durante la transición de un ambiente anaeróbico a uno aeróbico existe una coordinación entre la generación de subunidades mitocondriales en el núcleo y la mitocondria, a velocidades dispares, siendo la maquinaria nuclear la dominante (Couvillion et al., 2016). Aunque las vías mitocondriales difieren en muchos sentidos entre levaduras y mamíferos, en este último grupo se ha observado que el bloqueo de la traducción de la subunidad COX4 (nuclear) deriva en la paralización traduccional de la subunidad COX1 (mitocondrial), evitando el depósito innecesario de subunidades proteicas del complejo IV y optimizando los recursos celulares (Richter-Dennerlein et al., 2016). Asimismo, la retirada de cloranfenicol, un inhibidor de la traducción mitocondrial, activa la biosíntesis proteica en el citoplasma, demostrando así que esta comunicación es de carácter bidireccional (Guerrero-Castillo et al., 2017). Adicionalmente, tanto en levadura como en mamífero, se ha demostrado que ciertas proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo se traducen directamente en la membrana externa mitocondrial, promoviendo su inserción directa en el organelo, mientras son, a su vez, controladas directamente por proteínas de origen mitocondrial (Gehrke et al., 2015; Huang et al., 2018; Vardi-Oknin and

Introducción

Arava, 2019). El conjunto de estos datos revela un mecanismo de comunicación mito-nuclear en el control de la síntesis proteica significativamente conservado durante la evolución. Alteraciones de estos procesos pueden impactar directamente en el conjunto de funciones del organelo y de la célula.

Notablemente, aunque esta bicomunicación se refleja en la pleiotropía funcional del organelo, tiene un gran impacto en el proceso de transcripción y traducción, tanto a nivel mitocondrial como citosólico. Clásicamente, se han establecido dos vías de comunicación entre el núcleo y la mitocondria; anterógrada y retrógrada. El núcleo controla la actividad mitocondrial por la vía anterógrada, la cual promueve o inhibe la biogénesis/mitofagia mitocondrial, normalizando el contenido final de ATP celular según las necesidades metabólicas del momento. La combinación de señales externas, como el ejercicio, la restricción calórica o el frío, junto con señales internas, como el daño en el ADN, pueden modular la actividad de algunos factores de transcripción, tales como PGC1- α , PPARs o NRFs (*Nuclear Respiratory Factor*). Estos inducen cambios en la expresión del proteoma mitocondrial, promoviendo la síntesis de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa codificadas a nivel nuclear. Además, pueden activar la transcripción y traducción de proteínas nucleares encargadas de la replicación, transcripción y traducción mitocondrial, como pueden ser las proteínas relacionadas con la biogénesis ribosomal del organelo. Al mismo tiempo, también pueden impulsar las vías implicadas en la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, especialmente en músculo esquelético y corazón, exhibiendo que estos procesos están condicionados por el tipo de tejido (Quirós et al., 2016). Así, un mismo tipo de alteración en el control de la transcripción y traducción mito-nuclear puede tener un impacto divergente según el tipo celular, tal y como se refleja en poblaciones neuronales distintas con la misma mutación mitocondrial (Apartado 4.8 Introducción).

Por otro lado, desde la mitocondria, el tránsito fluctuante de iones, metabolitos, proteínas o lípidos se utiliza como señales retrogradas al núcleo. Estas señales se

conocen bajo el nombre de mitohormesis y permiten la adaptación celular a distintos fenómenos de estrés, promoviendo cambios transcripcionales en el núcleo (Mottis et al., 2019). Principalmente, el nivel energético derivado de los niveles de ADP/ATP puede activar AMPK, involucrada en procesos como el metabolismo de glucosa y lípidos o en la inhibición de la síntesis proteica y la autofagia por la vía de mTOR (Ke et al., 2018). Asimismo, los niveles de oxígeno son cruciales para la generación de ATP. En condiciones de hipoxia, estos niveles pueden influenciar la función mitocondrial mediante la activación del factor de transcripción HIF1- α en el núcleo. Igualmente, los niveles de ROS pueden también activar múltiples señales de estrés celular (Pamenter, 2014). Los niveles de Ca²⁺ son también un eje central de la señalización celular, dado que la mitocondria, junto con el retículo endoplasmático, es capaz de intercambiar estos iones modulando rápidamente su dinámica y función (Wu et al., 2018). Asimismo, el ratio NADH/NAD⁺ puede activar la desacetilación de ciertos componentes en mitocondria (Canto et al., 2015). Cabe destacar también, que el conjunto de estas moléculas con metabolitos intermedios del ciclo de Krebs y/o niveles distintos de heteroplasmia pueden inducir cambios epigenéticos significativos en el ADNn con un impacto directo en la función del organelo (Matilainen et al., 2017; Kopinski et al., 2019; Wiese and Bannister, 2020).

Por otro lado, la mitocondria también tiene un efecto directo en la proteostasis celular como respuesta al estrés. Un componente importante en esta vía es la fosforilación del factor eIF2 α (factor inicio de elongación traduccional en eucariotas), que puede activarse por niveles elevados de ROS. En estado fosforilado, este componente promueve la inhibición de la síntesis proteica general con la finalidad de activar una cascada transcripcional a través del factor ATF4. Subsecuentemente, esta activación promueve la degradación o síntesis de otras proteínas, por ejemplo, a través de la inducción de chaperonas. Finalmente, cabe mencionar que las respuestas moleculares dirigidas por la coordinación mito-nuclear pueden también convertirse en señales extracelulares de estrés desde la mitocondria (citoquinas o péptidos mitocondriales). En conjunto estos

Introducción

datos manifiestan la gran complejidad de esta comunicación y la relevancia de su investigación, especialmente en casos patológicos (Quirós et al., 2016; Mottis et al., 2019).

Todos estos procesos son el resultado final de la combinatoria e influencia entre la expresión genética nuclear y mitocondrial. Se ha observado que la segregación de ciertos haplotipos mitocondriales está controlada por el núcleo, optimizando la transmisión de polimorfismos del ADNmt beneficiosos para un determinado perfil de expresión nuclear (Wei et al., 2019; Lechuga-Vieco et al., 2020). Por tanto, la especialización de la comunicación mito-nuclear se refleja en los perfiles transcripcionales y, especialmente, traduccionales de cada tipo celular en condiciones fisiológicas, y especialmente, patológicas. Sin embargo, la complejidad de la red molecular de estos mecanismos ha obstaculizado su investigación. Con el fin de superar estas dificultades, las actuales herramientas de secuenciación masiva (RNA-Seq) representan una excelente oportunidad para inferir con gran precisión los cambios transcripcionales que subyacen estas vías (Zhang and Falk, 2014).

6.3. Aproximaciones para el análisis del traductoma mitocondrial con resolución de tipo celular

Como se ha mencionado anteriormente, la investigación del traductoma a nivel de tipo celular específico es especialmente relevante en el caso de enfermedades relacionadas con la deficiencia mitocondrial en el SNC. Un claro ejemplo sería su aplicabilidad en el estudio del perfil traduccional citosólico en las neuronas glutamatérgicas vestibulares por su impacto en el progreso patológico en modelos del SL. Dada la relevancia de la comunicación mito-nuclear en el perfil traduccional de ambos genomas, no se puede obviar ninguno de los dos procesos si se pretende realizar un estudio de los cambios moleculares subyacentes. Es crucial, pues, entender los perfiles de expresión traduccional al completo

(citoplásmico + mitocondrial) para entender las vías patológicas que dirigen la progresión de la enfermedad y exponer potenciales dianas terapéuticas.

En este sentido, con el objetivo de analizar el perfil de expresión génica mitocondrial, clásicamente se han utilizado protocolos basados en el uso de diferentes gradientes de sacarosa o Percoll combinados con centrifugación diferencial para aislar la mitocondria sináptica y no sináptica (Kristian, 2010; Kiss et al., 2016). Estos procesos permiten el aislamiento del organelo funcional manteniendo las condiciones isotónicas. No obstante, requieren de extensas manipulaciones que pueden alterar el perfil metabólico mitocondrial. Alternativamente, otros métodos basados en el aislamiento magnético del organelo han permitido su obtención de un modo más rápido (Chen et al., 2016; Hubbard et al., 2019). Sin embargo, estos métodos suelen utilizarse para estudiar el perfil metabolómico mitocondrial y no para el análisis del transcriptoma. En este sentido, basándose en las aproximaciones para la investigación del perfil ribosomal citoplásmico, se han desarrollado algunas técnicas para analizar el perfil ribosomal mitocondrial. Algunos ejemplos son, en *Saccharomyces cerevisiae* el marcaje con un epítipo FLAG a nivel de mitorribosoma (Couvillion and Churchman, 2017) o el aislamiento por un menor grado de sedimentación de los monosomas mitocondriales en fibroblastos (Rooijers et al., 2013).

Pese al gran valor técnico de estos estudios, estos carecen de la resolución necesaria para realizar un enfoque de tipo celular específico en el SNC. Para ello, la reprogramación celular permite el análisis del perfil traduccional mitocondrial manteniendo la comunicación mito-nuclear (Woods, 2017). No obstante, los protocolos de conversión a iPSC (*Induced pluripotent stem cells*) y, posteriormente, de diferenciación requieren de cambios significativos en el perfil de expresión génica mitocondrial, perturbando el análisis final de los resultados (Xu et al., 2013; Gibson and Thakkar, 2018; Lisowski et al., 2018). Igualmente, el uso de cultivos celulares no permite estudiar la integración de

Introducción

señales celulares no-autónomas, siendo de gran relevancia en el caso del SNC dada la gran heterogeneidad e interacción celular.

Actualmente, a diferencia de la sofisticación de las herramientas citosólicas TRAP, las técnicas para aislar el ARNm asociado a ribosoma mitocondrial *in vivo* a nivel de tipo celular no han sido desarrolladas aún. No obstante, numerosos esfuerzos se han realizado en el desarrollo de técnicas que permiten entender la mitocondria con resolución de tipo celular. Recientemente, se han publicado dos metodologías *in vivo* con gran potencial para aislar la mitocondria de determinados grupos celulares. Estas están basadas en la creación de dos modelos murinos: ratón MITO-tag (Bayraktar et al., 2019) y *MitoTag* (Fecher et al., 2019). El primer modelo expresa una proteína resultante de la unión de la secuencia transmembrana C-terminal de la proteína mitocondrial OMP25 y secuencias con localización en la membrana externa mitocondrial un epítipo de HA, mientras que el segundo expresa una proteína, también con localización en la membrana externa mitocondrial, un marcaje con proteína fluorescente verde GFP. Ambos ratones presentan la expresión de estos epítipos de manera Cre-dependiente en el locus *Rosa26*. Así, la expresión del epítipo en ciertas subpoblaciones permite la inmunoprecipitación de la mitocondria. Principalmente, estos modelos permiten el análisis proteómico y metabolómico *in situ*, de una manera rápida y poco invasiva en cualquier contexto de desarrollo, fisiológico o patológico. En el caso del ratón *MitoTag* se ha demostrado el potencial de esta herramienta en el SNC realizando la comparativa del perfil proteómico mitocondrial en tres tipos neuronales diferentes, incluso diferenciando entre mitocondria somática y terminal. Este estudio ha puesto de manifiesto diferencias significativas en los patrones de expresión molecular del organelo, dependientes del tipo neuronal. Además, el hecho que el epítipo GFP sea una proteína fluorescente ha permitido el estudio de la dinámica y localización mitocondrial *in situ*. De igual modo que para la tecnología TRAP, este tipo de aislamiento mitocondrial se ha adaptado a un vector adenoasociado

(Gella et al., 2020), permitiendo el marcaje mitocondrial en un marco espaciotemporal más delimitado.

A nivel traduccional se ha descrito recientemente la creación de un nuevo modelo murino (MitoRibo-Tag), que expresa de manera constitutiva el epítipo FLAG en el último exón del locus mL62 (proteína ribosomal mitocondrial de la subunidad mayor) (Busch et al., 2019), permitiendo la inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales. Aunque esta aproximación no tiene resolución de tipo celular, este animal se ha utilizado para estudiar el interactoma a nivel proteico del ribosoma mitocondrial murino, aportando nuevos datos en la regulación traduccional mitocondrial de tejidos como corazón, hígado o riñón. El protocolo utilizado en este caso se basa en la concentración de la fracción mitocondrial mediante centrifugación y la inmunoprecipitación posterior del ribosoma mitocondrial. No obstante, el estudio proteómico requiere de una gran cantidad de mitocondria, dificultando su aplicación en el SNC a nivel de tipo celular específico. Asimismo, como se ha comentado anteriormente, manipulaciones extensivas basadas en centrifugaciones sucesivas pueden sesgar los resultados finales. En cualquier caso, a pesar de no ser una estrategia que distinga entre tipos celulares demuestra que es posible aislar el ribosoma mitocondrial en ratón de una manera dirigida. El desarrollo de esta estrategia, en un proceso enfocado a extraer el ARNm asociado a ribosoma con resolución de tipo celular, es una herramienta poderosa para la caracterización del traductoma mitocondrial en poblaciones de interés del SNC.

De esta manera, dada la relevancia de la comunicación mito-nuclear en el traductoma, herramientas que permitan entender las variaciones en el perfil traduccional del organelo en un espacio-tiempo común con el perfil traduccional del citoplasma aportarían una visión completa de los mecanismos moleculares subyacentes a una condición celular determinada, siendo especialmente relevantes en el caso de la deficiencia mitocondrial. Por extensión, la caracterización de los perfiles traduccionales citosólicos y mitocondriales de una

Introducción

misma subpoblación celular puede contribuir significativamente en el desarrollo de terapias efectivas para enfermedades neurodegenerativas, como las patologías mitocondriales (EM_P y EM_S).

Hipótesis y objetivos

La presente tesis doctoral se basa en la hipótesis que la susceptibilidad neuronal observada en el contexto de la deficiencia del complejo I mitocondrial, específicamente en las neuronas GABAérgicas del bulbo olfatorio y las glutamatérgicas vestibulares, se puede explicar por las alteraciones del perfil traduccional citosólico y mitocondrial de cada tipo neuronal. Por tanto, determinar los cambios en el traductoma citosólico y mitocondrial podría ayudar a definir las diferencias moleculares que caracterizan cada tipo neuronal, así como elucidar su contribución en la progresión patológica del SL, lo que puede facilitar el desarrollo de tratamientos eficaces. Para ello, no obstante, se requiere de la generación de herramientas moleculares adecuadas que proporcionen resolución a nivel de tipo celular.

Con el fin de validar dicha hipótesis, los objetivos de este trabajo son:

1. **Caracterizar el perfil traduccional citosólico GABAérgico del bulbo olfatorio y glutamatérgico vestibular en un modelo murino condicional deficiente para la subunidad mitocondrial NDUFS4 en las neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, respectivamente.** Para ello, se utilizará la tecnología RiboTag y secuenciación masiva de transcriptoma completo (RNA-Seq), con la finalidad de elucidar las vías alteradas en cada tipo neuronal que puedan contribuir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del SL.
2. **Desarrollar y validar una tecnología molecular (MitoRiboTag) que permita aislar el perfil traduccional mitocondrial *in vivo* a nivel de tipo celular en tejidos complejos** mediante un vector viral adenoasociado.

3. **Analizar el perfil traduccional mitocondrial glutamatérgico vestibular en un modelo murino deficiente para la subunidad mitocondrial NDUF54 particularmente en las neuronas glutamatérgicas** con el uso de la metodología MitoRiboTag, completando el estudio del perfil traduccional global (núcleo-mitocondria) de las neuronas glutamatérgicas vestibulares, potenciales responsables de la primera causa de muerte en el SL.

Material y métodos

1. Animales

Los ratones utilizados en la presente tesis doctoral, todos en un fondo genético C57Bl6/J obtenido mediante más de veinte retrocruzamientos, han sido estabulados a una temperatura constante de 22°C, humedad relativa de 55±10%, ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a agua y comida (2014 diet, HSD Tekland Inc) *ad libitum*. El sacrificio de todos los ratones se ha realizado por asfixia por CO₂. Todos los procedimientos empleados fueron previamente evaluados, aprobados y autorizados por la Comisión de Ética en la Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y la Generalitat de Catalunya. Se detallan en la Tabla 6 las principales cepas de *Mus musculus* utilizadas para la creación de los distintos ratones control y experimentales.

Tabla 6. Listado de cepas murinas a partir de las cuales se han establecido los ratones transgénicos utilizados en este trabajo. A excepción del ratón *Slc17a6^{iCre}*, que fue generado por el laboratorio del Dr. Ole Kiehn y cedido por el Dr. Richard Palmiter, los demás ratones provienen de *The Jackson Laboratory* (JAX). MGI: *Mouse genome informatics*.

Identificación	Referencia	Nombre cepa
<i>Slc17a6^{iCre}</i> (BAC-Vglut2::Cre)	(Borgius et al., 2010) MGI:4881727	Tg(Slc17a6-icre)10ki
<i>Gad2^{Cre/+}</i> (Gad2-IRES-Cre)	(Taniguchi et al., 2011) MGI:4418713	B6J.Cg-Gad2tm2(cre)Zjh/MwarJ (JAX stock #028867)
<i>Ndufs4^{Δ/+}</i> (1)	(Kruse et al., 2008) MGI:5614215	B6.129S4-Ndufs4tm1.1Rpa/J (JAX stock #027058)
<i>Ndufs4^{ox/ox}</i>	(Kruse et al., 2008) MGI:5613135	B6.129S4-Ndufs4tm1Rpa/J (JAX stock #026963)
<i>Rpl22^{HA/HA}</i>	(Sanz et al., 2009) MGI:4355967	B6N.129-Rpl22tm1.1Psam/J (JAX stock #011029)

(1) Δ = alelo deletado o deficiente

1.1. Genotipado de los ratones transgénicos

El ADN genómico de los ratones anteriormente expuestos se analizó por PCR mediante el kit comercial *Phire Tissue Direct PCR Master Mix* (#15481124, Thermo Scientific), que permite el genotipado de tejido sin previa purificación del ADN. En el momento del destete (P21), se seccionó 3-5 mm de cola de cada

Material y métodos

ratón, el cual se digirió durante 5 minutos en 40 μL de *Dilution Buffer* + 1 μL de *DNA Release Additive* del kit para la liberación del ADN del tejido. A continuación, se finalizó la digestión a 98°C durante 2 minutos. Para el análisis del genotipo de los ratones, se añadió 1 μL de la mezcla de digestión a los componentes de la reacción de PCR de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7. Composición de los reactivos necesarios por cada reacción de PCR para el genotipado según fueran necesarios dos cebadores o tres (*locus Ndufs4*).

Reactivos	Volumen (μL)
<i>Phire Tissue Direct PCR Master Mix</i> (2X)	10
Cebadores (10 μM)	1
H ₂ O	7 (para dos cebadores) 6 (para tres cebadores)
Mezcla de digestión/controles	1
Volumen final	20

Las secuencias de los cebadores utilizados para cada reacción fueron (FOR: *Forward*, REV: *Reverse*):

- **Gad2_CRE_REV** 5'-GAACGCTAGAGCCTGTTTTGCACGTTTC-3'
- **Gad2_CRE_FOR** 5'-GCATTACCGGTCGATGCAACGAGTG-3'
- **Vglut2_iCRE_REV** 5'-GAGATGTCCTTCACTCTGATTC-3'
- **Vglut2_iCRE_FOR** 5'-TCTGATGAAGTCAGGAAGAACC-3'
- **Ndufs4_1060** 5'-AGCCTGTTCTCATACCTCGG-3'
- **Ndufs4_1061** 5'-GTCCTCTATGAGGGTACAGAG-3'
- **Ndufs4_1139** 5'-GGTGCATACTTATACTACTAGTAG-3'
- **Rpl22HA_REV** 5'-TTTCCAGACACAGGCTAAGTACAC-3'
- **Rpl22HA_FOR** 5'-GGGAGGCTTGCTGGATATG-3'

Una vez preparada la reacción de genotipado, la secuencia diana se amplificó de acuerdo con el perfil térmico establecido en la Tabla 8.

Tabla 8. Descripción de las temperaturas de desnaturalización, alineamiento, extensión y del número de ciclos de amplificación para la PCR de genotipado de los locus *Gad2*, *Vglut2*, *Ndufs4* y *Rpl22* (s= segundos, min=minutos).

Locus	Programa PCR
<i>Gad2</i>	95°C 2 min 95°C 10 s 63°C 10 s 72°C 40 s 72°C 5 min 4°C ∞ } 31 ciclos
<i>Vglut2</i>	94°C 3 min 94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 1 min 72°C 5 min 4°C ∞ } 30 ciclos
<i>Ndufs4</i>	98°C 1 min 98°C 5 s 55°C 15 s 72°C 30 s 72°C 5 min 4°C ∞ } 32 ciclos
<i>Rpl22</i>	95°C 2 min 95°C 20 s 57°C 20 s 72°C 30 s 72°C 5 min 4°C ∞ } 30 ciclos

Los productos resultantes de la reacción de PCR se identificaron por electroforesis en un gel de acrilamida incubado con el colorante de ADN *Midori Green* (#B4MG04, Cultek) y visualizado con luz ultravioleta. El gel de acrilamida se compone por un 10% de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1; #100638, Merck Millipore), un 5% de TBE 10X (#BP-1333-4, Fisher Scientific), un 0,75% de una solución de APS al 10% (peso/volumen; #10744171, Fisher Scientific) y un 0,15% de TEMED (#1107320100, Merck Millipore) + H₂O.

Se detallan a continuación el tamaño de los productos de PCR según el alelo amplificado (Figura 14).

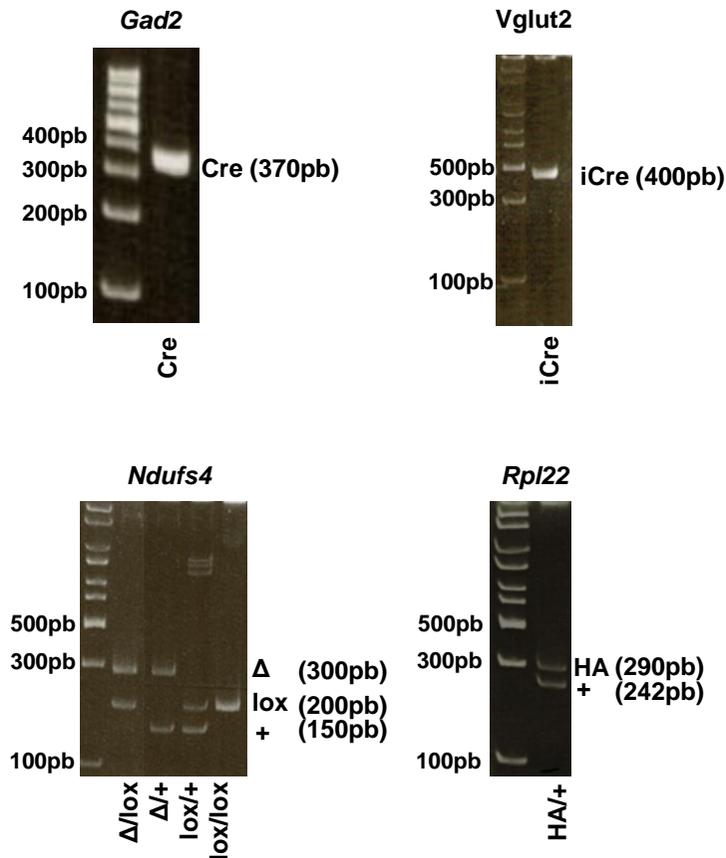


Figura 14. Representación del tamaño del amplicón para Cre, iCre y las modificaciones en los locus de *Ndufs4* y *Rpl22* resultante del genotipado por PCR.

1.2. Ratones con delección condicional de *Ndufs4* en las neuronas glutamatérgicas VGLUT2

Para la obtención de los ratones con deficiencia de la subunidad mitocondrial NDUF54 restringida en las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2) se estableció el cruce murino detallado en la Figura 15. De este cruce se obtuvieron los ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* (control) y *Vglut2:Ndufs4cKO* (experimental). Estos ratones expresan la recombinasa iCre en las neuronas glutamatérgicas VGLUT2 (símbolo del gen: *Slc17a6*). A través del sistema Cre-loxP (Gu et al., 1993; Kim et al., 2018),

el grupo experimental es deficiente para *Ndufs4* únicamente en las neuronas VGLUT2. Por el contrario, el grupo control es heterocigoto para el locus *Ndufs4*.

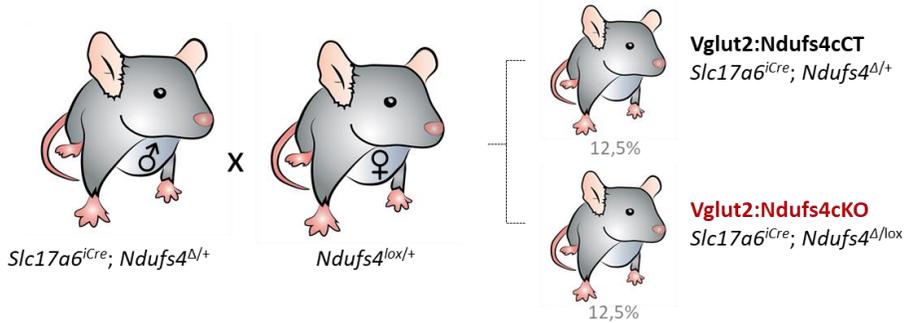


Figura 15. Cruce murino establecido para obtener los ratones control (Vglut2:Ndufs4cCT) y experimentales (Vglut2:Ndufs4cKO) deficientes para la subunidad NDUF54 del complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2).

1.3. Ratones transgénicos para el análisis del traductoma citosólico de tipo celular específico en el contexto de enfermedad mitocondrial

Para determinar el traductoma citosólico de las neuronas glutamatérgicas del núcleo vestibular (NV) y de las neuronas GABAérgicas del bulbo olfatorio (BO), en el contexto del SL, se establecieron dos cruces murinos, indicados en la Figura 16. De estos cruces se generaron los ratones controles Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT. Asimismo, se obtuvieron los ratones experimentales Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO. Estos grupos expresan la recombinasa iCre en las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2) o la recombinasa Cre en las GABAérgicas (GAD2). Basado en el sistema Cre-loxP, los grupos experimentales son deficientes para *Ndufs4* exclusivamente en las neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, mientras que los controles mantienen siempre, como mínimo, un alelo *Ndufs4* salvaje (*wild type*). La combinación mediante cruces del *background* genético *Ndufs4*, con un *background* genético RiboTag (Sanz et al., 2009), donde el alelo *Rpl22*^{HA} se encuentra flojado y expresa la proteína de fusión RPL22·HA bajo la acción específica de la recombinasa Cre, permite el análisis del perfil traduccional citosólico de las neuronas VGLUT2 o

Material y métodos

GAD2 en el contexto de la deficiencia del complejo I mitocondrial, mediante la inmunoprecipitación de los ribosomas citosólicos de estos tipos celulares específicos.



Figura 16. Cruce murino establecido para obtener los ratones control (negro) y experimental (rojo/azul) deficientes para la subunidad NDUFS4 del complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2) o GABAérgicas (GAD2) con marcaje de HA para la subunidad ribosomal citosólica RPL22 (RiboTag).

1.4. Protocolo de supervisión clínica de los ratones experimentales y control

Los ratones condicionales experimentales se mantuvieron en observación diaria con el fin de determinar el momento adecuado para su eutanasia. Para ello, se evaluó su capacidad motora, morfología corporal, estado de hidratación y peso. Al presentar parálisis parcial o total de las patas traseras, ataxia severa, cifosis, signos de deshidratación evidente y/o una disminución del 20% de su peso corporal máximo durante tres días consecutivos se procedió a su eutanasia por asfixia por CO₂. Del mismo modo, se monitorizaron los ratones control con el fin de evitar anomalías independientes a la deficiencia mitocondrial, como la maloclusión dental.

2. Cultivo de células HEK293T

Los cultivos celulares utilizados en esta tesis doctoral se limitan al cultivo de la línea celular inmortalizada de riñón embrionario humano (*Human Embryonic Kidney*; HEK) 293T (ATCC).

2.1. Mantenimiento de las células HEK293T

Las células HEK293T se mantuvieron en matraces de cultivo celular de 75 cm² a 37°C y 5% CO₂ en medio completo DMEM sin piruvato (#41965039, Gibco) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (#10270106, Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina a 10.000 U/mL (#15140122, Gibco). En condiciones estériles, las células fueron transferidas a un nuevo matraz de cultivo celular al alcanzar una confluencia del 80-90% (aproximadamente una vez por semana). Para ello, se realizó un lavado rápido con DPBS 1x (#SH30028.02, HE Healthcare Hyclone) y se añadió 3 mL de una solución de tripsina-EDTA (0,25%; #25200072, Gibco) durante 3 minutos a 37°C y 5% CO₂. Tras este tiempo, las células fueron resuspendidas en medio fresco y transferidas a un nuevo matraz de cultivo a una dilución 1:20. Adicionalmente, entre cada subcultivo se realizó un cambio de medio. Las células HEK293T fueron utilizadas entre los pases 7-20.

2.2. Congelación y descongelación de las células HEK293T

Con el fin de evitar el uso de células en pases elevados, se mantuvo una reserva de HEK293T congelada en nitrógeno líquido a pase 7-9. Para ello, a una confluencia celular del 80-90%, se recolectaron las células en un tubo estéril usando el método de tripsina explicado en el apartado anterior. Estas células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 3 minutos. Después de extraer el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en 5 mL de medio completo DMEM suplementado con 20% de suero bovino fetal. A continuación, se añadió lentamente la misma cantidad de medio con un 20% de suero bovino fetal y un 20% de dimetilsulfóxido o DMSO (#D2650, Merck Millipore). Esta solución fue

Material y métodos

incubada durante 30 minutos para permitir la entrada del crioprotector en las células. Durante este intervalo, se distribuyó 1 mL de la suspensión celular en criotubos estériles que fueron posteriormente mantenidos durante 24 horas a -80°C en un recipiente de congelación (#5100-0001, ThermoFisher Scientific) con isopropanol (#8187661000, Merck Millipore). Finalmente, se transfirieron los distintos viales a un tanque con nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenaje.

Para su descongelación, los criotubos se sumergieron cuidadosamente en un baño a 37°C durante 1 minuto. A continuación, la suspensión celular se transfirió a un matraz de cultivo celular de 75 cm^2 con medio completo DMEM sin piruvato. Al día siguiente, con la finalidad de eliminar el DMSO del cultivo, se realizó un cambio de medio y se siguió con el protocolo de mantenimiento, anteriormente comentado.

3. Extracción tejidos cerebrales: Bulbo olfatorio y núcleo vestibular

Los tejidos cerebrales utilizados en la presente tesis doctoral para el análisis del tractoma se reducen al BO, para las neuronas GABAérgicas (GAD2), y al NV, para las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2). Una vez realizado el sacrificio de los ratones de interés, se extrajo rápidamente el encéfalo, el cual se posicionó de manera ventral en una matriz cerebral con separadores de 1 mm (#69022, Electron Microscopy Sciences) en hielo. A continuación, se realizó la disección de acuerdo con la Figura 17. El tejido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y conservado posteriormente a -80°C hasta su análisis.

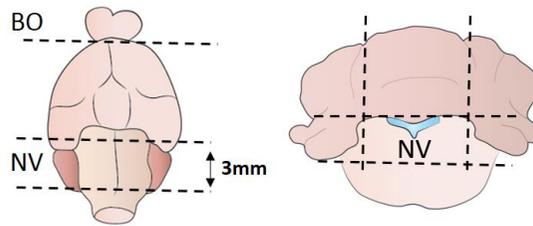


Figura 17. Representación de los cortes realizados (líneas discontinuas) para la extracción del bulbo olfatorio (BO) y del núcleo vestibular (NV). Primero en posición ventral (izquierda) y, en segundo lugar, en posición coronal (derecha).

4. Análisis del traductoma citosólico de tipo celular específico

4.1. Aislamiento del ribosoma citosólico de poblaciones neuronales específicas (tecnología RiboTag)

El BO de los animales Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT y Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO o el NV de los animales Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO fue homogenizado individualmente en 1 mL de tampón de homogenización RiboTag (Tabla 9), quedando a una concentración final de 2-10% peso/volumen. Para ello, se utilizó un homogenizador de vidrio Dounce de 2 mL de capacidad (#D8938-1SET, Sigma Aldrich), disgregando el tejido con 40 golpes mecánicos y consecutivos con una maza suelta (A) y 40 con una maza ajustada (B). Este proceso se realizó siempre manteniendo las muestras en hielo. A continuación, el lisado celular fue centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C, con el fin de obtener un sobrenadante post-mitocondrial. Posteriormente, se retiraron 50 µL del sobrenadante obtenido (*Input*), al que se le añadieron 300 µL de tampón RLT (#74004, Qiagen) con un 10% de β-Mercaptoetanol (#63689, Sigma Aldrich) para la posterior extracción del ARN (ver apartado 4.2 de Material y métodos). El resto del sobrenadante fue incubado con 4 µL de anticuerpo α-HA (#901514, BioLegend) en rotación suave durante 4 horas a 4°C. Posteriormente, se añadieron 200 µL de bolas magnéticas *Pierce Protein A/G magnetic beads* (#88803, ThermoScientific) pre-equilibradas en tampón de homogenización

Material y métodos

RiboTag para completar la inmunoprecipitación de los ribosomas marcados con el anticuerpo α -HA. La captura de los inmunocomplejos se realizó en agitación suave durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, con la ayuda de un soporte magnético (#12320D, Thermo FisherScientific), se retiró cuidadosamente la fracción no conjugada o sobrenadante. A las bolas magnéticas unidas a la muestra de interés se le realizaron tres lavados en agitación media de 10 minutos a 4°C con 800 μ L de tampón de lavado RiboTag (Tabla 10). Una vez retirado el último lavado, se añadió 350 μ L de RLT con un 10% de β -Mercaptoetanol. La muestra fue enérgicamente mezclada con la ayuda de un vórtex durante 30 segundos. Cuidadosamente, se separaron las bolas magnéticas de la muestra inmunoprecipitada (IP). Las muestras *input*, sobrenadante e IP obtenidas fueron mantenidas en hielo, o almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

Tabla 9. Composición del tampón de homogenización para la extracción del traductoma citosólico con la técnica RiboTag para un volumen final de 1 mL. Se indica para cada reactivo su temperatura de almacenamiento y su referencia comercial.

Tampón de homogenización RiboTag	(μL)	Referencia comercial
H ₂ O libre de nucleasas	723	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	95,6	#11332473001, Sigma Aldrich
KCl 1M (4°C)	95,6	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	32	#648311, Merck Millipore
MgCl ₂ 1M (4°C)	11,5	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	20	#C7698, Sigma Aldrich
Inhibidores de proteasas 100x (-20°C)	10	#P8340, Sigma Aldrich
Heparina 100mg/mL (4°C)	10	#H3393-100KU, Sigma Aldrich
RNasin Plus RNase Inhibitor (-20°C)	5	#N2615, Promega
dL-Dithiothreitol (DTT) 1M (-80°C)	1	#646563, Sigma Aldrich

Tabla 10. Composición del tampón de lavado para la extracción del traductoma citosólico por la técnica RiboTag para un volumen final de 5 mL. Se indica para cada reactivo su temperatura de almacenamiento y su referencia comercial.

Tampón lavado RiboTag	(μL)	Referencia comercial
H ₂ O libre de nucleasas	2.670	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	500	#11332473001, Sigma Aldrich
KCl 1M (4°C)	1.500	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	167	#648311, Merck Millipore
MgCl ₂ 1M (4°C)	60	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	100	#C7698, Sigma Aldrich
dL-Dithiothreitol o DTT 1M (-80°C)	2,5	#646563, Sigma Aldrich

Es importante tener en cuenta que para obtener de una manera reproducible el ARN asociado a ribosoma de tipos celulares específicos, el protocolo de extracción aquí expuesto debe seguirse cuidadosamente. En este sentido, las muestras deben ser procesadas siempre del mismo modo (congeladas o directamente procesadas). El tampón de homogenización debe contener cicloheximida (bloquea la traducción), inhibidores de RNasas (evita la degradación del ARNm) y magnesio (mantiene la estructura del ribosoma) para congelar el perfil traduccional *in situ*. Asimismo, el mantenimiento de la muestra en hielo o a 4°C durante su manipulación evita su degradación. Por otro lado, el uso de un detergente permite la solubilización de membranas lipídicas, como las del retículo endoplasmático, evitando la inmunoprecipitación de ARN no deseado. En este sentido, otro paso clave es la unión del anticuerpo con el que se va a aislar la fracción ribosomal de interés. Tal y como se ha descrito, se incubó la muestra con el anticuerpo previamente a añadir las bolas magnéticas que permiten la retención del complejo ribosomal mientras se eluye el sobrenadante en un soporte magnético. Este tipo de unión se conoce como indirecta y ha reportado tener una eficiencia óptima para la inmunoprecipitación del complejo ribosomal final (Heiman et al., 2014; Sanz et al., 2019).

4.2. Extracción, cuantificación y control de calidad del ARN obtenido

El ARN se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante para el *RNeasy Micro* kit (#74004, Qiagen), basado en la precipitación del ARN en columnas de sílice. Cabe tener en cuenta que, previo a la extracción del ARN, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier elemento indeseado que pudiera obturar la columna. Asimismo, como se indica en el protocolo, todas las muestras fueron digeridas con DNasa I para eliminar los restos de ADN genómico. Finalmente, se obtuvieron 12 µL de ARN en H₂O libre de nucleasas en concentraciones variables.

La cuantificación del ARN se realizó siguiendo el protocolo establecido para el *Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit* (#R11490, Invitrogen), mediante interpolación en una curva lineal establecida utilizando estándares de baja concentración con un mínimo de dos replicados por muestra.

La identificación de las especies del ARNr y la integridad del ARN obtenido se determinó con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent) y los chips *Agilent RNA 6000 Nano* (#5067-1511, Agilent) para muestras de ≥ 10 ng/µL o *Agilent RNA 6000 Pico* (#5067-1513, Agilent) para muestras < 10 ng/µL. Aquellas muestras con un RIN (*RNA Integrity Number*) (Schroeder et al., 2006) superior a 7 se consideraron aceptables para su uso posterior (Sheng et al., 2017).

4.3. Preparación de las librerías para la secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq)

Las librerías de secuenciación para el análisis del traductoma citosólico GABAérgico y glutamatérgico se prepararon con los kits comerciales *NEBNext Poly(A) mRNA magnetic isolation module* (#E7490S, New England BioLabs) y *NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina* (#E7765S, New England BioLabs) con los índices del kit *NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Set 1* (#E7335, New England BioLabs). Para el estudio de la población VGLUT2 se

seleccionaron 3 machos *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* y 2 machos y una hembra *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* a P50. Asimismo, se seleccionaron tres machos para cada grupo analizado a P100 con el fin de analizar los cambios moleculares en distintas etapas de la patología. Para el grupo GABAérgico, se analizaron únicamente tres machos tanto para el grupo control como para el grupo experimental a P50. Para la preparación de las librerías de secuenciación, se siguieron en todo momento las instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de 50 ng iniciales de ARN total de los distintos *inputs* e IPs, se realizó la selección por colas Poli(A) con el fin de aislar los ARNm y evitar secuenciar el ARNr. A continuación, se realizó una fragmentación química del ARNm con magnesio durante 15 minutos a 94°C para obtener fragmentos de a 200 nucleótidos, el cebado aleatorio (*random priming*); la síntesis del ADN complementario (primera y segunda cadena); la ligación de los adaptadores (dilución 1:80); y la selección de la cadena original (*stranded*). Después, se unieron los índices con los que se identificarían las distintas muestras posteriormente. Finalmente, las muestras fueron amplificadas en 15 ciclos de PCR. La calidad y tamaño de las librerías obtenidas se analizó con el equipo Bioanalyzer 2100 y los chips *DNA 1000 kit* (#5067-1504, Agilent) dando un tamaño final de ~300 pb, sin dímeros de adaptadores ni otros subproductos indeseados.

4.4. Secuenciación masiva del transcriptoma, RNA-Seq

Las librerías anteriormente preparadas fueron secuenciadas mediante el equipo de Illumina NextSeq500 (EMBL, Heidelberg), obteniendo una cobertura media de $\sim 30 \times 10^6$ de *reads* por muestra. Cada fragmento se secuenció bidireccionalmente en 2 x 75 pb. El centro de secuenciación EMBL proporcionó los archivos “.fastq” para cada muestra de manera individualizada.

4.5. Análisis bioinformático de los datos de RNA-Seq

Los archivos obtenidos (".fastq") fueron analizados mediante la herramienta *FastQC* (versión: fastqc_v0.11.8, Andrews, 2010) con el fin de determinar la calidad por base de la secuenciación. A continuación, se extrajeron las secuencias desde la base 7 a la 77, con el fin de eliminar los índices utilizados para identificar cada muestra durante la secuenciación y las bases de calidad subóptima. Para ello se empleó la herramienta *FastX trimmer* (versión: fastx_toolkit_0.0.13, (Hannon, 2010)). Seguidamente, se realizó el alineamiento con el genoma murino de referencia *Mus_musculus.GRCm38.dna.primary_assembly.fa* y las anotaciones *Mus_musculus.GRCm38.95.gtf* de *Ensembl* (Cunningham et al., 2019) con la herramienta bioinformática STAR (versión: STAR-2.6.0a, Dobin et al., 2013), dejando los parámetros por defecto. Finalmente, se realizó el conteo de *reads* por gen mediante el programa *HTSeq_count* del paquete MiniConda (versión: 2.0, Anders et al., 2015) con una calidad mínima de alineamiento de 4 (-a). La realización de las actividades comentadas hasta este punto se basó en el sistema operativo Ubuntu (Sobell, 2014).

Una vez finalizado el conteo de los *reads* por gen se procedió a realizar el análisis de expresión diferencial. Para ello, se usó el paquete estadístico de Bioconductor DESeq2 (versión: DESeq2_1.22.2, Love et al., 2014), realizando un análisis de expresión diferencial a través del software R (versión: 3.6.3, R Core Team, 2020). Los transcritos diferencialmente asociados al ribosoma (DAR) comparativamente al grupo control de las muestras IP o diferencialmente expresados (DE) en las muestras *input* de los ensayos RiboTag se identificaron con un cambio relativo o *Fold Change* (FC) superior a 1 y con una significación estadística inferior al 5%. Para el paquete estadístico DESeq2, este valor se refiere como $padj < 0,05$. En este sentido, el paquete DESeq2 ha reportado tener resultados similares, a nivel de identificación de transcritos con expresión diferencial, con otros paquetes estadísticos usualmente utilizados, como EdgeR (Robinson et al., 2010). Sin embargo, DESeq2, en comparativa parece ser más

estricto respecto al FDR (*False Discovery Rate*) calculado (Conesa et al., 2016), ofreciendo un listado de transcritos DAR o DE robusto.

A nivel gráfico, el análisis de componentes principales (PCA) se realizó a través de la función `plotPCA` del propio paquete estadístico DESeq2. Los distintos *Volcano plot* se realizaron con el paquete `ggplot2` para R (versión: 3.3.0, Wickham et al., 2016), a través de los valores *padj* en escala \log_{10} y el cambio relativo en escala \log_2 (*Log2FoldChange*). Los *Heatmap* se crearon a partir de los transcritos DAR. La distancia jerárquica de cada transcrito DAR por muestra se obtuvo de la variación de cada muestra transformada en escala logarítmica (\log_2) (*Z-score*). Estos valores se agruparon según la metodología de similitud de distancia euclídeana (Datta and Nettleton, 2014). Para ello, se utilizó el paquete `pheatmap` para R (versión: 1.0.12, Kolde, 2019). Las matrices de correlación (*Spearman* o *Pearson*) fueron calculadas y visualizadas con el programa GraphPad Prism 6.0 (La Jolla California, USA). Finalmente, la realización del análisis de ontología génica (GO) para la integración de los datos y el análisis de la relevancia biológica de estos se basó en la aplicación ClueGO (versión: 2.5.6, Bindea et al., 2009) de la herramienta Cytoscape (versión: 3.7.2, Shannon et al., 2003). Se analizaron los grupos funcionales de Proceso biológico, Componente celular y Función molecular en conjunto con una significación de $p < 0,05$. Además, se seleccionó la opción "GO Term Fusion" con el fin de evitar términos redundantes en el resultado final. Esta herramienta permite la integración de los transcritos DAR o DE incrementados o reducidos, pudiendo diferenciar el tipo de asociación o expresión. Alternativamente, para la visualización de los términos GO por enriquecimiento y significación también se utilizó la herramienta *online* WebGestalt (Zhang et al., 2005; Liao et al., 2019). Por otro lado, con el fin de identificar la red reguladora transcripcional subyacente a un listado de transcritos DAR se utilizó la herramienta iRegulon (Janky et al., 2014) en la misma aplicación Cytoscape.

5. Obtención del traductoma mitocondrial de tipo celular específico en tejidos complejos con la herramienta MitoRiboTag

5.1. Diseño del plásmido MitoRiboTag

Con el fin de producir un vector viral adenoasociado con expresión Cre-dependiente capaz de inmunoprecipitar los ribosomas mitocondriales de tipos celulares específicos, se diseñó un plásmido basado en la tecnología *Double-flaxed inverted open reading frame* (DIO), el cual contiene el gen de interés invertido entre dos secuencias lox incompatibles (loxP y lox2722) (Sohal et al., 2009). Se clonó un fragmento NheI/AscI con la secuencia codificante del gen murino *Mrpl44* fusionada a la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente eYFP en el plásmido pAAV-EF1a-DIO-WPRE-hGH poli(A), con el fin de obtener el constructo final pAAV1-EF1a-DIO-Mrpl44-eYFP-WPRE-hGH poli(A). La fusión entre *Mrpl44* y eYFP se realizó modificando el codón terminal de *Mrpl44* por la secuencia glicina (G)-Serina (S)-Alanina (A)-Serina (S)- Alanina (A)-Treonina (T).

5.2. Producción del vector viral adenoasociado AAV-DIO-MitoRiboTag

Los vectores virales derivados de los virus adenoasociados (AAV) fueron producidos mediante un sistema de co-transfección del plásmido pAAV1-EF1a-DIO-Mrpl44-eYFP-WPRE-hGH poli(A), flanqueado por las secuencias ITR (*Inverted Terminal Repeats*), y del plásmido pDP1rs (#PF401, Plasmid Factory), produciendo el vector viral final AAV-DIO-MitoRiboTag. Este último plásmido codifica tanto para los genes necesarios para el ciclo replicativo y de la cápside (*rep* y *cap*), como para los genes *helper* de adenovirus necesarios para la replicación del AAV (E4, E2a y VARNA). En concreto, el diseño del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag presenta el serotipo AAV1. Este sistema permite la encapsidación únicamente de la secuencia flanqueada por los extremos ITR, impidiendo la encapsidación de la maquinaria replicativa e integrativa del AAV *wild type* (Quintana et al., 2012b).

Para llevar a cabo la producción del vector AAV, se utilizó la línea celular HEK293T. Se sembraron aproximadamente 50 placas de 100 mm de diámetro a una densidad de $3,7 \times 10^6$ células/placa. Al día siguiente, se realizó la transfección con fosfato de calcio, añadiendo gota a gota 800 μL de la solución de transfección (Tabla 11). Aproximadamente, 12-16 horas después se realizó un cambio de medio (Sección 2.1 de Material y métodos), añadiendo un 1% de glutamina (#11500626, Gibco) y retirando el suero bovino fetal. Al quinto día desde el comienzo, se recogieron las células en un total de 120-150 mL de medio. A continuación, con el fin de liberar las partículas virales, se congelaron las células en un baño de alcohol y hielo seco; se descongelaron en un baño a 37°C ; y se aplicó un vórtex intenso. Esta secuencia se repitió un total de 4 veces. Finalmente, el lisado celular fue centrifugado a 2.000 rpm durante 30 minutos.

Tabla 11. La solución de transfección, compuesta por la solución de ADN y la solución HEPES, se obtuvo añadiendo gota a gota en agitación constante la solución de ADN en la solución HEPES. Se detallan las concentraciones de cada componente para un volumen final de 800 μL . Si no se indica lo contrario el disolvente siempre fue H_2O .

Solución ADN	Volumen/Cantidad
2 M CaCl_2	50 μL
Plásmido de interés	10 μg
Plásmido pDP1rs	20 μg
H_2O	Hasta 400 μL
Solución HEPES	Volumen/Cantidad
2xHBS (280 mM NaCl + 50 mM HEPES, $\text{pH}=7,05$)	396 μL
Solución fosfato (49,5 mM NaH_2PO_4 + 100,5 mM Na_2HPO_4)	4 μL

El sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 25.000 rpm durante 17 horas a 4°C en 15 mL de una solución de sacarosa al 40% en DPBS 1x. Al día siguiente, el precipitado se reconstituyó en 5 mL de una solución de CsCl a una densidad de 1,37 g/mL. De nuevo, esta solución se ultracentrifugó a 41.000 rpm durante 17 horas a 4°C . Una vez finalizada la ultracentrifugación, la solución se dializó (#66810, FisherScientific) durante 3 horas en 1,5 L de HBSS 1x (#14175095, Gibco) a 4°C . A continuación, se reemplazó la solución de HBSS 1x por solución

Material y métodos

fresca y se dejó en agitación toda la noche a 4°C. El producto dializado se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue ultracentrifugado en 15 mL de una solución de sacarosa al 40% en DPBS 1x, permitiendo recuperar la fracción conteniente del AAV-DIO-MitoRiboTag en el precipitado, que fue resuspendido en HBSS 1x a una titulación de 2×10^9 genomas virales/ μ L.

5.3. Transducción del AAV-DIO-MitoRiboTag en cultivo celular

La caracterización de la expresión del AAV-DIO-MitoRiboTag se realizó en un cultivo de células HEK293T. En una placa de 6 pocillos se sembraron 200.000 células. Al día siguiente, se transdujeron con 4 μ L de AAV-DIO-MitoRiboTag (2×10^9 genomas virales/ μ L) y 4 μ L de AAV-Cre (4×10^8 genomas virales/ μ L). Este último vector viral codifica para la recombinasa Cre y proviene del AAV-CreEGFP descrito en (Quintana et al., 2012b), al cual se le eliminó la secuencia codificante para la proteína EGFP. Tras cuatro días de expresión, la transducción se pudo confirmar mediante la visualización de la proteína fluorescente eYFP, resultante de la expresión de la proteína de fusión MRPL44-eYFP.

5.4. Administración intracerebral del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag *in vivo*

Una cohorte de ratones Vglut2:Ndufs4cKO (n=12) y Vglut2:Ndufs4cCT (n=28) fueron anestesiados mediante isoflurano (5% inducción, 1,5-0,75% mantenimiento). En condiciones asépticas, fueron colocados en el robot estereotáxico (Neurostar) equipado con una manta térmica. Durante todo el proceso se comprobó de manera constante el reflejo nociceptivo y la frecuencia respiratoria del animal. Se aplicó gel ocular protector (#682542.6, Bausch+Lomb) y se administró de manera subcutánea Ketoprofeno como analgésico (5 mg/kg, Sanofi-Aventis). A continuación, se inyectó el vector AAV-

DIO-MitoRiboTag de manera bilateral (0,5µL/lado, 2×10^8 genomas virales/µL) en el NV [AP: -5,7 mm; LM: ± 1 mm; DV: -4,6 mm aplicando el factor de corrección (*Bregma-Lambda*)/4,21 establecido por el Atlas murino de Franklin and Paxinos, 2007)]. Para ello, se utilizó una jeringa Hamilton de 5 µL (#7634-01) con una aguja roma de 32 G (#7803-04). La infusión se llevó a cabo a una velocidad constante de 0,25 µL/minuto. Tras un reposo de 4 minutos, se extrajo lentamente la aguja a una velocidad media de 1 mm/minuto. Finalizada la cirugía, se monitorizó el animal hasta su completa recuperación y se mantuvieron un mínimo de 16 días para garantizar la expresión del vector viral.

5.5. Inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales de las neuronas glutamatérgicas vestibulares (metodología MitoRiboTag)

Las células HEK293T transducidas con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag fueron lavadas con DPBS 1x y homogenizadas con 600 µL/2 pocillos (placa de 6 pocillos) de tampón de homogenización MitoRiboTag (Tabla 12). Alternativamente, el NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* y *Vglut2:Ndufs4cKO*, transducidos previamente con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag, se homogenizó en este mismo tampón de homogenización a una concentración final de dos NV (~50 mg)/mL de tampón. El número de NV utilizados en cada experimento se indica en el apartado de resultados. Asimismo, en determinados casos, detallados en resultados, se incluyó el inhibidor de la traducción mitocondrial cloranfenicol a una concentración final de 100 µg/mL (#10368030, Fisher Scientific) y/o el detergente digitonina a una concentración final de 0,5% (peso/volumen) (#D141, Sigma Aldrich) en el tampón de homogenización.

Tabla 12. Composición del tampón de homogenización MitoRiboTag. Se detallan los distintos reactivos para un volumen total de 1 mL. Cabe tener en cuenta que en determinados casos se pudo incluir digitonina o cloranfenicol, substrayendo la parte proporcional al volumen de H₂O.

Tampón de homogenización MitoRiboTag	(μ L)	Referencia comercial
H ₂ O libre de nucleasas	723	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	95,6	#11332473001, Roche
KCl 1M (4°C)	95,6	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	32	#648311, Merck Millipore
MgCl ₂ 1M (4°C)	11,5	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	20	#C7698, Sigma Aldrich
Inhibidores de proteasas 100x (-20°C)	10	#P8340, Sigma Aldrich
Heparina 100mg/mL (4°C)	10	#H3393-100KU, Sigma Aldrich
RNasin Plus RNase Inhibitor (-20°C)	5	#N2615, Promega
dL-Dithiothreitol DTT 1M (-80°C)	1	#646563, Sigma Aldrich

Tanto en cultivo celular como en tejido, se realizó la homogenización utilizando un homogenizador de vidrio tipo Dounce de 2 mL de capacidad (#D8938-1SET, Sigma Aldrich), disgregando la muestra con 40 golpes mecánicos y consecutivos con la maja suelta (A) y 40 con la maja ajustada (B). Adicionalmente, en caso de aplicar digitonina y/o cloranfenicol, el lisado fue incubado en agitación suave durante 15 minutos a 4°C, aplicando posteriormente 20 golpes más con la maja (B). Consecutivamente, la muestra fue centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante resultante se separaron 50 μ L como *input*, que fueron resuspendidos en 300 μ L de solución RLT (#74004, Qiagen) suplementada con un 10% de β -Mercaptoetanol para la posterior extracción del ARN (Sección 4.2 de Material y métodos). El resto del sobrenadante fue incubado con 3 μ L de anticuerpo α -GFP (#ab290, Abcam) en rotación suave durante 4 horas a 4°C. Después, se añadieron 30 μ L de bolas magnéticas con proteína A/G (#88803, Thermo Scientific) pre-equilibradas en tampón de homogenización MitoRiboTag. Este lisado se incubó durante toda la noche en agitación lenta a 4°C. A la mañana siguiente, con la ayuda de un soporte magnético (#12320D, Thermo Fisher Scientific) se retiró el sobrenadante y las bolas magnéticas unidas a los ribosomas mitocondriales de interés fueron lavadas en agitación suave 3

veces durante 10 minutos a 4°C con 800 µL de solución de lavado MitoRiboTag (Tabla 13). En caso de haber añadido digitonina en el homogenado inicial, durante estos últimos lavados se incluyó un 0,1% (peso/volumen) de digitonina. Finalmente, después de retirar el último lavado con la ayuda del soporte magnético, se resuspendieron las bolas magnéticas en 350 µL de solución RLT suplementada con un 10% de β-Mercaptoetanol. Este homogenado fue mezclado vigorosamente con la ayuda de un vórtex durante 30 segundos, permitiendo la separación de los ribosomas mitocondriales de interés de las bolas magnéticas (fracción inmunoprecipitada o IP). Los *inputs*, sobrenadantes e IPs obtenidos fueron mantenidas en hielo o a -80°C (para su almacenamiento a largo plazo) hasta su posterior uso (Apartado 4.2. de Material y métodos).

Tabla 13. Solución de lavado MitoRiboTag. Se detallan los distintos reactivos para un volumen total de 5 mL. En ciertos casos también se añadió digitonina con una concentración final de 0,1% (peso/volumen).

Tampón lavado MitoRiboTag	(µL)	Referencia
H ₂ O libre de nucleasas	2.670	#46-000-CM, Corning
Nonidet P40 Substitute 10% (4°C)	500	#11332473001, Roche
KCl 1M (4°C)	1.500	#P9541, Sigma Aldrich
Tris 1.5M, pH = 7,4 (4°C)	167	#648311, Merck Millipore
MgCl ₂ 1M (4°C)	60	#63068, Sigma Aldrich
Cicloheximida 5mg/mL (-20°C)	100	#C7698, Sigma Aldrich
dL-Dithiothreitol DTT 1M (-80°C)	2,5	#646563, Sigma Aldrich

6. Análisis de expresión génica diferencial

La cuantificación de la expresión de los distintos transcritos (ARNm) se realizó mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa o retrotranscripción (qRT-PCR). Para ello, se utilizaron los kits comerciales *Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit* (#4389986, Applied Biosystems) o *TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit* (#4392938, Applied Biosystems), según si se usó el agente fluorescente intercalante SYBR Green o sondas específicas TaqMan. Los ciclos de amplificación, el tiempo y temperatura de cada reacción se mantuvieron de acuerdo con lo recomendado por la casa comercial. Mediante el método de curva

Material y métodos

estándar (Sanz et al., 2015), se determinó la cantidad relativa de cada transcrito, que posteriormente, se normalizó por la cantidad relativa del gen de referencia *Actb* o *Gapdh*. Para cada reacción, se determinó la eficiencia de amplificación con el software *AriaMx Real-time PCR System* (Agilent), considerando aceptables eficiencias entre 80-120%, y con una correlación de la curva estándar (r^2) $\geq 0,9$. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (*non-template control*, NTC) y, tanto las muestras estándar, las experimentales, como las NTC, se analizaron por duplicado. Para cantidades inferiores a 1 ng/ μ L de ARN se utilizó como diluyente H₂O con ARNt de levadura (10 μ g/mL, #AM7119, Invitrogen) con el fin de ayudar a recuperar o mantener la cantidad deseada de ARN final de cada muestra. Se detallan a continuación la composición de las reacciones de cada qRT-PCR (Tabla 14).

Tabla 14. Composición de la reacción de qRT-PCR por muestra para la reacción TaqMan y SYBR Green.

Reacción TaqMan	(μL)	Reacción SYBR	(μL)
TaqMan RT Enzyme Mix (40x)	0,5	RT Enzyme Mix (125x)	0,16
TaqMan RT-PCR Mix (2x)	10	RT-PCR Mix (2x)	10
Sonda Taqman	1	Cebador FOR/REV (10 μ M)	0,4/0,4
H ₂ O libre de nucleasas	7,5	H ₂ O libre de nucleasas	1
ARN estándar/desconocido	1	ARN estándar/desconocido	1
Volumen final	20	Volumen final	20

Se listan a continuación (Tabla 15) las secuencias de los cebadores y las sondas TaqMan utilizadas para el análisis de expresión génica según lo expuesto.

Tabla 15. Listado de sondas TaqMan y cebadores para SYBR utilizados para el análisis de expresión génica. Las sondas TaqMan pertenecen a la casa comercial Thermo Scientific y los cebadores SYBR, a no ser que se indique lo contrario, se obtuvieron de Primer Bank (Spandidos et al., 2010) o se diseñaron a través de Primer Express (Thermo Fisher Scientific).

Sondas TaqMan		
Sonda	Referencia	Especie
<i>MTND2</i>	Hs02596874_g1	Homo sapiens
<i>MTATP6</i>	Hs02596862_g1	Homo sapiens
<i>Nd1</i>	Mm04225274_s1	Mus musculus
<i>Nd2</i>	Mm04225288_s1	Mus musculus
<i>Nd3</i>	Mm04225292_g1	Mus musculus
<i>Nd4/Nd4L</i>	Mm04225294_s1	Mus musculus
<i>Nd5/Nd6</i>	Mm04225315_s1	Mus musculus
<i>Cytb</i>	Mm04225271_g1	Mus musculus
<i>Cox1</i>	Mm04225243_g1	Mus musculus
<i>Cox2</i>	Mm03294838_g1	Mus musculus
<i>Cox3</i>	Mm04225261_g1	Mus musculus
<i>Atp6</i>	Mm03649417_g1	Mus musculus
<i>Atp8</i>	Mm04225236_g1	Mus musculus
<i>Gad2</i>	Mm00484623_m1	Mus musculus
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	Mus musculus
<i>Cnp</i>	Mm01306641_m1	Mus musculus
<i>Rpl41</i>	Mm02524711_g1	Mus musculus
Cebadores SYBR		
Cebador	Secuencia	Especie
ACTB_FOR	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	Homo sapiens
ACTB_REV	5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'	Homo sapiens
Actb_FOR	5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTA-3'	Mus musculus
Actb_REV	5'-GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT-3'	Mus musculus
Ndufs4_FOR	5'-TCGCTGAGACAGGGCGATGTT-3'	Mus musculus
Ndufs4_REV	5'-TGTGTGTCCCAGTCTGGTT-3'	Mus musculus
Slc17a6_FOR ¹	5'-AGAGAGCGCAAATCTGCTAGGT-3'	Mus musculus
Slc17a6_REV ¹	5'-GCGTAGACGGGCATGGAT-3'	Mus musculus
Rpl37_REV	5'-TGGCACTCCAGTTATACTTCCT-3'	Mus musculus
Rpl37_FOR	5'-CATCCTTTGGTAAGCGTCGCA-3'	Mus musculus
Rpl28_REV	5'-GTTTTTCGCTGACCGGATCTG-3'	Mus musculus
Rpl28_FOR	5'-GTACAGCACGGAGCCAAATAA-3'	Mus musculus
Cx3cr1_REV	5'-CAGACCGAACGTGAAGACGAG-3'	Mus musculus
Cx3cr1_FOR	5'-GAGTATGACGATTCTGCTGAGG-3'	Mus musculus
Gfap_REV	5'-AGGGAGTGGAGGAGTCATTTCG-3'	Mus musculus
Gfap_FOR	5'-CGGAGACGCATCACCTCTG-3'	Mus musculus
Vipr1_REV	5'-TAGCCGTGAATGGGGGAAAC-3'	Mus musculus

Continuación cebadores SYBR		
Cebador	Secuencia	Especie
Vipr1_FOR	5'-GATGTGGGACAACCTCACCTG-3'	Mus musculus
Vipr2_REV	5'-CAGCTCTGCACATTTTGTCTCT-3'	Mus musculus
Vipr2_FOR	5'-GACCTGCTACTGCTGGTTG-3'	Mus musculus
Adcyap1r1_REV	5'-AGCCGTAGAGTAATGGTGGATAG-3'	Mus musculus
Adcyap1r1_FOR	5'-CTGCGTGCAGAAATGCTACTG-3'	Mus musculus
Adcyap1_REV	5'-CTGGTCGTAAGCCTCGTCT-3'	Mus musculus
Adcyap1_FOR	5'-ACCATGTGTAGCGGAGCAAG-3'	Mus musculus
Sst_REV	5'-TTGCTGGGTTTCGAGTTGGC-3'	Mus musculus
Sst_FOR	5'-ACCGGGAAACAGGAAGTGG-3'	Mus musculus
Npy_REV	5'-CTCCGCTCTGCGACACTAC-3'	Mus musculus
Npy_FOR	5'-AGGGTCTTCAAGCCTTGTCT-3'	Mus musculus
Slc17a7_REV	5'-CAAAAGTTCGCAACGATGATGG-3'	Mus musculus
Slc17a7_FOR	5'-GAGCGCAAATACATTGAGGATGC-3'	Mus musculus
WPRE_REV	5'-GTCCTTTCCATGGCTGCTC-3'	Woodchuck Hepatitis Virus/ Titulación AAV
WPRE_FOR	5'-CCGAAGGGACGTAGCAGA-3'	Woodchuck Hepatitis Virus/ Titulación AAV

¹Cebadores de Padilla et al., 2016.

7. Western blot

Con el fin de analizar los niveles proteicos, las muestras fueron homogenizadas en *SDS Sample buffer* [62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (#648311 y #109063, Merck Millipore), 2% SDS (#BP166, FisherScientific), 10% glicerol (#G7757, Sigma Aldrich)]. Para el análisis de muestras *in vitro* se utilizaron 200 µL de *SDS Sample buffer* por cada pocillo (placa de 6 pocillos) y para la homogenización de un NV se utilizaron 100 µL. Ambos tipos de muestra fueron homogenizadas a velocidad media, mediante un equipo Polytron (#10283722, Kinematica). La cantidad de proteína en cada muestra se determinó mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA), utilizando el *Pierce BCA Protein Assay kit* (#23225, Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la cuantificación, se añadió al *SDS sample buffer* DTT (#646563, Sigma Aldrich) y azul de bromofenol (#B5525, Sigma Aldrich) a una concentración final de 50 mM

y 0,1%, respectivamente, y se igualaron las cantidades de proteína de las muestras (10-25 µg). Posteriormente a una desnaturalización de 3 minutos a 98°C, las muestras se separaron por electroforesis en un gel de gradiente de acrilamida (4-20%; #4561096, BioRad). A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana semihúmeda de nitrocelulosa. Para ello, se siguieron las instrucciones del kit comercial *Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit* (#1704270, BioRad) y se usó el equipo *Trans-Blot Turbo Transfer System* de BioRad con el programa *HIGH MW* (1,3A, 25V, 10 minutos). A continuación, se comprobó la eficiencia de la transferencia mediante una tinción con una solución de Ponceau S (#P7170, Sigma Aldrich) durante 5 minutos, que se retiró con un lavado con el tampón TBST [TBS(1x) (#28358, Thermo Scientific) con 0,1% de Tween-20 (#11417160, Fisher Scientific)]. Subsecuentemente, la membrana se bloqueó en agitación media durante 1 hora en una solución de 5% de leche desnatada en polvo en TBST. Después, se realizó la incubación del anticuerpo primario en agitación suave durante toda la noche a 4°C (Tabla 16). A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados con TBST en agitación media durante 5 minutos. A continuación, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario de elección (Tabla 16) y se realizaron 3 lavados finales de 5 minutos en agitación media con TBST. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en TBST). Finalmente, los niveles de las proteínas de interés fueron determinados utilizando diferentes sustratos quimio luminiscentes en función de la señal esperada. El kit *SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (#34577, Thermo Scientific) se utilizó para señales de intensidad media-alta y el kit *SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate* (#10445345, Thermo Scientific) en casos de señal de baja intensidad. La señal se adquirió digitalmente utilizando el equipo C-Digit Blot Scanner (Licor). La intensidad de las bandas de la proteína de interés fue determinada mediante el programa ImageJ (versión 1.52, Schindelin et al., 2012). Los niveles

Material y métodos

de las proteínas analizadas fueron siempre normalizados por los niveles de una proteína control (β -Actina o S6).

Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de expresión proteica.

Anticuerpo primario		
Anticuerpo primario	Dilución	Referencia
Anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser ^{235/236}) (D57.2.2E) XP (Rabbit)	1:1.000	#4858S Cell signalling
Anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser ^{240/244}) (D68F8) XP (Rabbit)	1:1.000	#5364T Cell signalling
Anti-S6 Ribosomal Protein (5G10) (Rabbit)	1:1.000	#2217S Cell signalling
Anti-HA (SG77) (Rabbit)	1:1.000	#71-5500 Thermo Fisher Scientific
Anti-MRPL44 (Goat)	1:1.000	#sc-103631 Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP (Rabbit)	1:5.000	#sc-8334 Santa Cruz Biotechnology
Anti- β -Actin (Mouse)	1:10.000	#A1978 Sigma Aldrich
Anticuerpo secundario		
Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:10.000	#111-035-003 Jackson Immuno Research
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:10.000	#115-035-003 Jackson Immuno Research
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	1:10.000	#705-035-003 Jackson Immuno Research

Cabe mencionar que el análisis de proteínas de tipos neuronales genéticamente definidos se realizó a partir de muestras obtenidas siguiendo el protocolo de inmunoprecipitación RiboTag o MitoRiboTag. En ese caso, en vez de resuspender las muestras en el tampón RLT, se resuspendieron en 50 μ L de *SDS Sample buffer*. A partir de este punto, se siguió el protocolo detallado anteriormente. Por otro lado, para el análisis de las proteínas ribosomales pS6 y S6, se añadió al tampón de homogenización inicial un cóctel de inhibidores de fosfatasas a la concentración indicada por el fabricante (#4906845001, Roche).

8. Inmunofluorescencia

El protocolo de inmunofluorescencia se realizó tanto en muestras de cultivos celulares, como de tejido. En primer lugar, las células HEK293T fueron sembradas a una densidad de 100.000 células/mL sobre un cubreobjetos en una placa de 24 pocillos. Antes de empezar la inmunofluorescencia se realizó un lavado con DPBS 1x (#SH30028.02, HE Healthcare Hyclone) y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% (4% PFA; #1004965000, Merck Millipore) durante 10 minutos, seguido de 3 lavados más con DPBS 1x. Por otro lado, los encéfalos murinos, inmediatamente después de la eutanasia, fueron fijados en 4% PFA durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron durante 48 horas en una solución de sacarosa (#84097, Sigma Aldrich) al 30% en PBS 1x (#524650-1EA, Sigma Aldrich) a 4°C. Finalmente, fueron congelados en hielo seco y seccionados coronalmente a 30 µm con criostato. Las distintas secciones fueron conservadas en solución anti-congelación, compuesta por un 40% de etilenglicol (#102466, Sigma Aldrich), un 30% de glicerol (#G7757, Sigma Aldrich) y un 30% de tampón de fosfato (0,1M, pH=7,2-7,4).

Una vez preparadas las muestras se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación con una solución de PBST [PBS1x con un 0,2% de Triton X-100 (#648466, Sigma Aldrich)]. A continuación, la muestra se bloqueó durante 1 hora en agitación lenta en PBST con un 10% de NDS (*Normal Donkey Serum*, #JAC-017-000-121, Jackson ImmunoResearch). Seguidamente, se realizó la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación suave a 4°C. El anticuerpo primario fue diluido según la Tabla 17 en PBST con un 1% de NDS. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados en agitación media de 5 minutos con PBST para retirar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación suave. El anticuerpo secundario se preparó igualmente en PBST con un 1% de NDS como se indica en la Tabla 17. Finalmente, se realizaron dos lavados más de 5 minutos en agitación media con PBST y un último lavado con PBS 1x. Tanto las células,

Material y métodos

como los cortes en flotación, fueron colocados sobre un portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount G con DAPI (#17984-24, Electron Microscopy Sciences). Después de 24 horas fueron analizados por microscopia con el equipo de epifluorescencia Nikon Eclipse 90i o por rastreo de láser confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes fueron finalmente analizadas con el programa ImageJ (versión: 1.52, Schindelin et al., 2012).

Tabla 17. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario		
Anticuerpo primario	Dilución	Referencia
Anti-HA (SG77) (Rabbit)	1:500	#71-5500 ThermoFisherScientific
Anti-HA.11 (Mouse)	1:1.000	#901514 BioLegend
Anti-TOM20 (Rabbit)	1:1.000	#sc-11415 Santa Cruz
Anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser ^{235/236}) (D57.2.2E) XP (Rabbit)	1:500	#5364T Cell signalling
Anti-GFAP (Chicken)	1:1.000	#ab4674 Abcam
Anti-GFP (Chicken)	1:2.000	#ab13970 Abcam
Anticuerpo secundario		
Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	1:500	#A21206 Invitrogen
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	1:500	#A21202 Invitrogen
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate	1:500	#A31572 Invitrogen
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate	1:500	#A31570 Invitrogen
Goat Anti-Chicken IgY H&L (Alexa Fluor 488) preadsorbed	1:500	#ab150173 Abcam

9. Hibridación *in situ*

Para realizar la hibridación *in situ* se siguieron las instrucciones del fabricante para *RNAscope Fluorescent Multiplex Assay* (Wang et al., 2012). Brevemente, en el momento de la eutanasia, los troncos encefálicos de los ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* y *Vglut2:Ndufs4cKO* fueron incluidos en un criomolde con OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*, #NC9806257, Fisher Scientific) y conservados a -80°C. Posteriormente, se realizaron cortes de 16 µm con criostato montados directamente en un portaobjetos. Estas secciones se fijaron durante 4 minutos en PFA 4%, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se trataron con proteasa IV. A continuación, se realizó la hibridación para el ARNm de interés usando las sondas *Mm-Slc17a6* (#319171, acdbio) para el canal C1 y la EYFP (#312131, acdbio) para el canal C3 o la *Mm-Adcyap1* para el canal C2 (#405911, acdbio). La señal de dichas sondas se amplificó, con Atto 550 (*Orange*) o Alexa 488 (*Green*) según se muestra en los resultados. Finalmente, se realizó un contraste nuclear y se montaron las secciones utilizando el medio de montaje *ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI* (#P36966, Molecular Probes). La evaluación de la tinción se realizó mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 700 y el programa ImageJ (versión: 1.52, Schindelin et al., 2012).

10. Análisis estadístico

Los distintos resultados estadísticos de la presente tesis doctoral, a excepción del análisis bioinformático para RNA-Seq, se han representado como la media ± error estándar (SEM). Para el análisis estadístico, se realizó la prueba estadística paramétrica *t* de *Student* o no paramétrica *Mann-Whitney* para la comparación de un grupo experimental con uno control. Por otro lado, en el caso de más de dos grupos a comparar, se utilizó el análisis de la varianza con un factor o más de uno (One way-ANOVA o Two-way ANOVA) o Kruskal-Wallis, en caso de varianzas no homogéneas. La significación estadística se determinó con un valor de $p < 0,05$. Para llevar a cabo dichas pruebas estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (La Jolla California, USA).

Resultados

1. Caracterización del traductoma citosólico de poblaciones neuronales susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial

La deficiencia condicional de la subunidad del complejo I mitocondrial *NDUFS4* en neuronas glutamatérgicas (excitatorias) o GABAérgicas (inhibitorias) contribuye diferencialmente en la patología clínica observada en un modelo murino para SL (Bolea et al., 2019). Concretamente, la deficiencia del complejo I en las neuronas glutamatérgicas (*VGLUT2*) se ha asociado con la aparición de problemas motores y respiratorios severos y las GABAérgicas (*GAD2*) con el desarrollo de crisis epilépticas, signos clínicos especialmente presentes en los pacientes con SL (Sofou et al., 2014; Bolea et al., 2019). Con el fin de determinar los mecanismos moleculares subyacentes que caracterizan la vulnerabilidad de cada población neuronal se ha analizado de manera específica el perfil traduccional citosólico de cada tipo celular por secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-Seq) en dos áreas cerebrales con una marcada afectación: el núcleo vestibular (NV), extensamente afectado por la delección de *Ndufs4* en las neuronas glutamatérgicas y relacionado con la primera causa de muerte en el SL, el fallo respiratorio (Arii and Tanabe, 2000; Sofou et al., 2014; Bolea et al., 2019); y el bulbo olfatorio (BO), el cual presenta un daño similar a edades muy tempranas, pero inducido por la inactivación de *Ndufs4* en las neuronas GABAérgicas (Bolea et al., 2019).

1.1. Estrategia para la identificación del traductoma citosólico en poblaciones celulares genéticamente definidas

La obtención del traductoma citosólico de la población neuronal glutamatérgica del NV o GABAérgica del BO en el contexto de enfermedad mitocondrial se realizó a partir de dos grupos de ratones transgénicos (Figura 18). Principalmente, estos animales se diferencian por expresar la recombinasa Cre bajo el promotor del transportador vesicular de glutamato *Slc17a6* (*Vglut2*), específico de neuronas glutamatérgicas, o del enzima *Gad2*, específico de neuronas GABAérgicas. La expresión de esta recombinasa, en animales con un *background* genético

Resultados

RiboTag, permite la recombinación del alelo flojado $Rpl22^{HA}$ en ambos grupos murinos, induciendo la expresión de la subunidad ribosomal RPL22 con el epítipo hemaglutinina o HA (RPL22·HA) en la subpoblación neuronal de interés (Sanz et al., 2009). Esta estrategia, permitirá el aislamiento del ARNm asociado al ribosoma citosólico de las poblaciones neuronales VGLUT2- o GAD2-positivas y su posterior análisis.

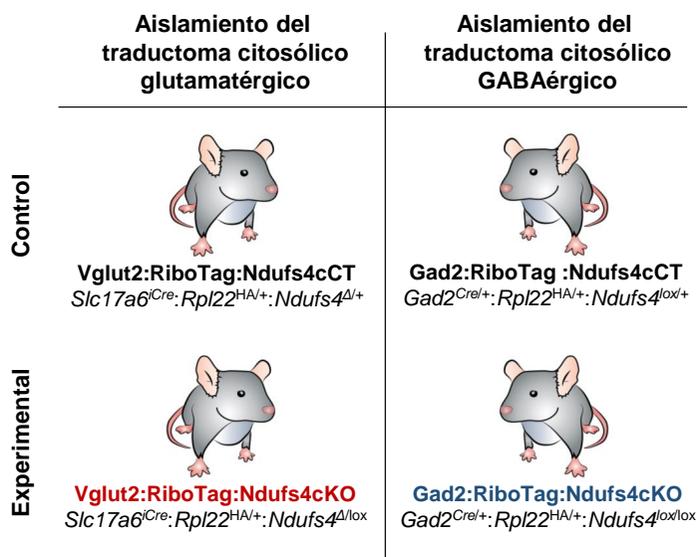


Figura 18. Genotipo de los ratones control y experimental para el análisis, con especificidad de tipo celular, del traductoma citosólico inducido por la deficiencia de la subunidad mitocondrial NDUFS4. El panel izquierdo muestra los ratones utilizados para el análisis del ARNm asociado a ribosoma de las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2) del NV. El panel derecho representa los ratones empleados para el mismo análisis en las neuronas GABAérgicas (GAD2) del BO.

La combinación del alelo flojado $Rpl22^{HA}$ con la deficiencia o presencia de $Ndufs4$ condicionalmente en las neuronas VGLUT2 o GAD2, bajo previa expresión de la recombinasa Cre, permite el análisis de los efectos de la deficiencia de complejo I mitocondrial en estas poblaciones genéticamente definidas. Así, los ratones control para el análisis del traductoma de la población glutamatérgica del NV ($Slc17a6^{Cre}:Rpl22^{HA/+}:Ndufs4^{\Delta/+}$ o $Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT$) presentan un alelo *wild type* para $Ndufs4$, suficiente para un desarrollo normal del animal, mientras que el grupo experimental ($Slc17a6^{Cre}:Rpl22^{HA/+}:Ndufs4^{\Delta/lox}$ o

Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO) codifica para un alelo flojado que será eliminado por la recombinasa iCre, induciendo la deficiencia de NDUF54 únicamente en las neuronas VGLUT2-positivas. Asimismo, los ratones control para el análisis del traductoma citosólico de la población neuronal GABAérgica del BO (*Gad2^{Cre/+}:Rpl22^{HA/+}:Ndufs4^{lox/+}* o *Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT*) presentan un alelo *wild type* y un alelo flojado para el locus *Ndufs4*. En presencia de la recombinasa Cre estos animales conservan el alelo *wild type*, el cual garantiza un fenotipo normal. Por el contrario, el grupo experimental (*Gad2^{Cre/+}:Rpl22^{HA/+}:Ndufs4^{lox/lox}* o *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO*) presenta dos alelos flojados, provocando la delección de NDUF54 en aquellas neuronas GAD2-positivas.

Estos modelos permiten obtener, de cada grupo, una muestra representativa del ARN total del área diseccionada (NV o BO) o *input*, la cual se extrae del lisado utilizado para la inmunoprecipitación del ensayo RiboTag, además de la muestra representativa del ARNm asociado al ribosoma citosólico del tipo neuronal de interés o inmunoprecipitado (IP) de la aproximación RiboTag (Sanz et al., 2009). Con esta última muestra se realiza el análisis del traductoma citosólico con resolución de tipo celular.

Los modelos aquí expuestos están basados en la aplicación del sistema Cre-loxP (Gu et al., 1993; Kim et al., 2018). No obstante, pese a las numerosas ventajas de esta herramienta, diversas publicaciones han señalado la importancia de determinar la expresión indeseada de la recombinasa Cre en poblaciones celulares diferentes a la población de estudio que puedan afectar la fiabilidad de los resultados finales (Song and Palmiter, 2018; Luo et al., 2020; Stifter and Greter, 2020). Con el propósito de asegurar un análisis del traductoma restringido a la población neuronal glutamatérgica o GABAérgica se realizó una caracterización fenotípica y molecular para cada grupo animal previo al análisis del traductoma por RNA-Seq.

1.1.1. Validación del ensayo RiboTag para el aislamiento del traductoma citosólico de las neuronas GAD2 deficientes para NDUFS4 en el BO.

Con el objetivo de determinar la expresión proteica de la proteína RPL22·HA en el área del BO se realizó un ensayo por inmunofluorescencia con el anticuerpo α -HA en cortes coronales de ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT* a una edad postnatal de 50 días (P50). Dicho análisis demostró células con inmunoreactividad para HA (Figura 19A-B), confirmando así la recombinación del locus *Rpl22^{HA/+}*, y la consecuente expresión del marcaje RiboTag (*Rpl22·HA*). Dicha expresión se localizó en la capa glomerular, mitral y, especialmente, en la capa granular del BO, áreas con conocida expresión para *Gad2* (Figura 19C)(Lein et al., 2007), sugiriendo que la expresión de la recombinasa Cre se correlacionaba con la expresión del promotor de *Gad2*, permitiendo así la expresión de RPL22·HA, su inmunoprecipitación y el posterior aislamiento del ARNm asociado. Por otro lado, a nivel fenotípico, no se observaron diferencias significativas entre los animales *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* y sus respectivos controles *Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT* hasta el momento de la muerte, a excepción de un peso ligeramente menor en el grupo experimental (reportado en Bolea et al., 2019). Dicha muerte se desencadenó por un repentino ataque epiléptico a la temprana edad de ~P55, tal y como se había descrito en Bolea et al., 2019.

Con la finalidad de determinar el enriquecimiento para la población GAD2 en las muestras inmunoprecipitadas (IP) de los ensayos RiboTag, que contienen los ARNm asociados al ribosoma de las células que expresan la recombinasa Cre, del BO de ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT* y *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* se realizó el análisis por PCR cuantitativa con transcriptasa inversa o qRT-PCR de los transcritos para la población neuronal GABAérgica (*Gad2*), glutamatérgica (*Slc17a7*) y de oligodendrocitos (*Cnp*) (Figura 19E), transcritos expresados en el BO (Lein et al., 2007). Este ensayo reveló un claro enriquecimiento de *Gad2* y un empobrecimiento robusto de *Cnp* y *Slc17a7* en las muestras IP respecto al ARN total del BO (*input*). En este caso, el análisis por qRT-PCR se realizó

comparativamente cargando cantidades iguales de ARN de cada muestra, ya que la normalización por *Actb* se descartó dado que la población neuronal GABAérgica tiene un contenido superior de este transcrito unido al ribosoma comparativamente al resto del transcriptoma del BO, tanto en el grupo control como en el experimental (Figura 19D), pudiendo interferir en la interpretación de los resultados. Por tanto, estos resultados demostraron que la inmunoprecipitación del ARNm asociado al ribosoma·HA permitía el análisis del perfil de expresión génica de la población neuronal GABAérgica. Asimismo, se analizaron los niveles del transcrito *Ndufs4* a nivel del BO (*input*) y a nivel de la población neuronal GABAérgica (IP) (Figura 19F) por qRT-PCR, indicando una disminución significativa de este transcrito en dicha área cerebral en los ratones experimentales Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a los controles, pero aún más dramática en el caso de las neuronas GABAérgicas de ratones con deficiencia mitocondrial. Estos resultados indicaron que la delección de NDUF54 en la población GABAérgica del BO tiene un claro impacto a nivel del área cerebral, probablemente resultado del elevado porcentaje de neuronas GABAérgicas en dicha región. No obstante, esta delección es específica para la población neuronal GABAérgica, señalando el potencial de la técnica RiboTag para realizar un análisis de tipo celular específico con el modelo murino GABAérgico. Así pues, dada la poca variabilidad fenotípica entre dichos animales y la robustez del análisis de enriquecimiento se procesaron dichas muestras (*input* e IP) para el análisis por RNA-Seq del perfil traduccional citosólico de la población GABAérgica del BO en el contexto de enfermedad mitocondrial.

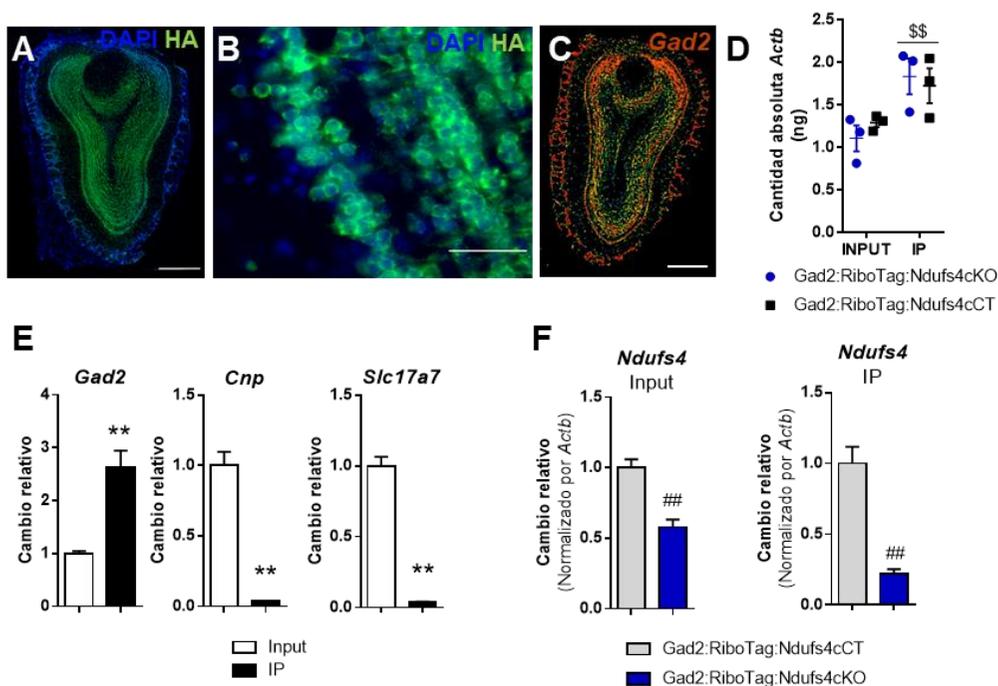


Figura 19. Caracterización del ensayo RiboTag para el aislamiento del traductoma citosólico de neuronas GABAérgicas en el BO de animales Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO y Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT. A) Análisis por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-HA en secciones coronales del BO de ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT (n=3). La tinción de DAPI se utilizó como contraste nuclear. Escala: 500µm. B) Magnificación del panel A, en el que se distinguen aquellas poblaciones celulares con marcaje para HA (RiboTag). Escala: 50µm. C) Sección del BO en el que se indica los niveles de expresión del transcrito *Gad2* por hibridación *in situ* (pseudocolor), adaptado del *Allen Brain Atlas* (Lein et al., 2007). Escala: 500µm D) Cantidad absoluta del transcrito *Actb* en muestras *input* e IP de ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO y Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT. Se representa la media ± SEM analizados por el test Two-Way ANOVA (n=3, \$\$p<0,01 comparado con el grupo input). E) Análisis por qRT-PCR del enriquecimiento para transcritos específicos de la población neuronal GABAérgica (*Gad2*), de la población de oligodendrocitos (*Cnp*) y de la población neuronal glutamatérgica (*Slc17a7*) en las muestras inmunoprecipitadas (IP) en comparación al ARN total del BO (*input*) de animales Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT y Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO. Se representan los datos como la media de los datos ± SEM analizados por la prueba Mann Whitney (n=6, **p<0,01). F) Análisis del nivel de expresión del transcrito *Ndufs4* en el BO (*input*) y en las neuronas GABAérgicas (IP) en ratones experimentales (Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO) en comparación a los control (Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT), señalando la delección del transcrito *Ndufs4* en los ratones experimentales. Se representan los datos como la media ± SEM analizados por el test estadístico t-student (n=3, ##p<0,01).

1.1.2. Validación del ensayo RiboTag para el aislamiento del traductoma citosólico de las neuronas VGLUT2 del NV deficientes para NDUFS4.

De igual modo que para el grupo de estudio del traductoma citosólico GABAérgico del BO, se realizó el análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos α -HA en el área del NV en cortes coronales de ratones control *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* a una edad de P50. Este análisis histológico demostró inmunoreactividad para el epítipo HA en el área del NV (Figura 20A-B), garantizando la inmunoprecipitación posterior del ribosoma RPL22·HA y del ARNm asociado. Notablemente, este análisis reveló un patrón de expresión del epítipo HA similar al patrón de expresión de *Slc17a6* (*Vglut2*) (Figura 20C), señalando que la recombinación del locus *Rpl22^{HA/+}* se produce y mantiene en las neuronas VGLUT2 en edad adulta. No obstante, otras poblaciones celulares VGLUT2-negativas en edad adulta presentaron también expresión del epítipo HA, como el núcleo facial del tronco encefálico, principalmente de expresión colinérgica y sin expresión glutamatérgica (Lein et al., 2007) (Figura 20C-D), sugiriendo una recombinación indeseada de los locus floxados (*Rpl22* y *Ndufs4*) en tipos celulares distintos a la población VGLUT2 de interés.

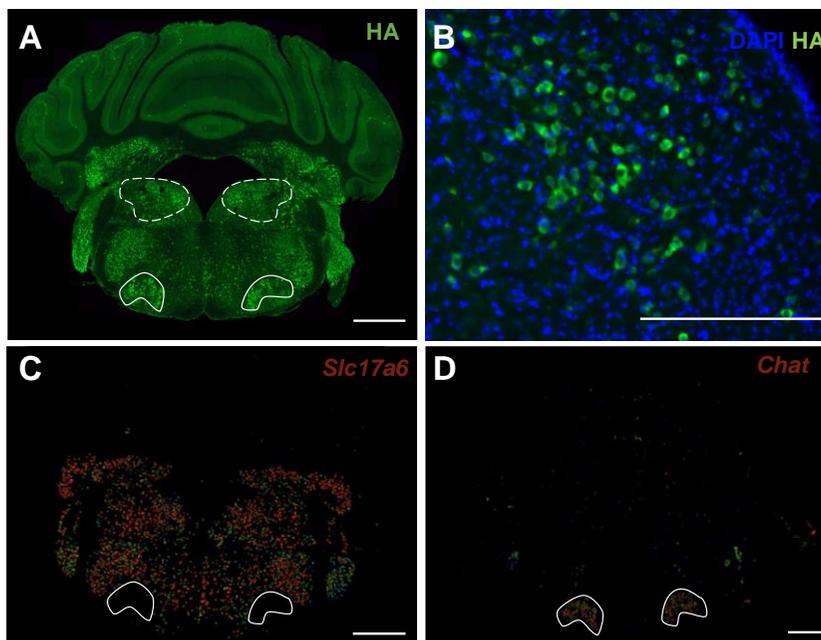


Figura 20. Caracterización de la recombinación del locus *Rpl22*^{HA/+} en el NV de ratones control *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* a nivel histológico. A) Montaje completo de un corte coronal con inmunofluorescencia para HA en ratón *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* a P50. Se indica el NV (delimitado por línea discontinua) y el núcleo facial (delimitado por línea continua) (n=3). Escala: 1mm. B) Sección del NV del panel A, incluyendo marcaje nuclear con DAPI, en el que se pueden distinguir aquellas poblaciones celulares con marcaje RiboTag (HA). Escala: 100µm. C-D) Expresión de los transcritos *Slc17a6* (*Vglut2*) y *Chat* en el tronco encefálico adaptadas de *Image credit: Allen Institute* (Lein et al., 2007). Aunque el patrón de expresión *Slc17a6* es parecido al del panel A, indicando que principalmente las neuronas VGLUT2 presentan marcaje RiboTag, el área del núcleo facial (línea continua), área sin expresión glutamatérgica, pero sí colinérgica, presenta marcaje positivo para HA en ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* en edad adulta. Escala: 1mm.

Con el propósito de evaluar el alcance de la recombinación indeseada de los locus floxados en ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* y *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* se realizó un estudio fenotípico y molecular de estos animales. La exploración física del grupo murino control (*Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT*) para el análisis del traductoma citosólico glutamatérgico vestibular demostró un comportamiento normal correspondiente a un ratón sano, mientras que el grupo experimental (*Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO*) manifestó claros signos de deterioro motor y respiración arrítmica, además de retraso en el crecimiento y deshidratación, signos clínicos previamente descritos en Bolea et al., 2019, resultado de la

deleción de *Ndufs4* en la población neuronal VGLUT2. En este sentido, la expresión del locus *Rpl22^{HA/+}* no implicó ningún signo clínico adicional aparente. Sin embargo, en el grupo experimental se pudo observar heterogeneidad en la severidad de los signos clínicos, así como en la edad de aparición de estos. Principalmente, a P50 los ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* se podían dividir en dos subgrupos; ratones aparentemente sanos con desarrollo patológico posterior y ratones con un fenotipo patológico similar al descrito para el ratón con una deficiencia constitutiva de *NDUFS4* (*Ndufs4KO*) a esta misma edad (Quintana et al., 2010) (Figura 21A). Así, el grupo experimental con signos clínicos a P50 (SC+) presentaba un peso corporal significativamente inferior que aquellos animales con menor severidad (SC-) (Figura 21B), similar al tamaño del ratón *Ndufs4KO* (Kruse et al., 2008). Igualmente, los ratones con signos clínicos más severos sufrían alopecia temporal en algunas regiones corporales sin patrón aparente que se recuperaba en el siguiente ciclo de crecimiento de pelo entre día postnatal P29 y P39 (Figura 21C). En este sentido, previamente se había descrito que el ratón *Ndufs4KO* sufría pérdida de pelo corporal en ese período de edad debido a la deleción ubicua de *NDUFS4* (Kruse et al., 2008), sugiriendo una deficiencia de *NDUFS4* en tejidos periféricos en el subgrupo de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO-SC+*. Para confirmar esta hipótesis, se analizaron las reacciones de genotipado para los alelos floxados *Ndufs4* y *Rpl22*. Así, se observó diferentes grados de recombinación en la cola de animales experimentales (Figura 21D).

Resultados

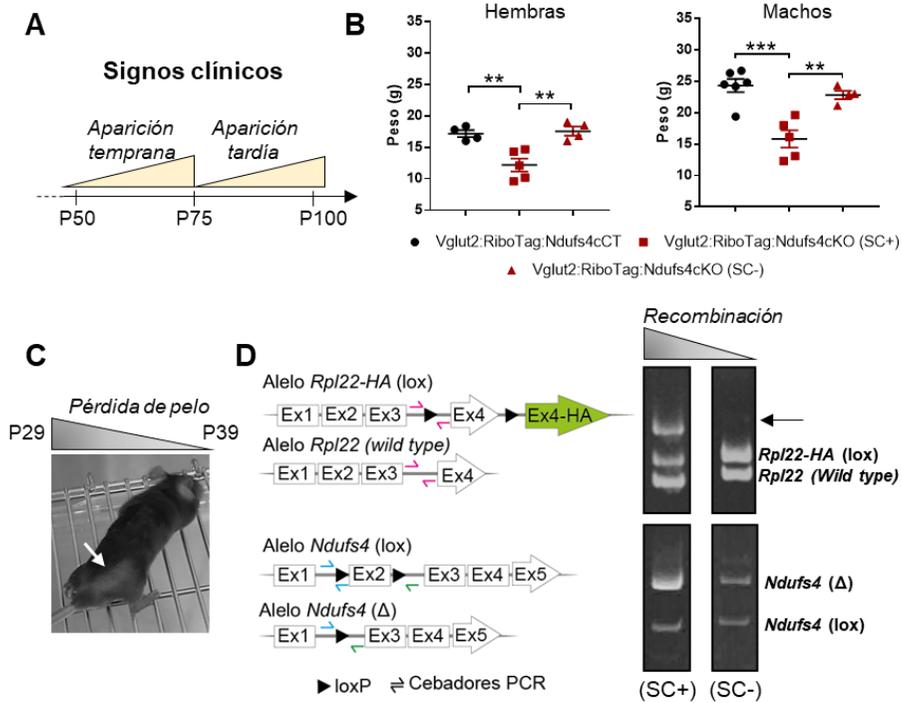


Figura 21. Heterogeneidad fenotípica en los ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO (experimental). A) Línea temporal, en días postnatales (P), representativa de la aparición de signos clínicos (déficit motor y/o respiratorio) en los ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO, siendo el primer grupo de aparición temprana (~P50) y el segundo de aparición tardía (~P80). B) Peso corporal de ratones control y experimental a P50. Los ratones experimentales se subclasifican según presencia (+) o ausencia (-) de signos clínicos (SC), siendo el grupo SC+ el que muestra un menor peso corporal. Los resultados se representan como la media \pm SEM analizada por el test One-way ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey's (n=4-6; **p<0,01, ***p<0,001). C) Imagen representativa de la presencia de alopecia corporal temporal (flecha blanca) en el subgrupo SC+ de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO. D) Genotipado del locus *Rpl22*^{HA/+} y *Ndufs4* ^{Δ /lox} en muestras de cola de ratones experimentales SC+ o SC-. La flecha muestra el producto resultante de la recombinación del alelo floxado *Rpl22*^{HA/+}. De izquierda a derecha se muestra de mayor a menor grado la recombinación de los locus floxados de cada gen.

Dada la presencia de recombinación de los locus floxados (*Rpl22* y *Ndufs4*) en tejidos periféricos sin expresión para Vglut2 en edad adulta, se caracterizó el nivel de expresión del transcrito *Ndufs4* por qRT-PCR en el propio NV, a través de la muestra *input* de los ensayos RiboTag. De este modo, se pudo determinar el impacto patológico de la delección en heterocigosis o homocigosis de este gen en los ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4CT y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO con (+) o

sin (-) signos clínicos (SC) a P50. Comparativamente con un ratón con un locus para *Ndufs4 wild type* o *Vglut2:RiboTag (Slc17a6^{iCre}:Rpl22^{HA/+}:Ndufs4^{+/+})*, el nivel de expresión del transcrito *Ndufs4* en el grupo control *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* representaba un ~50% menos de expresión que el grupo *wild type* (Figura 22), consistente con la delección presente en uno de los alelos (alelo Δ). No obstante, esta disminución no implicó ningún impacto patológico aparente, como ya se había demostrado anteriormente (Kruse et al., 2008). De igual modo, los ratones experimentales SC+ y SC- demostraron una reducción significativa de la expresión del transcrito *Ndufs4* en el NV. No obstante, el grupo SC+ presentaba un nivel inferior de expresión comparado con el grupo SC-, sugiriendo un mayor porcentaje de células con delección de *Ndufs4* en el NV (Figura 22A). Adicionalmente, se observó que el nivel de expresión de *Ndufs4* en los inmunoprecipitados de ensayos RiboTag (IP) era prácticamente nulo en los ratones experimentales SC+ y SC-, indicando que en aquellas poblaciones celulares donde se había producido la recombinación del locus *Rpl22^{HA/+}*, también se producía la recombinación del locus *Ndufs4^{Δ/lox}*. Por el contrario, los niveles de *Ndufs4* en el grupo control *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* se mantuvieron constantes tanto a nivel del NV (*input*), como en aquellas muestras inmunoprecipitadas, confirmando que la variabilidad clínica entre los grupos experimentales se debía al alcance de la recombinación del locus *Ndufs4* (Figura 22B).

Resultados

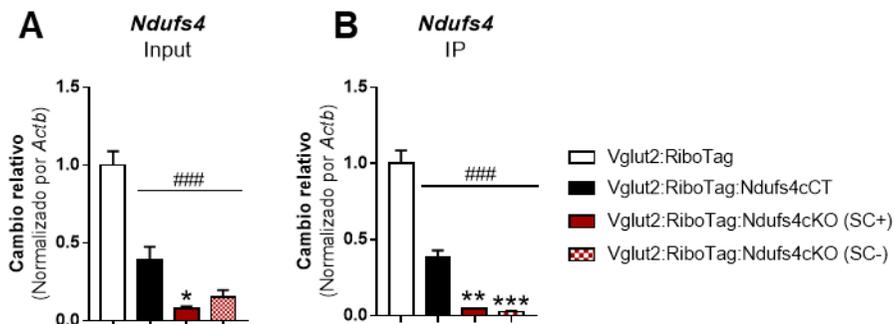


Figura 22. Niveles de *Ndufs4* en ensayos RiboTag en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y sus respectivos controles. Análisis por qRT-PCR de los niveles del transcrito *Ndufs4* en (A) *inputs* e (B) inmunoprecipitados (IP) de ensayos RiboTag en ratones Vglut2:RiboTag (*Ndufs4*^{+/+}), Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT (*Ndufs4*^{Δ/+}), y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO (*Ndufs4*^{Δ/lox}) con presencia (+) o ausencia (-) de signos clínicos (SC) a P50. Los datos se representan como la media ± SEM analizados por el test estadístico One-way ANOVA con comparaciones múltiples de Tukey's (n=3-5; ###p<0,001 comparado con Vglut2:RiboTag; *p<0,05, **p<0,01 o ***p<0,001 comparado con Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT).

El conjunto de estos datos indicó la expresión de la recombinasa Cre en poblaciones celulares VGLUT2-negativas, limitando el marcaje ribosomal (RPL22·HA) con precisa restricción de tipo celular y el posterior análisis del perfil traduccional glutamatérgico tanto en ratones adultos control como experimentales. No obstante, las diferencias entre los dos subgrupos experimentales sugirieron distintos grados de recombinación, siendo más restringida en el subgrupo SC- en comparación al SC+ a P50. Con la finalidad de determinar el grado de pureza de las muestras IP para la población VGLUT2 en ambos subgrupos, se determinó el nivel de enriquecimiento por qRT-PCR para el transcrito *Slc17a6* (específico de la población glutamatérgica) en el ARNm asociado a ribosoma inmunoprecipitado (IP) por la técnica RiboTag en comparación con el *input* del mismo ensayo RiboTag, en este caso, ARN extraído de homogenado del NV. Esta aproximación reveló que las muestras IP de animales SC- presentaban un enriquecimiento 4 veces superior al *input* para *Slc17a6*. Por el contrario, las muestras IP de animales SC+ exhibían un enriquecimiento inferior a 2 veces para este mismo transcrito, demostrando un

grado de pureza menor para la población glutamatérgica. Asimismo, se analizó también el nivel de enriquecimiento de un transcrito específico para la población de neuronas GABAérgicas (*Gad2*), abundante en el NV (Kodama et al., 2012), y de un transcrito específico de la población de oligodendrocitos (*Cnp*) (Valério-Gomes et al., 2018), para determinar en las IP los niveles de transcritos de neuronas no glutamatérgicas y de transcritos no neuronales, respectivamente. En este caso, las muestras IP de los animales SC+ presentaban una proporción mayor de *Gad2* y *Cnp*, mientras que las muestras IP de los animales SC- estaban mucho más empobrecidas para estos transcritos, confirmando un mayor grado de recombinación del alelo *Rpl22^{HA}* en tipos celulares no glutamatérgicos en los animales SC+ (Figura 23).

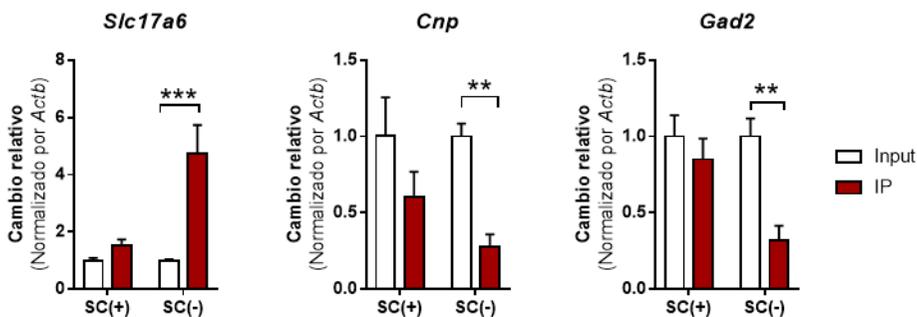


Figura 23. Análisis del enriquecimiento y depleción para transcritos específicos de diferentes poblaciones celulares utilizando la tecnología RiboTag en animales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO*. Análisis por qRT-PCR de los niveles de transcritos específicos de neuronas glutamatérgicas (*Slc17a6*), GABAérgicas (*Gad2*) y oligodendrocitos (*Cnp*) en muestras *input* e IP de ensayos RiboTag en homogenados de NV de animales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* con (+) o sin (-) signos clínicos (SC) a P50. Se representan los datos como la media de los datos \pm SEM analizados por Two-way ANOVA y comparaciones múltiples Sidak's (n=3-5, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Por tanto, para el análisis por RNA-Seq del traductoma citosólico de neuronas glutamatérgicas vestibulares, sólo aquellos ensayos RiboTag de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* o *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* que mostraron un enriquecimiento superior a 2 para *Slc17a6* en las IPs en comparación a sus *inputs*

y una depleción significativa para los transcritos marcadores de la población neuronal GABAérgica y de oligodendrocitos fueron seleccionados como óptimos.

1.2. Análisis por RNA-Seq de las muestras obtenidas por el ensayo RiboTag de ratones con deficiencia del complejo I mitocondrial en poblaciones neuronales susceptibles

Una vez validados los ensayos RiboTag para el análisis del perfil traduccional citosólico de la población neuronal glutamatérgica del NV y de la población neuronal GABAérgica del BO en ratones con deficiencia condicional para *Ndufs4* en estos tipos celulares, se seleccionaron aquellas muestras con un valor de integridad para el ARN (RIN) (Schroeder et al., 2006) superior a 7, garantizando una correcta preparación de las librerías de secuenciación masiva o RNA-Seq (Sheng et al., 2017).

Para el estudio de la población neuronal GABAérgica se seleccionaron para la secuenciación masiva muestras de ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT* y *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* a día P50, con el objetivo de analizar el perfil traduccional citosólico anterior al momento de la muerte aproximadamente a P55 (Bolea et al., 2019). Por otro lado, para el análisis de la población glutamatérgica se seleccionaron muestras de ratones control *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* y experimentales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO SC-*, los cuales muestran una activación del marcaje RiboTag principalmente restringida a neuronas VGLUT2 y no empiezan a desarrollar complicaciones motoras y/o respiratorias hasta día ~P80, las cuales se agudizan con el transcurso de los días. En este caso, dado el fenotipo progresivo patológico de este modelo, se seleccionaron muestras a día P50 de ratones control y experimental (sin signos clínicos) y a día P100 (con signos moderados-severos de déficit motor y respiratorio), con el fin de entender la progresión de la enfermedad en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para *Ndufs4*.

Para cada replicado biológico se prepararon las librerías de secuenciación seleccionando el ARNm a través de las colas Poli(A), tanto para las muestras *input*, representativas del ARNm de todos los tipos celulares del NV o del BO, y las muestras IP, específicas para el ARNm asociado a ribosoma de los tipos neuronales de estudio presentados. Los fragmentos correspondientes a la cadena original de ARN fueron secuenciados bidireccionalmente (75pb), obteniendo una cobertura media de 31 millones de *reads* por muestra con un secuenciador NextSeq500 (Illumina), cobertura suficiente para obtener un análisis inferencial robusto (Conesa et al., 2016). Adicionalmente, los controles de calidad anteriormente expuestos garantizaron la obtención de *reads* de calidad excelente, analizados con la herramienta FastQC (Andrews, 2010) y una ratio de alineamiento único de los *reads* con el genoma de referencia del 70-90%, indicando una librería de calidad aceptable para su posterior análisis (Dobin and Gingeras, 2016).

1.2.1. Perfil transcriptómico tisular del BO y del NV inducido por la deficiencia del complejo I mitocondrial en poblaciones neuronales susceptibles.

En primer lugar, gracias a los datos obtenidos por RNA-Seq para las muestras *input* de los ensayos RiboTag se procedió a analizar el transcriptoma subyacente a la disfunción del complejo I mitocondrial en el área del BO y del NV en los animales experimentales Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO, respectivamente. Tanto el área del BO, como del NV, son regiones neuroanatómicas con prominente reacción glial en caso de deficiencia condicional de *Ndufs4* en la población neuronal GAD2 o VGLUT2 (Bolea et al., 2019), así como en caso de deficiencia constitutiva de *Ndufs4* en el ratón *Ndufs4*KO (Quintana et al., 2010). Estos datos sugieren que la mutación a nivel neuronal induce una respuesta molecular en otros tipos celulares cercanos, como la microglía y los astrocitos. En este sentido, aunque la hipótesis principal de este trabajo es que el origen de la susceptibilidad celular en caso de deficiencia

Resultados

del complejo I mitocondrial reside en las diferencias del transcriptoma en poblaciones genéticamente definidas, no se debe obviar procesos mayores y comunes, como la neuroinflamación, que también puedan contribuir en la heterogeneidad clínica.

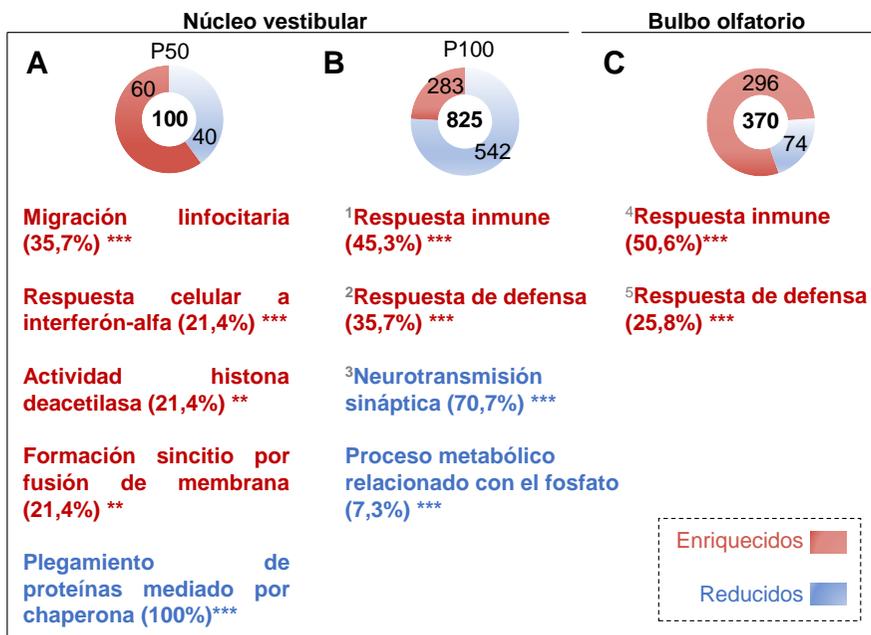
Así pues, para identificar los transcritos diferencialmente expresados (DE) a nivel de tejido en el área del BO y del NV con deficiencia del complejo I a nivel neuronal se compararon las muestras *input* de los ensayos RiboTag de animales experimentales respecto sus controles (*input*_{cKO} vs *input*_{cCT}) utilizando el paquete estadístico DESeq2 (Love et al., 2014). Esta prueba permite detectar mediante estadística inferencial la cuantificación de los cambios entre dos condiciones, teniendo en cuenta la variabilidad biológica dentro de una misma condición, reduciendo así el número de falsos positivos. Se determinaron los transcritos DE con un nivel de significación *p* ajustado (*padj*) inferior al 5% y un cambio relativo al control (o *Fold Change*; FC) superior a 1, obteniendo así el perfil transcriptómico de cada tejido.

En el NV de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* en etapa patológica temprana (P50) encontramos un total de 100 transcritos DE, mientras que a P100 esta cifra asciende a 825 transcritos DE (Figura 24A-B). En el caso del análisis del transcriptoma del BO de ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* se identificaron un total de 370 transcritos DE a P50 (Figura 24C). Con el fin de reducir la complejidad biológica de los distintos transcritos DE de cada grupo se realizó un análisis de ontología génica (GO) con la aplicación ClueGO (Shannon et al., 2003; Bindea et al., 2009). Esta aplicación permite el estudio de los transcritos desregulados en conjunto, creando una red funcionalmente organizada de términos GO significativamente enriquecidos, pero con la capacidad de discernir aquellos términos que pertenecen al grupo de transcritos incrementados y/o reducidos. Así, este análisis reveló dos procesos superiores potenciados y comunes en ambos tejidos resultado de la deficiencia del complejo I mitocondrial

en dos poblaciones neuronales distintas, la respuesta inmune y la respuesta de defensa a otro organismo (Figura 24).

Concretamente, dentro de los términos enriquecidos y significativos del grupo Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO a P50 encontramos transcritos con expresión reducida relacionados con la vía de plegamiento de proteínas y transcritos con expresión incrementada involucrados en la actividad linfocitaria, respuesta a interferón-alfa, remodelación del ADN por deacetilasas y en la estructura membrana-celular (Figura 24A). Por otro lado, en estos mismos animales en un estado patológico más avanzado (P100) encontramos un enriquecimiento de términos GO asociados con transcritos DE con expresión reducida relacionados con la neurotransmisión sináptica a nivel estructural y de actividad, probablemente consecuencia de una desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica por la deficiencia del complejo I mitocondrial en este tipo neuronal. De igual modo, se observó una disminución de transcritos relacionados con procesos relacionados con fosfato. En contraste observamos, un incremento sustancial de términos GO relacionados con transcritos DE de expresión incrementada involucrados en la respuesta inmune y de defensa (Figura 24B). Igualmente, estos mismos términos se encuentran para transcritos DE con expresión incrementada en el BO de animales Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO a P50 (Figura 24C), sugiriendo vías patológicas comunes independientemente del grupo neuronal afectado por la privación del complejo I que gobiernan la progresión de la enfermedad mitocondrial. Estos resultados, se encuentran en consonancia con la prominente reactividad glial observada en ambos tejidos (Bolea et al., 2019).

Resultados



1
Respuesta inmune innata
Regulación positiva sistema inmune
Respuesta inflamatoria
Regulación de la producción de citoquinas
Regulación positiva secreción
Activación macrófagos
Respuesta cicatrización
Respuesta neuro inflamatoria
Activación de leucocitos mieloides
Quimiotaxis de granulocitos

2
Regulación a respuesta a estímulo externo
Respuesta a otro organismo
Respuesta de defensa
Respuesta a virus

3
Proyección neuronal
Desarrollo sistema nervioso
Cuerpo neuronal
Presinapsis
Postsinapsis
Regulación niveles neurotransmisores
Vesícula sináptica
Regulación del potencial de membrana
Regulación del transporte transmembrana
Morfogénesis celular en la diferenciación neuronal
Axón principal
Organización estructura/actividad sináptica
Unión proteica al citoesqueleto

4
Regulación de la respuesta inmune
Regulación de la migración leucocitaria
Activación leucocitaria
Regulación
Fagocitosis
Lisosoma
Respuesta a citoquina
Regulación positiva a estímulo mediado por citoquina
Regulación de la producción de citoquinas
Regulación positiva producción IL-6
Activación macrofágica
Procesamiento y presentación antígeno
Activación de la respuesta inmune innata

5
Regulación positiva a estímulo externo
Respuesta a otro organismo
Respuesta a bacteria

Figura 24. Principales categorías funcionales subyacentes al perfil transcripcional tisular del NV y del BO de ratones con deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas VGLUT2 y GAD2, respectivamente. Anillos con el número de transcritos DE con expresión reducida (azul) o incrementada (rojo) en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO en etapa patológica (A) temprana (P50) o (B) tardía (P100) y (C) en el BO de ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO a P50. Para cada grupo se indican los términos significativamente enriquecidos del análisis de ontología génica (Proceso Biológico, Función molecular y Componente celular) según porcentaje de genes implicados, siendo en rojo aquellos términos GO relacionados con transcritos con expresión incrementada y en azul aquellos con expresión reducida. Asimismo, se indican en gris las subcategorías implicadas en ciertos términos GO en la parte inferior de la figura (n=3, **p<0,01, ***p<0,001).

En conjunto, estos resultados confirmaron que la disfunción mitocondrial en un tipo celular tiene un impacto directo en el conjunto de subpoblaciones asociadas. No obstante, procesos mayores como la neuroinflamación pueden diluir procesos moleculares menos exagerados que determinan la susceptibilidad neuronal a la disrupción del complejo I mitocondrial.

1.2.2. Perfil traduccional citosólico inducido por la deficiencia del complejo I mitocondrial en dos poblaciones neuronales susceptibles

Con el objetivo de elucidar las diferencias moleculares que definen la susceptibilidad neuronal a la privación del complejo I mitocondrial se procedió a analizar los cambios del perfil traduccional de la población GABAérgica del BO y de la población neuronal glutamatérgica del NV deficientes para NDUFS4 mediante el análisis de las muestras IP de los ensayos RiboTag, anteriormente descritas.

1.2.2.1. Identificación de los transcritos con asociación diferencial al ribosoma subyacentes a la deficiencia del complejo I mitocondrial en dos poblaciones neuronales susceptibles.

Las muestras IP del ensayo RiboTag representan el ARNm asociado a ribosoma. Para identificar los transcritos diferencialmente asociados al ribosoma (DAR) resultado de la deficiencia de NDUFS4 en la población neuronal glutamatérgica vestibular y la GABAérgica del BO, se compararon las muestras IP del grupo control (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT o Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT) con el experimental (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO o Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO) mediante el paquete estadístico DESeq2 (Love et al., 2014), descrito anteriormente. Se determinaron los transcritos DAR con un nivel de significación p ajustado (p_{adj}) inferior al 5% y un cambio relativo al control (o *Fold Change*; FC) superior a 1.

Resultados

En las neuronas glutamatérgicas vestibulares en etapa asintomática (P50) se detectaron un total de 98 transcritos DAR, siendo 18 de asociación incrementada y 80 reducida. Por el contrario, y en correlación a una severidad mayor, a P100 se determinaron un total de 464 transcritos DAR, 173 con un incremento y 291 con una reducción en la asociación al ribosoma. En la población neuronal GABAérgica del BO, encontramos 890 transcritos DAR, entre ellos, 262 mostraron un incremento y 628 una reducción en la asociación al ribosoma (Figura 25A), sugiriendo un mayor impacto en el traductoma GABAérgico a la deficiencia mitocondrial.

Asimismo, se observó mediante el análisis de componentes principales (PCA), que el principal elemento que explica la varianza entre las muestras es el tipo de muestra (*input* o IP), en parte sujeto al perfil traduccional resultante de la combinación de distintos tipos celulares (Figura 25B-C). En consecuencia, estos resultados indicaron la importancia de aplicar un enfoque con resolución de tipo celular para entender las vías moleculares que coordinan la función del SNC. Además, el estudio de la variabilidad entre las muestras para el análisis de la población VGLUT2-positiva puntualizó una tendencia a agruparse entre muestras de una misma edad, teniendo un mayor impacto en la varianza que la mutación mitocondrial en sí.

Finalmente, se visualizó a través de gráficos *Heatmap* el nivel de agrupación de los distintos transcritos DAR (filas) según el patrón de respuesta, asociación incrementada o reducida al ribosoma (Figura 25D-F) para cada muestra analizada (columna). Asimismo, este análisis exhibió que no todos los animales presentan el mismo nivel de asociación al ribosoma para el mismo transcrito, reflejando variabilidad interindividuales entre los replicados biológicos.

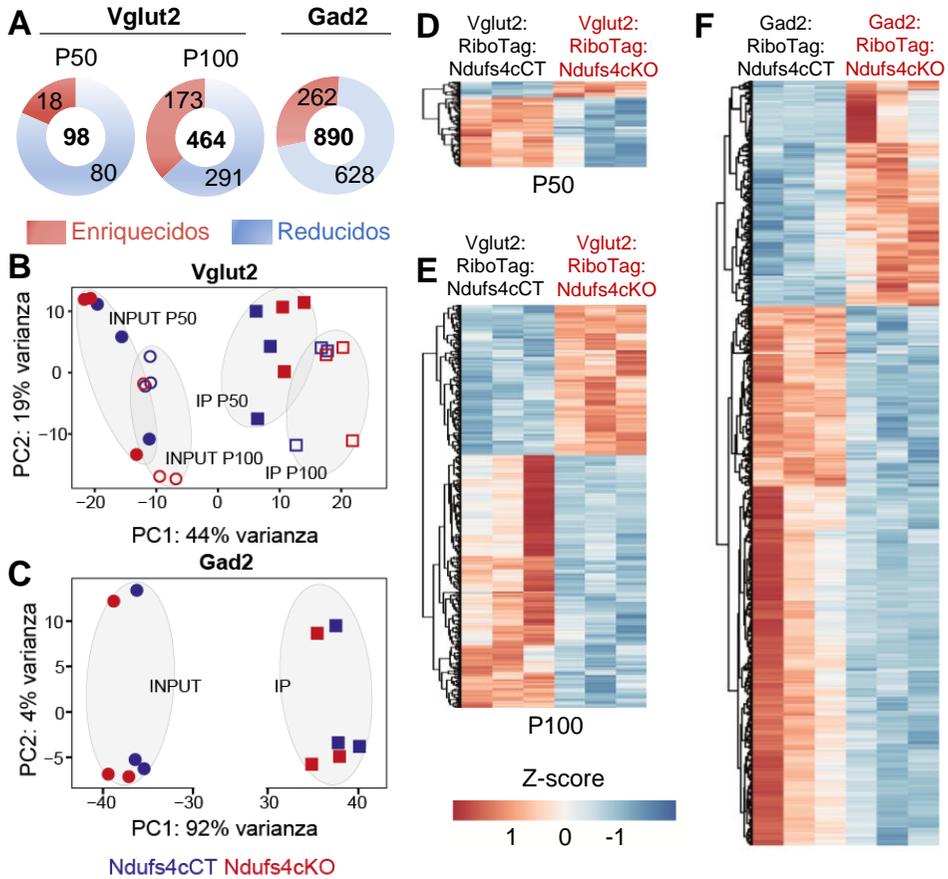


Figura 25. Visualización del impacto a la deficiencia de NDUF54 en el perfil traduccional de las neuronas glutamatérgicas del NV y las GABAérgicas del BO. A) Anillos con el número de transcritos DAR (incrementados o reducidos) en las neuronas glutamatérgicas vestibulares de animales Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO (Vglut2) a P50 y P100, o en las neuronas GABAérgicas del BO de ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO (Gad2) respecto sus controles (n=3). B-C) Análisis de los componentes principales según la escala logarítmica de la varianza que definen las muestras secuenciadas por RNA-Seq para el análisis del traductoma glutamatérgico (Vglut2) o GABAérgico (Gad2), siendo el tipo de muestra, *input* o *IP* la variable principal. D-F) *Heatmaps* de los transcritos DAR (filas) en las neuronas glutamatérgicas vestibulares (a P50 o P100) o de las neuronas GABAérgicas del BO en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO (Vglut2) o Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT o Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT). El *heatmap* agrupa los transcritos DAR (fila) jerárquicamente según la distancia euclidiana. *Z-score* es la variación de cada muestra transformada en escala logarítmica (\log_2). Se puede observar la variación entre los distintos replicados biológicos (columnas) para cada transcrito, así como la distribución entre niveles incrementados (rojo) o reducidos (azul) de los transcritos DAR.

1.2.2.2. Variabilidad del perfil traduccional entre las neuronas glutamatérgicas vestibulares y las GABAérgicas del BO deficientes para *Ndufs4*

Dada la relevancia del tipo de muestra, reflejo de la composición celular y el tipo de ARN (transcriptoma o traductoma), en la variabilidad de los componentes del análisis de los datos de RNA-Seq anteriormente expuestos, se analizó la posible variabilidad entre dos poblaciones neuronales diferentes, pero con la misma mutación mitocondrial. De manera interesante, el estudio por PCA demostró que el principal componente de la varianza entre estas poblaciones neuronales es su localización neuroanatómica, NV o BO, seguido del tipo de muestra, IP o *input* (Figura 26A), sugiriendo una importante influencia de la localización neuronal en su perfil traduccional. Con el propósito de entender el grado de correlación de ambos perfiles traduccionales se generó una matriz de correlación (*Spearman*) con todos los transcritos analizados en las muestras IP de cada población neuronal. Este análisis expuso un coeficiente de correlación (R) prácticamente nulo entre las dos poblaciones neuronales analizadas ($R=-0,033$) (Figura 26B). Adicionalmente, este mismo análisis aplicado únicamente a los transcritos DAR comunes en ambas poblaciones neuronales señaló una correlación (*Pearson*) significativamente negativa ($R=-0,48$) (Figura 26C), indicando dos perfiles traduccionales completamente distintos e incluso opuestos en dos poblaciones neuronales portadoras de una misma mutación mitocondrial.

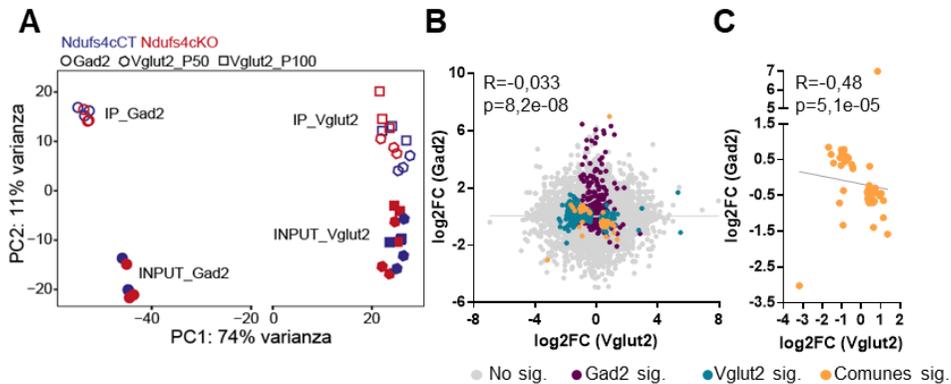


Figura 26. Variabilidad en el patrón de asociación al ribosoma de los transcritos obtenidos por RNA-Seq entre la población neuronal glutamatérgica del NV y la población neuronal GABAérgica del BO deficientes para la subunidad mitocondrial NDUF54. A) Análisis de los componentes principales en escala logarítmica que caracterizan el perfil traduccional de los ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT, Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO, Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT y Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO. Las muestras input representan el ARN total del NV (Vglut2_INPUT) o del BO (Gad2_INPUT) y las muestras IP, el ARNm asociado a ribosoma de las neuronas glutamatérgicas vestibulares (IP_Vglut2) o GABAérgicas del BO (IP_Gad2). Estos datos indicaron que el área cerebral y, en sucesión, el tipo de muestra son las variables principales que caracterizan dichas muestras. B) Matriz de correlación (*Spearman*) entre el perfil traduccional de las neuronas glutamatérgicas vestibulares y las neuronas GABAérgicas del BO deficientes para *Ndufs4*, exhibiendo una correlación prácticamente nula. Se representa en lila los transcritos DAR en los ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO, en verde los DAR en Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y en amarillo aquellos transcritos DAR comunes en ambos grupos experimentales respecto sus correspondientes controles. C) Matriz de correlación (*Pearson*) para los transcritos DAR comunes entre las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, anteriormente comentados en la Figura 25, demostrando una correlación significativamente negativa.

1.2.2.3. Análisis de las categorías funcionales alteradas por la deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO y las glutamatérgicas del NV

Una vez identificados los transcritos DAR en las neuronas glutamatérgicas vestibulares y las GABAérgicas del BO deficientes para *Ndufs4*, se procedió a analizar las vías moleculares subyacentes a la disfunción mitocondrial en cada subpoblación neuronal para facilitar la interpretación biológica de los resultados. Para ello, se realizó el análisis de ontología génica (GO) con la aplicación ClueGO (Shannon et al., 2003; Bindea et al., 2009), comentada

Resultados

anteriormente. Los transcritos DAR para cada término significativamente enriquecido pueden consultarse en el Anexo 1.

En primer lugar, el análisis ontológico de los transcritos DAR en las neuronas GABAérgicas del BO de los ratones Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO reveló una robusta disminución de transcritos relacionados con el procesamiento del ARN, la traducción, la biogénesis ribosomal y el proteasoma (Figura 27A). Notablemente, observamos una marcada disminución de transcritos relacionados con la fosforilación oxidativa (Figura 27B). Asimismo, en este tipo celular se observó un robusto incremento en la asociación al ribosoma de ARNm relacionados con procesos de defensa del organismo en presencia de virus, mediada principalmente por la vía de interferón-alfa (Figura 27C), sugiriendo que la deficiencia mitocondrial podría activar los mecanismos celulares antivirales. Finalmente, la deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO provocaría una desregulación en los niveles de asociación al ribosoma de transcritos relacionados con la neurotransmisión (Figura 27D).

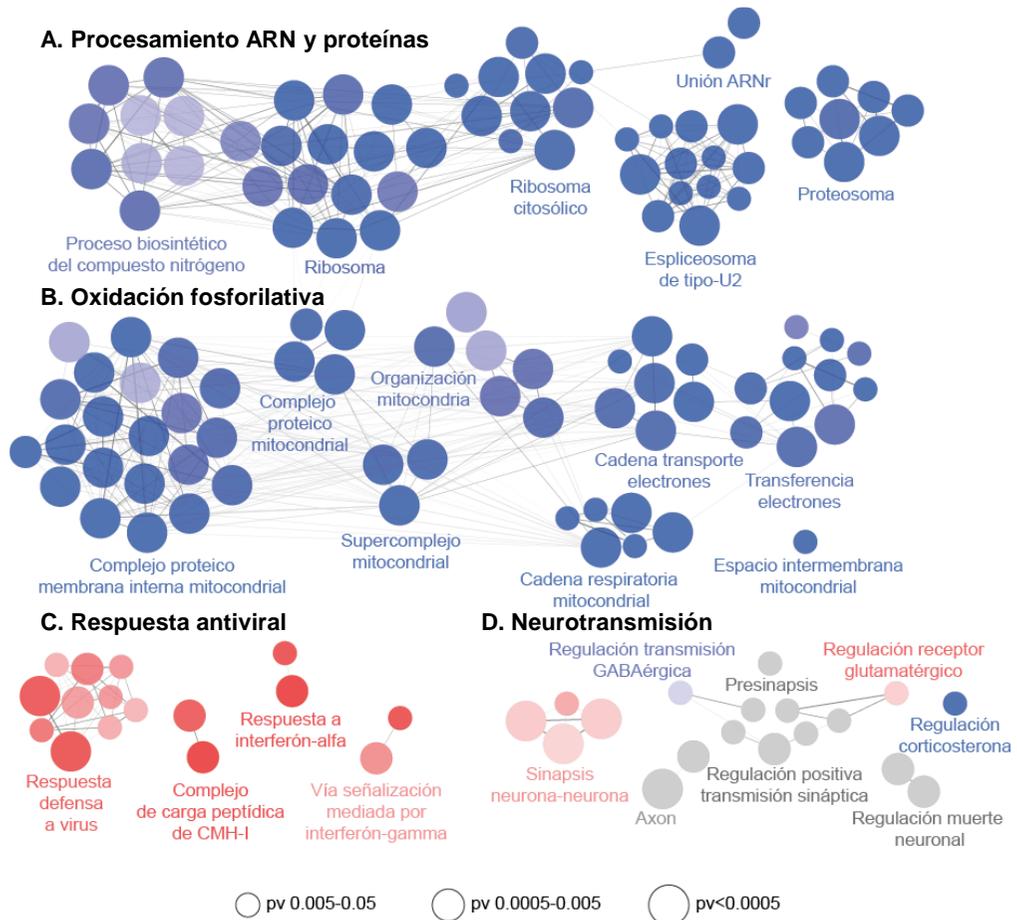
Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para *Ndufs4* (P50)

Figura 27. Análisis de ontología génica de los transcritos DAR en las neuronas GABAérgicas del BO de ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* respecto a sus controles (*Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT*) a P50. Se muestran, en redes agrupadas funcionalmente, aquellos términos GO (proceso biológico, componente celular y función molecular) relacionados con los transcritos con asociación reducida (azul) o asociación incrementada (rojo) al ribosoma. En gris se muestran términos con transcritos con asociación de ambos tipos. A) Procesos relacionados con el procesamiento del ARN y proteínas. B) Procesos relacionados con la fosforilación oxidativa a nivel de actividad y estructural C) Procesos relacionados con respuesta de defensa del organismo. D) Procesos relacionados con la neurotransmisión sináptica. El tamaño de las esferas representa el rango de significación (pv) de los términos (n=3). CMH: Complejo mayor histocompatibilidad.

Resultados

En segundo lugar, en los ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* a P50 se pudo observar una reducción de las vías involucradas en la regeneración de tejido y la regulación negativa de la gliogénesis. Asimismo, también observamos una disminución de los transcritos implicados en la respuesta a pH, estrechamente ligada a la función mitocondrial. Finalmente, los resultados mostraron un incremento de los procesos de unión al grupo alcohol, principalmente debido a un incremento de genes relacionados con la síntesis del colesterol. Esto podría explicarse por un incremento relativo de 3,2 veces respecto al grupo control del transcrito *Star* en el grupo experimental. Dicho transcrito codifica para una proteína (StAR: *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) de transporte que regula la transferencia de colesterol dentro de las mitocondrias, paso limitante en la síntesis de esteroides (Bahat et al., 2014). Contrariamente, observamos una disminución de la respuesta a la progesterona, dependiente en parte de la síntesis de neuroesteroides en mitocondria (Baulieu and Schumacher, 2000). Estos procesos podrían indicar aquellas alteraciones moleculares iniciales en la transición patológica de las neuronas glutamatérgicas vestibulares (Figura 28).

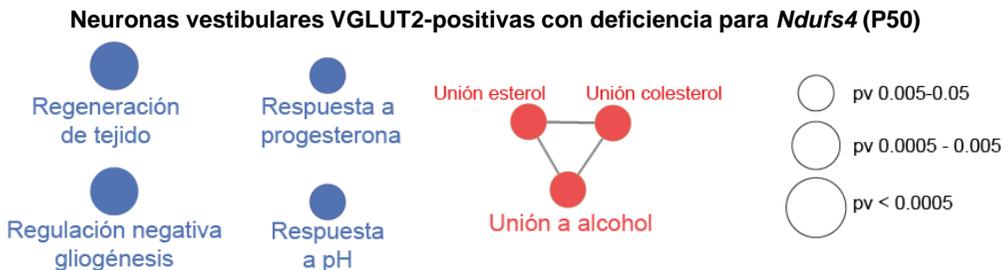
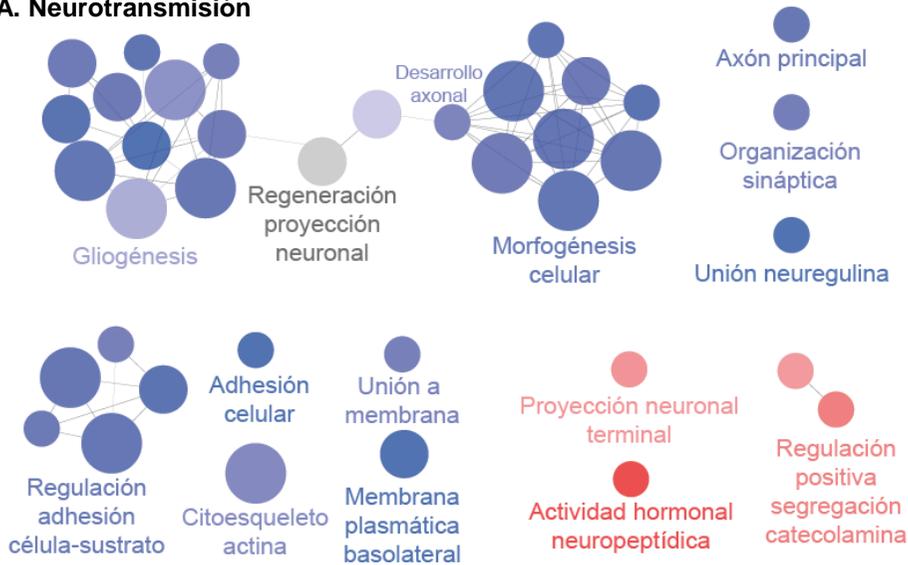


Figura 28. Análisis de ontología génica de los transcritos DAR en las neuronas glutamatérgicas vestibulares de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* respecto a sus controles (*Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT*) a P50. Se muestran, en una red agrupada funcionalmente, aquellos términos GO (proceso biológico, componente celular y función molecular) asociados a los transcritos con asociación reducida (azul) o asociación incrementada (rojo) al ribosoma. El tamaño de las esferas representa el rango de significación (pv) de los términos (n=3).

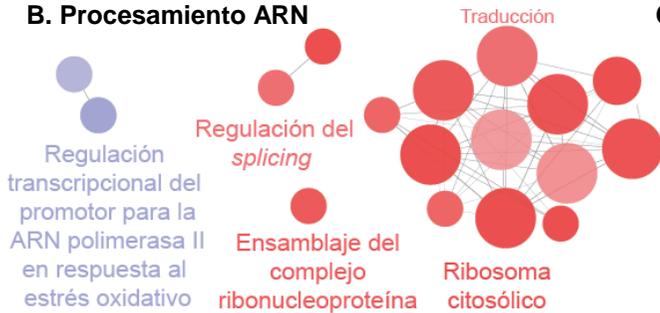
El mismo análisis de ontología génica se realizó para los transcritos DAR en un estado avanzado de la patología (P100) en la población neuronal glutamatérgica. En este caso, el perfil traduccional mostró una disminución de transcritos relacionados con la gliogénesis y, especialmente, con el desarrollo y morfología neuronal. Asimismo, también observamos a nivel de componente celular, una disminución en transcritos involucrados en la adhesión celular y del espacio extracelular, indicando una desregulación de la organización neuronal. Sin embargo, también observamos un incremento de transcritos relacionados con la proyección neuronal terminal, con la vía de señalización de neuropéptidos y con la segregación de catecolaminas, sugiriendo posibles vías de señalización neuronal activas pese a la deficiencia del complejo I mitocondrial (Figura 29A). Por otro lado, mientras la vía de regulación transcripcional del promotor para la ARN polimerasa II se mostraba reducida, los datos de secuenciación apuntaron a un incremento de la biogénesis ribosomal citosólica (Figura 29B), quizás resultado de una activación de la vía de mTOR (Mayer and Grummt, 2006). Finalmente, observamos una disminución de la actividad elongasa de los ácidos grasos, relacionada con la síntesis de Acil-coA en la mitocondria (Figura 29C).

Neuronas vestibulares VGLUT2-positivas con deficiencia para *Ndufs4* (P100)

A. Neurotransmisión



B. Procesamiento ARN



C. Regulación ácidos grasos

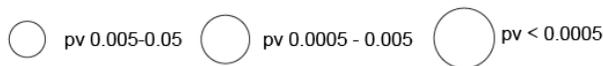


Figura 29. Análisis de ontología génica de los transcritos DAR en las neuronas glutamatérgicas vestibulares de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* respecto a sus controles (*Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT*) a P100. Se muestran, en redes agrupadas funcionalmente, aquellos términos GO (proceso biológico, componente celular y función molecular) relacionados con los transcritos con asociación reducida (azul) o asociación incrementada (rojo) al ribosoma. Los términos grises simbolizan categorías con transcritos DAR incrementados y reducidos. A) Procesos relacionados con la neurotransmisión a nivel estructural y de actividad. B) Procesos relacionados con el procesamiento del ARN y C) de los ácidos grasos. El tamaño de las esferas representa el rango de significación (pv) de los términos (n=3).

1.2.2.4. Análisis de las principales categorías funcionales enriquecidas en neuronas GABAérgicas del BO y glutamatérgicas del NV y afectadas por la deficiencia del complejo I mitocondrial.

Los datos anteriormente descritos pusieron de manifiesto aquellos procesos funcionales alterados por la deficiencia mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO o en las glutamatérgicas vestibulares. A nivel biológico, una de las cuestiones a resolver es qué vías moleculares dentro de las enriquecidas para estas poblaciones neuronales son más vulnerables que otros procesos a la deficiencia mitocondrial, indicando, quizás, alteraciones moleculares asociadas al tipo celular que puedan explicar parte de la susceptibilidad observada a la disfunción mitocondrial. Para solucionar esta cuestión se identificaron aquellos transcritos enriquecidos en condiciones fisiológicas en ambos tipos neuronales, los cuales probablemente definen las funciones específicas o más relevantes de estos tipos neuronales. Para ello, se identificaron aquellos transcritos asociados a ribosoma más enriquecidos ($p_{adj} < 0,05$; $FC > 1$) respecto a los transcritos expresados en las regiones de interés de cada grupo control para el estudio de la población neuronal GAD2- o VGLUT2-positiva (IP_{CT} vs $input_{CT}$).

En el caso de la población GAD2 se identificaron un total de 5.728 transcritos enriquecidos que fueron comparados con el listado de transcritos DAR (reducidos o incrementados) de los ratones *Gad2:RiboTag:Ndufs4cKO* respecto a sus controles. El análisis de ontología génica, mediante la herramienta *online* WebGestalt, de los transcritos enriquecidos en este tipo celular y que se ven afectados por la deficiencia de *Ndufs4* demostró que aquellos grupos funcionales más significativos (False Discovery Rate o $FDR < 0,05$) podían relacionarse con la fosforilación oxidativa y con el procesamiento del ARN, siendo términos relacionados con transcritos DAR principalmente reducidos (Figura 30A).

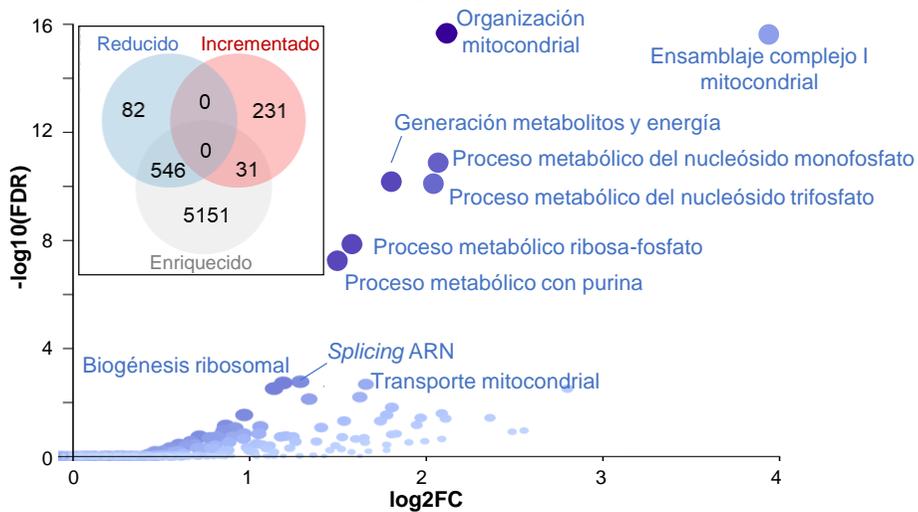
Por otro lado, en la población VGLUT2-positiva se realizó el mismo estudio basándose en los datos de RNA-Seq a P100, dado el potencial patológico de esta

Resultados

etapa. Se identificaron un total de 4.541 transcritos enriquecidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares en condiciones fisiológicas. El análisis de ontología génica, mediante la herramienta *online* WebGestalt, de los transcritos enriquecidos en este tipo celular y que se ven afectados por la deficiencia de *Ndufs4* demostró que aquellos grupos funcionales más significativos (False Discovery Rate o $FDR < 0,05$) se relacionaban con el procesamiento del ARN, la neurotransmisión y la señalización neuropeptídica. En este caso, relacionados con transcritos DAR primariamente incrementados (Figura 30B).

El conjunto de estos datos, junto con la correlación opuesta de los niveles de asociación al ribosoma de los transcritos DAR entre la población VGLUT2- y GAD2- positivas con deficiencia del complejo I mitocondrial (Figura 26), confirmó la presencia de perfiles traduccionales opuestos en poblaciones neuronales distintas con una misma mutación mitocondrial. En este sentido, el procesamiento del ARN sería un proceso relevante en ambas poblaciones, pero exhibiría una afectación opuesta a la disfunción mitocondrial en cada tipo neuronal. Adicionalmente, la vía de señalización por neuropéptidos en las neuronas glutamatérgicas y la fosforilación oxidativa en las GABAérgicas serían procesos enriquecidos a nivel fisiológico altamente susceptibles a la deficiencia de *NDUFS4*. Notablemente, la respuesta de defensa a virus incrementada en la población GABAérgica del BO debido a la deficiencia de *NDUFS4*, podría estar sujeta a una respuesta inducida *de novo*.

A. Perfil traduccional GABAérgico del BO



B. Perfil traduccional glutamatérgico del NV

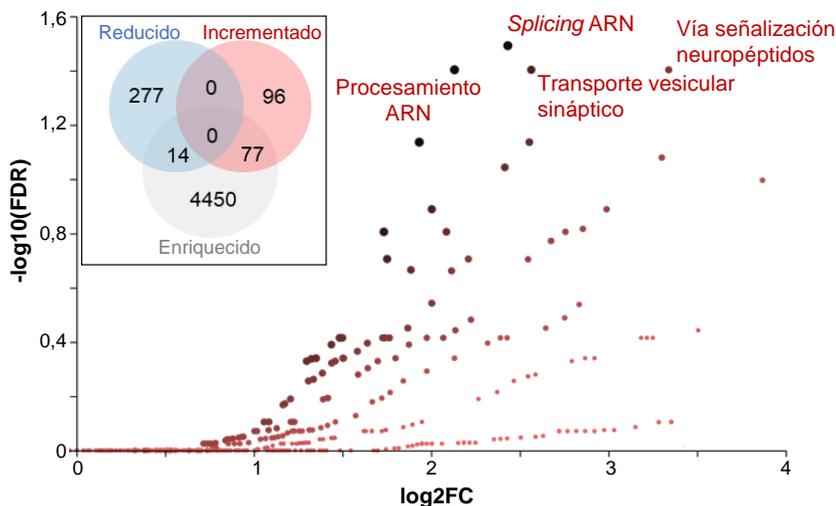


Figura 30. Categorías funcionales enriquecidas en neuronas GABAérgicas del BO o glutamatérgicas vestibulares (NV) que se encuentran alteradas por la deficiencia del complejo I mitocondrial. A) Análisis de ontología génica (Proceso biológico) de los transcritos comunes mostrados en el Diagrama de Venn, en el que se muestra el número de transcritos DAR (Incrementado o reducido) en las neuronas GABAérgicas del BO con deficiencia para NDUF54 comunes con los enriquecidos en esta misma población respecto al total de transcritos del BO en el grupo Gad2:RiboTag:Ndufs4cCT (n=3). B) Análisis de ontología génica (Proceso biológico) de los transcritos comunes mostrados en el Diagrama de Venn, en el que se muestra el número de transcritos DAR (Incrementado o reducido) en las neuronas glutamatérgicas del NV con deficiencia para NDUF54 comunes con los enriquecidos en esta misma población respecto al total de transcritos del NV en el grupo Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT (n=3). FDR: False Discovery Rate; FC: *Fold Change* o cambio relativo.

1.3. Validación de las categorías biológicas potencialmente sobrerrepresentadas por la deficiencia de complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares

La confirmación de los procesos identificados por RNA-Seq alterados en las neuronas VGLUT2 del NV por la deficiencia de NDUFS4 es especialmente relevante teniendo en cuenta que el fenotipo de los ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* recapitula fehacientemente una parte importante de los signos clínicos característicos del SL (Bolea et al., 2019). Específicamente, los problemas respiratorios que padecen estos ratones se asemejan a los descritos en estos pacientes, siendo en la mayoría de los casos la primera causa de muerte en humanos (Sofou et al., 2014). Asimismo, cabe tener en cuenta que la reexpresión de *Ndufs4* únicamente en el NV de ratones *Ndufs4cKO* es suficiente para extender la supervivencia de estos animales y mejorar los problemas respiratorios (Quintana et al., 2012b), destacando la relevancia de esta región cerebral en la progresión de la enfermedad. En consecuencia, los resultados aquí descritos sobre las vías moleculares que gobiernan el perfil traduccional de las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4 suponen una oportunidad para elucidar posibles dianas terapéuticas. En este sentido, se ha procedido a validar, utilizando otras aproximaciones experimentales, los resultados obtenidos del análisis bioinformático para las principales categorías biológicas enriquecidas en los ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* en la fase clínica severa del modelo (P100).

1.3.1. Inducción de la vía de señalización de neuropéptidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia del complejo I mitocondrial

El análisis por RNA-Seq de los transcritos asociados a los ribosomas citosólicos de las neuronas VGLUT2-positivas del NV deficientes para NDUFS4 en ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* en estado patológico avanzado (P100) reveló un incremento de la actividad neuropeptídica evidenciada por un incremento en la asociación al ribosoma de los transcritos *Adcyap1*, *Cartpt*, *Grp*, *Npy*, *Nts*, *Pdyn*, *Sst*,

Tac1, *Penk* y *Ecel1* (Figura 31A). Este incremento se confirmó por qRT-PCR utilizando sondas y cebadores específicos para los transcritos *Adcyap1*, *Sst* y *Npy* en las muestras IP de ensayos RiboTag en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y sus respectivos controles Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100 (Figura 31B). Igualmente, para el transcrito *Adcyap1*, cuya asociación diferencial mostraba la mayor significación estadística, se evaluó por esta misma técnica los niveles de expresión en el conjunto del ARN del NV utilizando las muestras *input* de ensayos RiboTag en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT. Este análisis reveló que la inducción de PACAP (PACAP: *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide*, neuropéptido codificado por el transcrito *Adcyap1*) tenía lugar específicamente en las neuronas VGLUT2 (Figura 31C). Para evaluar si la inducción de PACAP podía ser resultado de un incremento en los niveles basales de una subpoblación de neuronas glutamatérgicas con expresión fisiológica de *Adcyap1* o era una inducción *de novo*, se realizó primero un análisis de los transcritos enriquecidos en las neuronas VGLUT2 en animales control. El análisis de los datos de RNA-Seq de las muestras IP respecto a sus *inputs* en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100 (Figura 31D) identificó los transcritos específicos o enriquecidos en las neuronas glutamatérgicas respecto a los otros tipos celulares del NV. Según este análisis, el transcrito *Adcyap1* se encuentra aproximadamente enriquecido dos veces en la población neuronal VGLUT2 (*Slc17a6*). Asimismo, la realización de un ensayo de hibridación *in situ* con sondas específicas para *Slc17a6* y *Adcyap1* en cortes coronales del NV de animales Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100 confirmó la co-expresión de ambos transcritos a nivel fisiológico a lo largo del NV medial (Figura 31E), incluyendo el área parvocelular (próxima al cuarto ventrículo) y magnocelular (cercana al área con mayor neuroinflamación en el ratón Ndufs4KO). La mayoría de células *Adcyap1*-positivas presentaron marcaje para *Slc17a6*. Estos datos sugirieron que la inducción de PACAP podía fácilmente ser el reflejo de un incremento de los niveles fisiológicos en respuesta a la disfunción del complejo I mitocondrial.

Resultados

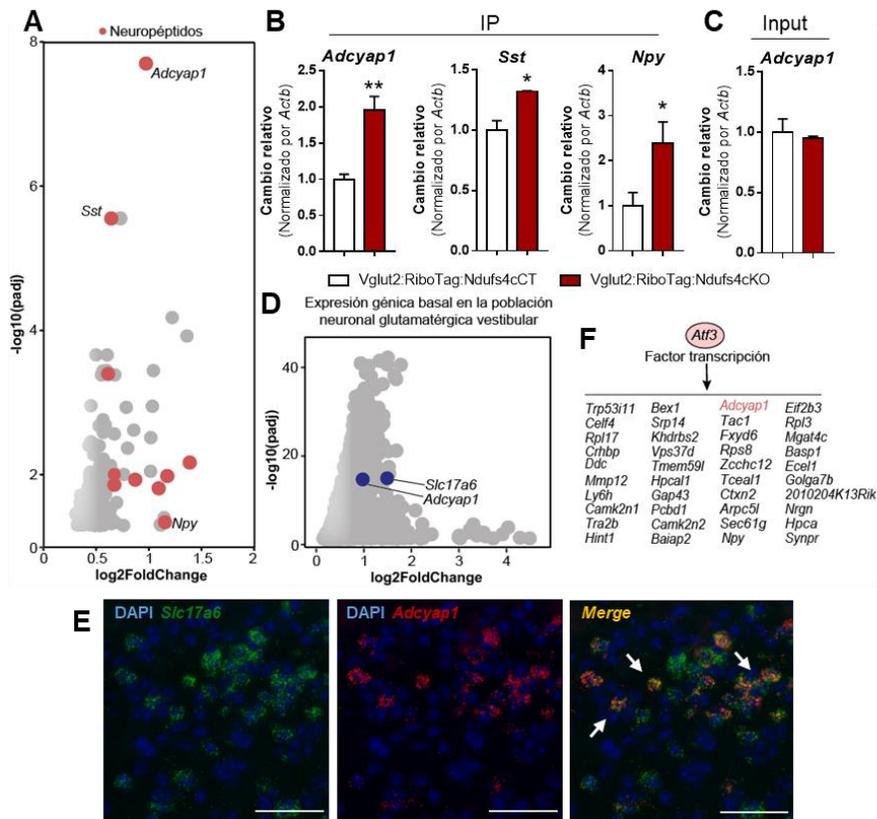


Figura 31. Validación de la inducción de PACAP (*Adcyap1*) y otros neuropéptidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de complejo I mitocondrial en ratones experimentales en comparación a los controles a P100. A) Volcano plot de los transcritos DAR (incrementados) en las IP de ensayos RiboTag en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Cada transcrito se simboliza con un punto, siendo los rojos aquellos relacionados con neuropéptidos. padj: p ajustado; Fold Change: cambio relativo. B) Validación por qRT-PCR de los cambios en los niveles de *Adcyap1*, *Sst* y *Npy* en las IP del ensayo RiboTag de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Los datos representan la media ± SEM analizada por el test estadístico t-student (*Adcyap1* y *Npy*) o Mann-Whitney (*Sst*) (n=3-5, *p<0,05, **p<0,01). C) Cambio de expresión relativo de *Adcyap1* analizado por qRT-PCR en muestras *input* de ensayos RiboTag en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Los datos se representan como la media ± SEM analizada por el test estadístico t-student (n=3). D) Volcano plot donde se muestran los transcritos enriquecidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares (IP) respecto al total del ARN del NV (*input*) en ensayos RiboTag de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100. Los transcritos *Slc17a6* y *Adcyap1* se muestran en azul. E) Hibridación *in situ* en el NV medial utilizando sondas específicas para *Slc17a6* y *Adcyap1* en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT. Las flechas señalan la coexpresión de ambos transcritos en la misma población neuronal (n=3, Escala: 50µm). F) Listado de transcritos inducidos en las neuronas glutamatérgicas vestibulares por la deficiencia de NDUFS4 y potencialmente regulados por el factor de transcripción *Atf3*, también inducido en dicha población neuronal según el análisis por RNA-Seq de los ensayos RiboTag en ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100.

Finalmente, con el fin de establecer los posibles mecanismos moleculares subyacentes a la sobreexpresión de PACAP y de los otros neuropéptidos relacionados con el incremento de actividad neuropeptídica en neuronas VGLUT2 por la deficiencia de NDUF54, se analizaron todos aquellos transcritos DAR con asociación incrementada al ribosoma debida a la disfunción del complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas a P100 con la herramienta iRegulon (Janky et al., 2014), la cual permite identificar la red reguladora transcripcional subyacente a un conjunto de genes. Esta aproximación identificó distintos factores de transcripción candidatos para la regulación de la expresión de *Adcyap1* entre otros. Entre el listado resultante, destacó el factor *Atf3*, el cual según el análisis de los datos de RNA-Seq resultó ser el único factor de transcripción del listado cuyo transcrito mostró un incremento significativo en la asociación al ribosoma de las neuronas VGLUT2 por la deficiencia de NDUF54 tanto en estado temprano (P50) como tardío (P100) de la enfermedad en animales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO*. Asimismo, este factor es capaz de regular la expresión de otros neuropéptidos o factores reguladores de la actividad neuropeptídica como la Sustancia P (*Tac1*), el Neuropéptido Y (*Npy*) o la enzima convertidora de endotelina tipo-I (*Ecel1*) (Figura 31F), señalando una potencial vía de investigación en la regulación de la vía de señalización de neuropéptidos en el contexto de enfermedad mitocondrial.

Cabe tener en cuenta que los transcritos con expresión diferencial debida a la deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas a P100 reflejan el perfil traduccional en un estado avanzado de la enfermedad, en el que probablemente la población neuronal analizada se haya reducido debido a la muerte neuronal de subpoblaciones específicas, tal y como se sugirió en Quintana et al., 2010. En este sentido, el análisis proteico por Western blot de los niveles de RPL22·HA normalizados por β -actina, como reflejo del número de neuronas VGLUT2, en animales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* y *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* a P100 reveló aproximadamente la mitad de Rpl22·HA en el grupo experimental en comparación al grupo control

Resultados

(Figura 32A). Igualmente, la cuantificación del número de células HA-positivas (VGLUT2-positivas) detectadas por inmunofluorescencia en el NV de animales experimentales confirmó la presencia de aproximadamente un 50% menos de células con marcaje para HA en comparación a los controles (Figura 32B-C). Así mismo, se pudo observar *in situ* que el área que presentaba una mayor astrogliosis en los ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* (la zona magnocelular del NV medial) exhibía una menor densidad de células HA-positivas que el grupo control. En consecuencia, el posible incremento en la actividad neuropeptídica detectada por la deficiencia de *NDUFS4* en las neuronas *VGLUT2* tiene lugar en las células glutamatérgicas supervivientes, probablemente del área parvocelular, indicando un posible factor de resistencia neuronal a la falta de *NDUFS4*.

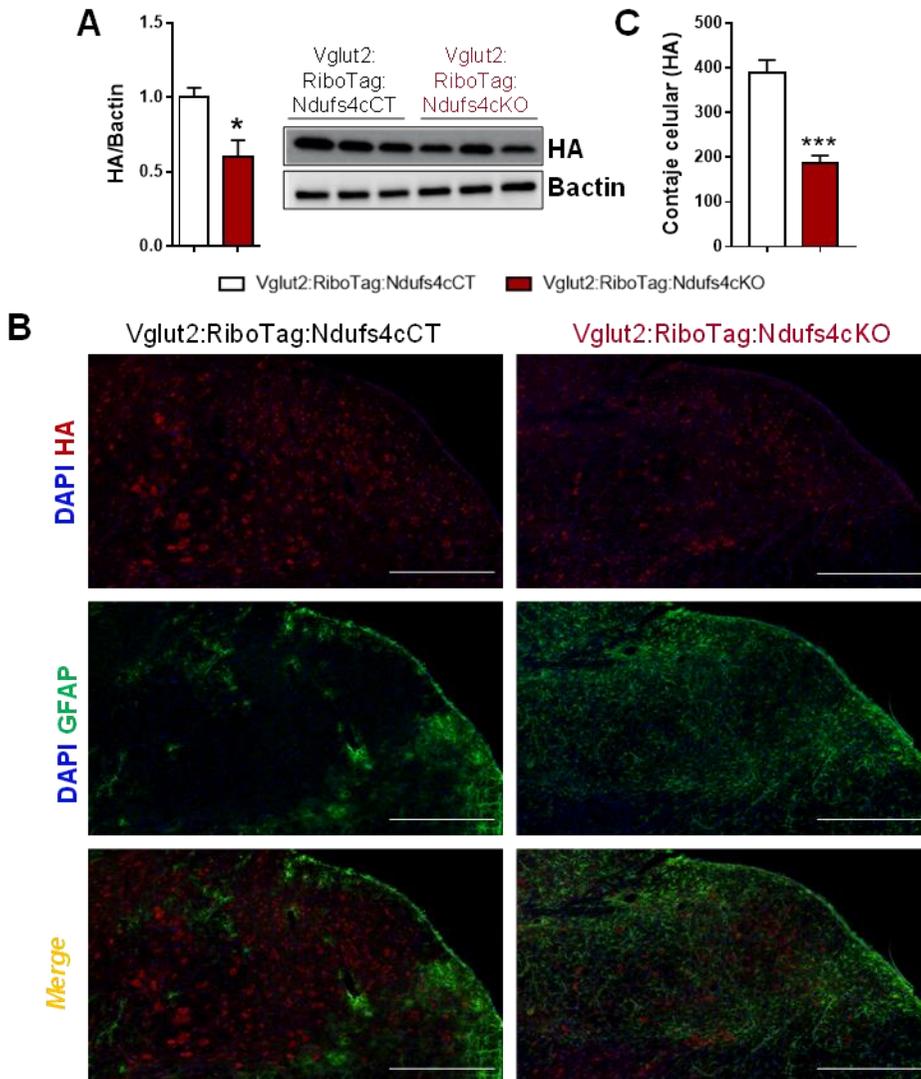


Figura 32. Análisis del nivel de muerte de neuronas VGLUT2 en el NV de ratones con deficiencia de complejo I mitocondrial en este mismo tipo celular. A) Análisis por Western blot de los niveles de RPL22·HA (HA) y β -Actina en lisados de NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Los niveles de β -Actina se utilizaron como control de carga y para la normalización de los valores de RPL22·HA. Se representan los datos como la media \pm SEM analizados por el test estadístico t-student ($n=3$, $*p<0,05$). B) Análisis por inmunofluorescencia del número y localización de células positivas para RPL22·HA (HA) y GFAP en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100. RPL22·HA se utilizó como marcador de neuronas VGLUT2. GFAP se utilizó como marcador de astrocitos. Escala: 500 μ m. C) Cuantificación del número de células positivas para RPL22·HA (HA) en el NV de animales Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT a P100 detectadas por inmunofluorescencia (panel B). Los datos están representados como la media \pm SEM analizado por t-student ($n=3$, $***p<0,001$).

1.3.2. Comprobación de la activación de la biogénesis ribosomal en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de complejo I mitocondrial

Los datos de secuenciación masiva de las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUF54 mostraron un incremento de múltiples transcritos relacionados con la biogénesis ribosomal a P100 (*Rpl41*, *Rpl28*, *Rpl37a*, *Rpl37*, *Rpl12*, *Rps7*, *Rps3a1*, *Rpl36a*, *Rpl17*, *Rpl3*, *Rpl19*, *Rpl30*, *Rpl26*, *Rps12*, *Rps24*, *Rps20*, *Rps12*, *Mcts1*, *Rpl11*, *Fau*, *Rps28*, *Rprm*, *Rps8*) (Figura 33A). Datos que fueron posteriormente confirmados por qRT-PCR utilizando sondas y cebadores específicos para los transcritos *Rpl41*, *Rpl37* y *Rpl28* (Figura 33B).

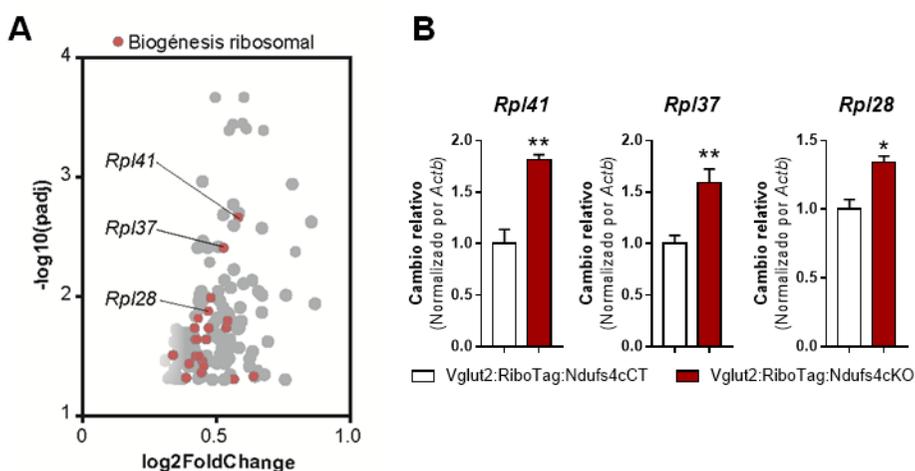


Figura 33. Confirmación del enriquecimiento de transcritos asociados al ribosoma relacionados con la biogénesis ribosomal citosólica como un proceso inducido por la deficiencia de NDUF54 en las neuronas glutamatérgicas vestibulares. A) Volcano plot de los transcritos DAR (incrementados) en las IP de ensayos RiboTag en el NV de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Cada transcrito se simboliza con un punto, siendo los rojos aquellos relacionados con la biogénesis ribosomal. *padj*: p ajustado; *Fold Change*: cambio relativo. B) Validación por qRT-PCR del cambio relativo en los niveles de *Rpl41*, *Rpl37* y *Rpl28* en las IP de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO respecto a sus controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. Los datos representan la media \pm SEM analizada por el test estadístico t-student ($n=3-5$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

La biogénesis ribosomal está altamente regulada por la vía de señalización de nutrientes de la proteína quinasa mTOR, a nivel de transcripción, procesamiento de los ARNr y traducción de las distintas subunidades (Mayer and Grummt,

2006). Concretamente, se ha sugerido que el complejo I de mTOR (mTORC1) podría regular la transcripción de ciertas subunidades ribosomales y del ARNr, a través de la fosforilación de las polimerasas I, II y III (Iadevaia et al., 2014). En este sentido, el aumento en la asociación al ribosoma de transcritos relacionados con la biogénesis ribosomal podría reflejar la activación de la vía de mTORC1, que además de controlar la síntesis de ribosomas, activaría la traducción (Laplante and Sabatini, 2009).

De manera notable, la inhibición de la vía de mTORC1, por administración diaria de rapamicina en ratones *Ndufs4KO*, es capaz de prolongar la supervivencia y mejorar el fenotipo patológico de este animal (Johnson et al., 2013), sugiriendo que la activación (o sobre-activación) de la vía de mTOR sería perjudicial en caso de la deficiencia del complejo I mitocondrial. Teniendo en cuenta estos datos, y con el objetivo de determinar si la inducción de la biogénesis ribosomal por deficiencia de *NDUFS4* en las neuronas glutamatérgicas vestibulares es un reflejo de la activación de la vía de mTOR, se analizó, por Western blot, el nivel de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (RPS6) en los ribosomas de estas neuronas (Figura 34). Esta proteína es fosforilada en residuos específicos por la quinasa *S6K1*, activada por mTORC1. A pesar de que no está bien definida la función exacta de dicha modificación postraduccional, el nivel de fosforilación de RPS6 es considerado clásicamente como un marcador directo de actividad neuronal y de activación de la vía de mTOR (Biever et al., 2015). Así pues, se cuantificaron los niveles de fosforilación de RPS6 (pS6), y se normalizaron por los niveles totales de RPS6 (S6) en lisados de NV (muestras *input*; Figura 34A) y en los ribosomas de las neuronas glutamatérgicas vestibulares (muestras IP; Figura 34B) de ensayos RiboTag en ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* y sus respectivos controles. Concretamente, se analizó la fosforilación en varios residuos de serina (Ser) de la proteína RPS6, los cuales se ha sugerido sufren la fosforilación de manera secuencial, en función del grado de activación neuronal. En primer lugar, se produciría la fosforilación en las Serinas 235 y 236 (detectadas por el anticuerpo fosfo-específico anti-Ser^{235/236})y, en segundo lugar,

Resultados

en las serinas 240 y 244 (detectadas por el anticuerpo fosfo-específico anti-Ser^{240/244}). Esta última sería un indicador más robusto de activación neuronal (Knight et al., 2012). Contrariamente a lo esperado, el nivel de fosforilación en estos residuos, tanto en el área del NV como en las neuronas glutamatérgicas vestibulares, indicó niveles sin diferencias estadísticamente significativas al grupo control. De manera interesante, el nivel de activación neuronal analizado por el nivel de fosforilación de estos residuos sugeriría un grado de activación inferior en comparación al grupo control.

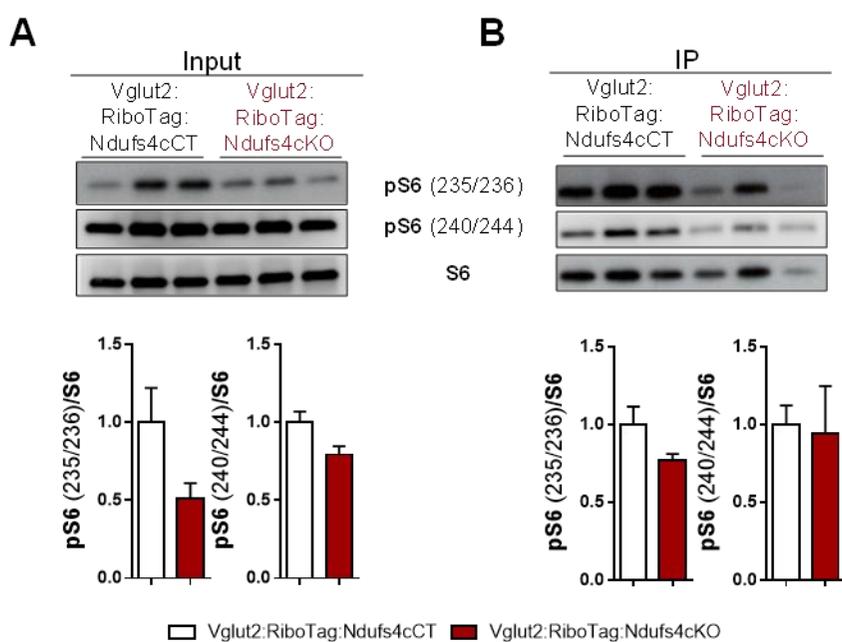


Figura 34. Estudio de la fosforilación de la proteína ribosomal RPS6 en ensayos RiboTag de ratones Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO y sus respectivos controles. Análisis por Western blot de los niveles de fosforilación de RPS6 (pS6) en los residuos Ser^{235/236} y Ser^{240/244} y de los niveles totales de RPS6 (S6) en (A) lisados de NV (*inputs* de ensayos RiboTag) o (B) ribosomas de neuronas glutamatérgicas del NV (IP de ensayos RiboTag) en los ratones experimentales (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO) y sus respectivos controles (Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT) a P100. En la parte inferior de cada gel, se muestra la cuantificación de los niveles de pS6 normalizados por la cantidad total de S6 como las medias \pm SEM analizados por el test estadístico t-student (n=3).

Asimismo, el análisis *in situ* por inmunofluorescencia para pS6 y HA (como marcador de neuronas VGLUT2) en cortes coronales del NV de ratones *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* y *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* mostró una pérdida de neuronas positivas para pS6 acompañada de una disminución en el número de células con marcaje para HA (Figura 35), sugiriendo que el incremento de la biogénesis ribosomal a nivel de transcrito observado en las neuronas glutamatérgicas vestibulares no derivaría de una activación de la vía de mTOR, al menos no reflejo de la fosforilación de RPS6. No obstante, es interesante destacar que en este mismo ensayo se detectó una población VGLUT de gran tamaño con altos niveles basales de pS6, especialmente susceptible a la deficiencia de NDUFS4, sugiriendo que la actividad de mTOR por esta vía (pS6) sí podría ser perjudicial en caso de disfunción mitocondrial.

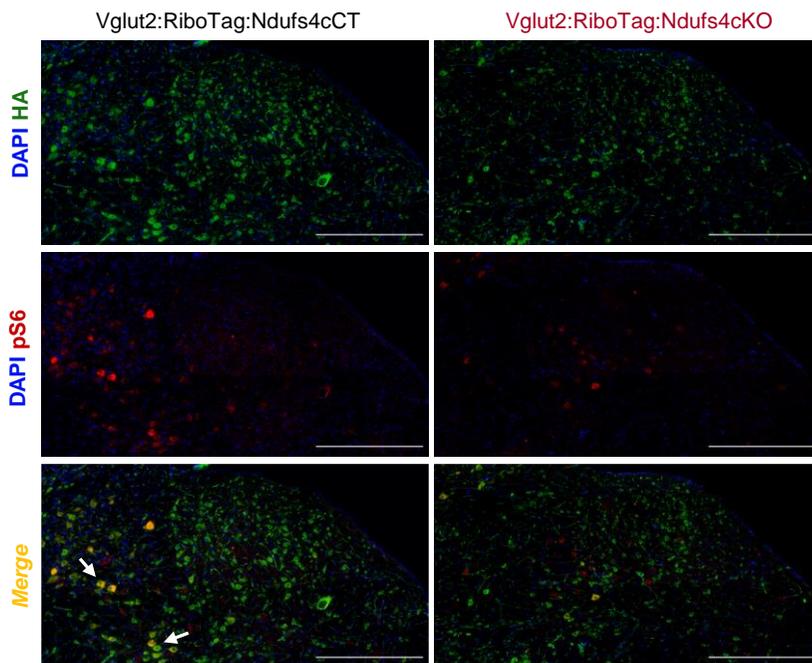


Figura 35. Análisis *in situ* de los niveles de pS6 en el NV de ratones deficientes para NDUFS4 en neuronas VGLUT2 y sus respectivos controles. Análisis por inmunofluorescencia del marcaje para pS6 (Ser^{235/236}) y RPL22-HA (HA) en secciones coronales del NV de ratones controles *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cCT* y experimentales *Vglut2:RiboTag:Ndufs4cKO* a P100. El marcaje con DAPI se utilizó como contraste nuclear. Las flechas señalan aquellas células HA-positivas de gran tamaño con altos niveles basales de pS6 presentes en el grupo control que disminuyen en número en el grupo experimental en etapa patológica severa (n=3). Escala: 500µm.

2. Desarrollo y validación de un método para el aislamiento de transcritos asociados al ribosoma mitocondrial de tipos celulares específicos

La comunicación entre el genoma nuclear y el mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Cambios en la regulación transcripcional de uno tienen un impacto directo en la del otro y viceversa (Quirós et al., 2016; Mottis et al., 2019). Asimismo, estos cambios son especialmente sensibles a cambios del contexto ambiental y celular (Dubinsky, 2009; Vafai and Mootha, 2012). Por tanto, en el caso de deficiencia mitocondrial es especialmente relevante entender, con resolución celular y temporal, ambos perfiles transcripcionales para poder elucidar posibles dianas terapéuticas. En este sentido, y como se ha comentado anteriormente, a diferencia de las herramientas para el análisis del ARNm asociado a ribosoma citosólico de tipos celulares específicos, actualmente no existen herramientas para analizar el traductoma mitocondrial a este nivel. Con el objetivo de superar dicha limitación, en esta tesis doctoral se ha diseñado, desarrollado y validado un vector viral adenoasociado (AAV-DIO-MitoRiboTag) que introduce, de manera Cre-dependiente, una marca genética en el ribosoma mitocondrial que permite el aislamiento de los transcritos asociados en tipos celulares genéticamente definidos.

2.1. Diseño y generación de la herramienta MitoRiboTag

El vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag codifica para una proteína de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (MRPL44) fusionada a la proteína fluorescente eYFP (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*). Esta secuencia se encuentra invertida entre dos secuencias lox y solo se expresa en presencia de la recombinasa Cre (tecnología DIO, Sohal et al., 2009), permitiendo la reversión de la secuencia MRPL44·eYFP (Figura 36A). Gracias al promotor de EF1a (*elongation factor 1 α*), al factor de regulación postranscripcional WPRE (*Woodchuck Hepatitis post-transcriptional regulatory element*) y a la secuencia de poliadenilación hGH (*Human growth hormone*)-poli(A), codificadas dentro del

mismo constructo (Powell and Rivera-Soto, 2015), se promueve la transcripción, estabilización y traducción, respectivamente, de la proteína de fusión MRPL44·eYFP que acabará incorporándose en la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial del tipo celular genéticamente definido (Figura 36B).

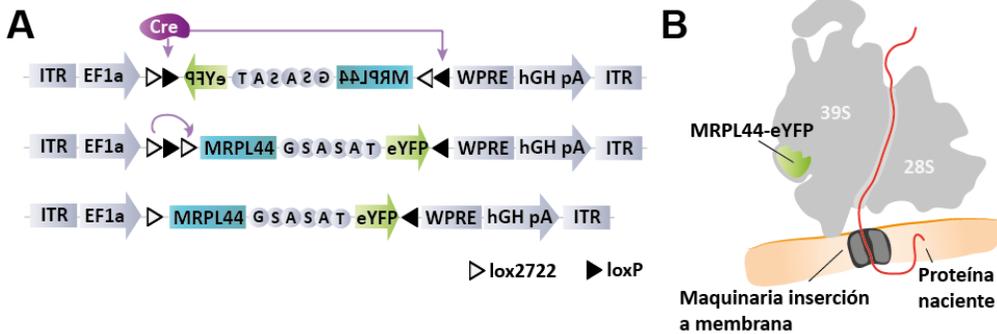


Figura 36. Diseño del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag. A) Representación esquemática del constructo MitoRiboTag y del proceso de recombinación en presencia de la recombinasa Cre (lila). B) Representación del ribosoma mitocondrial en el que se señala la localización de la proteína MRPL44·eYFP.

Una vez obtenido dicho constructo, éste fue encapsulado en un vector viral adenoasociado de serotipo 1 (AAV1). Este serotipo transduce principalmente neuronas, tanto en cultivo celular como *in vivo*, en menor medida también se ha detectado tropismo por otros tipos celulares, como la astrogliá (Castle et al., 2016). No obstante, la expresión de la proteína MRPL44·eYFP es dependiente de la expresión de la recombinasa Cre, restringiendo su expresión al tipo celular de interés. Una vez expresado, la herramienta MitoRiboTag permite la inmunoprecipitación del ribosoma mitocondrial con marcaje eYFP y de los transcritos asociados mediante la incubación con un anticuerpo α -GFP (*Green Fluorescent Protein*). La proteína eYFP es una variante de GFP (Rekas et al., 2002) y el anticuerpo contra esta última presenta reacción cruzada contra eYFP, lo que permite su uso para la inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales marcados con eYFP. De forma análoga a la metodología RiboTag, consecutivamente a la inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales de

Resultados

interés, se puede aislar el ARNm codificado en el ADNmt o mt-ARNm asociado, permitiendo el análisis posterior del traductoma mitocondrial (Figura 37).

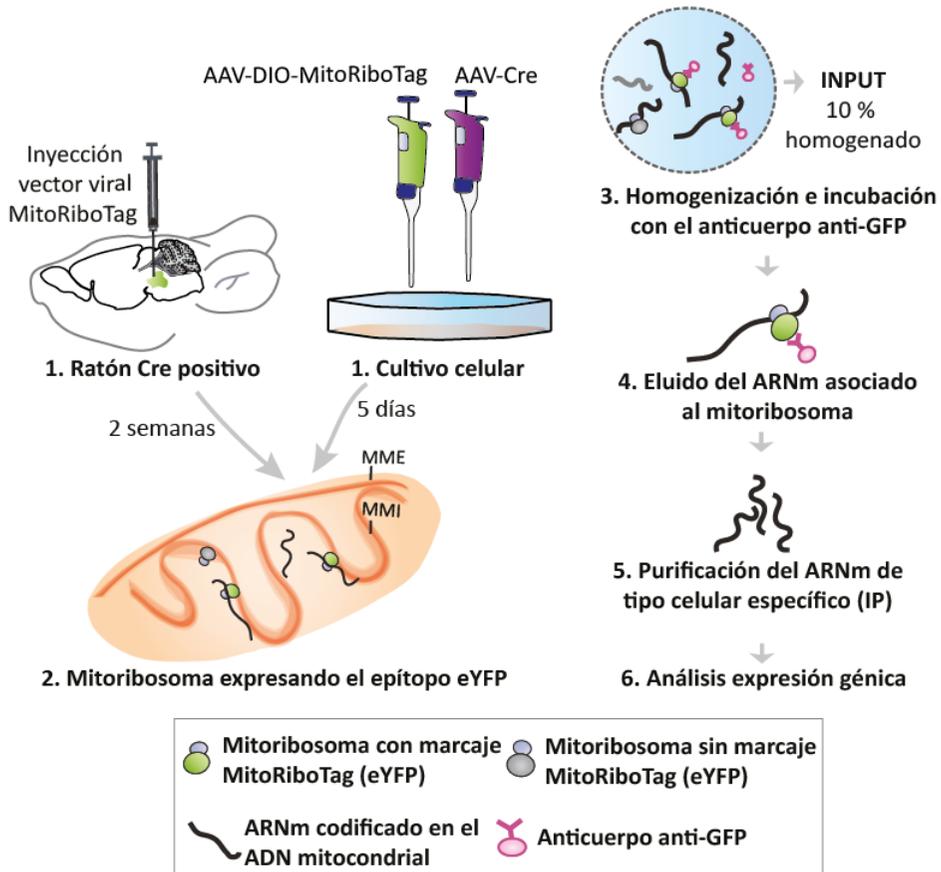


Figura 37. Estrategia MitoRiboTag para la inmunoprecipitación de los ARNm asociados a ribosoma mitocondrial con resolución de tipo celular específica. El AAV-DIO-MitoRiboTag puede transducir células tanto *in vivo* como *in vitro*. Tras su expresión, se procede a la inmunoprecipitación ribosoma mitocondrial (pasos 2-5) y al análisis de los transcritos asociados (paso 6). Durante el proceso, se obtienen dos muestras. La primera representa un 10% del ARN total del homogenado inicial (*input* del ensayo) y la muestra inmunoprecipitada (IP), que contiene el ARNm asociado al ribosoma mitocondrial del tipo celular de interés. MME: membrana mitocondrial externa, MMI: membrana mitocondrial interna.

2.2. Validación en cultivo celular de la técnica MitoRiboTag

Con el propósito de validar la Cre-dependencia en la expresión del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag, se transdujeron las células HEK293T con dicho vector viral y un vector viral codificante para la recombinasa Cre.

El análisis proteico por Western blot con el anticuerpo α -GFP y α -MRPL44 determinó que la expresión de la proteína fusión MRPL44-eYFP en las células HEK293T se producía únicamente en aquellas células transducidas con el vector viral codificante para la recombinasa Cre (AAV-CreEGFP) (Figura 38A), demostrando que la expresión del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag es Cre-dependiente. Este mismo análisis permitió observar la coexistencia de la proteína *wild type* MRPL44 junto a la proteína fusión MRPL44-eYFP. Mientras que la proteína *wild type* presentaba un peso molecular alrededor de 42kDa de acuerdo con lo esperado, la proteína MRPL44-eYFP presentaba un peso molecular superior alrededor de los 60kDa, en consonancia con la adición de la proteína eYFP. Por otro lado, la coexistencia de ambas proteínas indicó que la expresión del vector viral o su simple presencia no parece impactar en la expresión del gen endógeno y su procesamiento. No obstante, esto podría implicar una posible competencia entre ambas proteínas en la incorporación final en el ribosoma mitocondrial.

Por otro lado, el ensayo por inmunofluorescencia (Figura 38B) con el anticuerpo α -GFP (marcador de la expresión del AAV-DIO-MitoRiboTag) en células transducidas con el AAV-DIO-MitoRiboTag y AAV-Cre (codificante para la recombinasa Cre) permitió la visualización de la proteína MRPL44-eYFP (GFP) en cultivo celular y demostró su localización en la mitocondria mediante co-marcaje con el anticuerpo anti-TOM20 (marcador de la membrana externa mitocondrial).

A continuación, con la finalidad de validar la capacidad de aislar el mt-ARNm asociado al ribosoma mitocondrial a través de la inmunoprecipitación de MRPL44-eYFP, se realizó la incubación con anti-GFP y la posterior extracción del

Resultados

ARN de igual modo que con la herramienta RiboTag (Sanz et al., 2009). El análisis de las especies de ARNr presentes en el ARN total aislado mostró que mientras las muestras *input* del ensayo MitoRiboTag contenían principalmente ARNr de origen citosólico (28s y 18s), la muestra IP del mismo ensayo presentaba mayoritariamente ARNr de origen mitocondrial (16s y 12s), únicamente obtenido en presencia de la recombinasa Cre. Adicionalmente, se verificó la obtención de un ARN integro, sin productos de degradación, siendo apto para análisis posteriores (Figura 38C). Así, se comprobó por qRT-PCR que el mt-ARNm inmunoprecipitado estaba enriquecido para los transcritos codificados en el genoma mitocondrial *MTND2* y *MTATP6* en comparación a su *input* (Figura 38D). El conjunto de estos resultados expuso que, de manera Cre-dependiente, la expresión del constructo MitoRiboTag *in vitro* permite la incorporación de la proteína de fusión MRPL44-eYFP en el ribosoma mitocondrial, incluso en competencia con la proteína MRPL44 endógena, y la posterior inmunoprecipitación de los transcritos asociados.

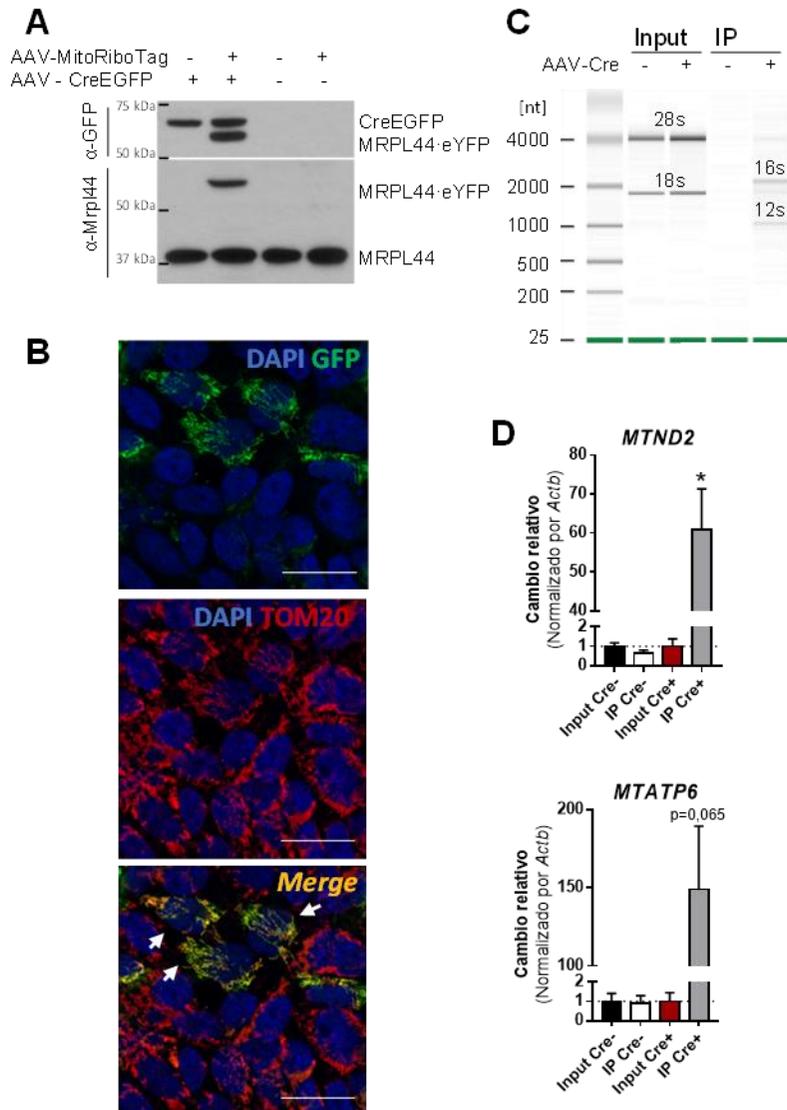


Figura 38. Caracterización de la expresión del vector viral MitoRiboTag en cultivo celular. A) Análisis por Western blot para las proteínas GFP y MRPL44 en cultivos de células HEK293T transducidas con/sin AAV-MitoRiboTag y con/sin AAV-CreEGFP. B) Inmunofluorescencia para GFP (MitoRiboTag) y TOM20 (proteína de la membrana externa mitocondrial) en cultivo de HEK293T transducido con AAV-DIO-MitoRiboTag y AAV-Cre. Las flechas indican la co-localización mitocondrial de MRPL44-eYFP con TOM20. Escala: 20 μ m. C) Análisis de las especies de ARNr y su integridad en las muestras *input* e *IP* de ensayos MitoRiboTag en cultivos de células HEK293T transducidas con el vector viral MitoRiboTag en presencia (+) o ausencia (-) de la recombinasa Cre (AAV-Cre). D) Análisis por qRT-PCR de los niveles de los transcritos *MTND2* y *MTATP6* en las muestras *IP* respecto sus *inputs* en cultivos de células HEK293T transducidas con AAV-MitoRiboTag con/sin AAV-Cre. Se representan las medias \pm SEM analizadas con la prueba t-student comparando las muestras *IP* respecto sus *input* (n=2, *p<0,05).

Resultados

Adicionalmente, con el fin de optimizar los valores de enriquecimiento anteriormente expuestos se tuvo en cuenta dos características diferenciales entre la estrategia RiboTag y la MitoRiboTag. En primer lugar, el ribosoma mitocondrial se encuentra encapsulado dentro de la mitocondria asociado a la membrana interna, añadiendo una barrera adicional para su aislamiento en comparación al ribosoma citosólico. En este sentido, el detergente no iónico digitonina ha demostrado tener una buena capacidad de permeabilización de las dos membranas mitocondriales en concentraciones superiores al 0,2% (peso/volumen) (Leister and Herrmann, 2007). Esto permitiría una liberación del ribosoma mitocondrial, evitando la contaminación de otras proteínas asociadas a membrana (Busch et al., 2019). En segundo lugar, el tampón de homogenización para aislar el ribosoma citosólico contiene cicloheximida, un compuesto capaz de bloquear la traducción citosólica pero no la mitocondrial. A este respecto, el cloranfenicol es un antibiótico capaz de bloquear la síntesis proteica bacteriana de manera reversible, así como la mitocondrial, sin provocar la degradación del complejo ribosomal y evitando un potencial *run-off* ribosomal (avance del ribosoma activo) con la consecuente pérdida de transcritos asociados (Richter et al., 2013).

Así pues, se introdujo un 0,5% (peso/volumen) de digitonina en el tampón de homogenización inicial y un 0,1% en los lavados finales, con el propósito de permeabilizar la membrana mitocondrial. Asimismo, también se introdujo 100 µg/ml de cloranfenicol con el fin de evaluar su efecto sobre el enriquecimiento de los transcritos inmunoprecipitados (mt-ARNm) en los ensayos MitoRiboTag. Igualmente, en todos los ensayos MitoRiboTag se mantuvo el uso de la cicloheximida en el tampón con el fin de poder combinar las herramientas RiboTag y MitoRiboTag en un mismo homogenado. Ambas variables, digitonina y cloranfenicol, fueron evaluadas en cultivo celular, por separado y en combinación. Los valores de enriquecimiento en los ensayos MitoRiboTag demostraron que el uso de la digitonina permitía obtener un enriquecimiento mayor para *MTND2* y *MTATP6* (mt-ARNm) en las muestras IP

respecto a sus *inputs* (Figura 39). En paralelo, se evaluó la presencia/ausencia de cloranfenicol con la digitonina, que introdujo una mayor variabilidad interindividual en los resultados obtenidos y, en cualquier caso, no demostró una mejora adicional al uso de la digitonina por si sola (Figura 39). Esto podría explicarse por la disrupción mecánica del entorno del complejo del ribosoma mitocondrial durante la homogenización, que produciría una parada inmediata de la síntesis proteica que evita el *run-off* ribosomal, lo cual explicaría la falta de efecto de la adición de cloranfenicol en la mejora del enriquecimiento para los transcritos mitocondriales.

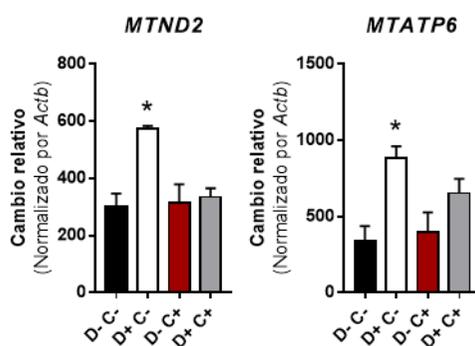


Figura 39. Optimización del tampón de homogenizado para la inmunoprecipitación de los ribosomas mitocondriales de interés mediante la tecnología MitoRiboTag en cultivo celular de células HEK293T. Análisis del enriquecimiento obtenido por qRT-PCR de los transcritos *MTND2* y *MTATP6* de muestras inmunoprecipitadas relativas a su *input* por el método MitoRiboTag con digitonina (D±) y/o cloranfenicol (C±). Se representan las medias ± SEM analizadas por la prueba t-student comparando cada condición con el grupo D-C- (n=2, *p-valor<0,05).

2.3. Aplicabilidad de la tecnología MitoRiboTag en tejidos complejos *in vivo*

Una vez verificadas la dependencia a la recombinasa Cre, la localización mitocondrial y la utilidad para el aislamiento de transcritos asociados al ribosoma mitocondrial (mt-ARNm) del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag en cultivo celular, se determinó su eficiencia *in vivo*. Para ello, se inyectó el vector viral bilateralmente en el NV de ratones Vglut2:Ndufs4cCT. Estos animales

Resultados

expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de *Slc17a6* (VGLUT2) y son heterocigotos para *Ndufs4* (*Slc17a6^{Cre}:Ndufs4^{Δ/+}*). Después de un mínimo de dos semanas para permitir la expresión del constructo y la disminución de los procesos inflamatorios causados por la cirugía estereotáxica y el propio AAV (Mastakov et al., 2002; Armstrong and Tasker, 2014), se confirmó su expresión en las neuronas glutamatérgicas por inmunofluorescencia e hibridación *in situ*. El análisis por inmunofluorescencia con un anticuerpo α -GFP demostró la expresión proteica del constructo en el área del NV (Figura 40A), mostrando un marcaje consistente con la presencia de la proteína MRPL44·eYFP a nivel neuronal (Figura 40B). No obstante, para demostrar que la expresión se producía únicamente en las neuronas glutamatérgicas (VGLUT2), se realizó un ensayo de hibridación *in situ* de doble marcaje con sondas específicas para *eYFP* y *Slc17a6*, como marcadores para el constructo MitoRiboTag y de neuronas glutamatérgicas, respectivamente. Este ensayo confirmó que la expresión del transcrito *Mrpl44·eYFP* se restringía en aquellas células con expresión de *Slc17a6*, confirmando la dependencia para la recombinasa Cre del transgén. A diferencia de un animal transgénico, la transducción del vector viral MitoRiboTag induce el marcaje del ribosoma mitocondrial con restricción anatómica-temporal, evitando la recombinación indeseada debida a la expresión transitoria de la recombinasa Cre en diferentes fases del desarrollo (Song and Palmiter, 2018; Luo et al., 2020; Stifter and Greter, 2020).

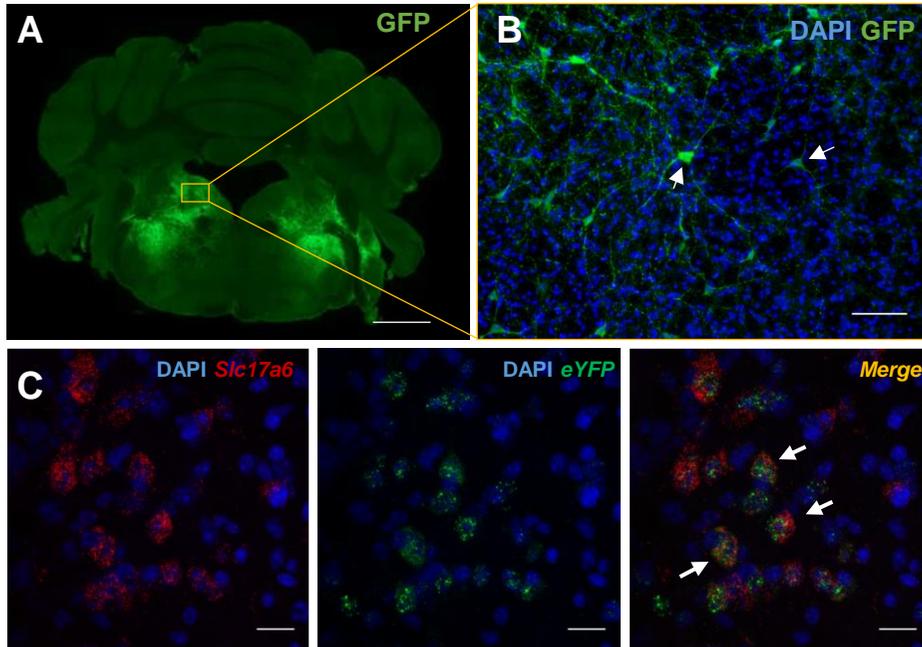


Figura 40. Expresión del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag *in vivo* en ratones Vglut2:Ndufs4cCT. A) Análisis por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-GFP en cortes coronales de ratones Vglut2:Ndufs4cCT transducidos con el vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag de manera bilateral en el NV (n=3). Escala: 1mm. B) Magnificación del panel A (NV) con marcaje nuclear por DAPI y GFP (ribosomas mitocondriales con marcaje eYFP). Las flechas indican neuronas individuales con expresión del vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag. Escala: 100µm. C) Hibridación *in situ* con las sondas para *Slc17a6* (marcador glutamatergico) y *eYFP* (marcaje para MitoRiboTag) en cortes coronales del NV en ratones Vglut2:Ndufs4cCT transducidos con el vector viral MitoRiboTag (n=3). Escala: 20µm. Las flechas señalan aquellas células con co-hibridación de ambas sondas.

Una vez comprobada la expresión *in vivo* del constructo MitoRiboTag, se procedió a evaluar la eficiencia de la inmunoprecipitación del ribosoma mitocondrial-eYFP y el aislamiento del mt-ARNm asociado a este. Siguiendo con los resultados obtenidos en cultivo celular, se evaluó también *in vivo* el efecto de la digitonina en el tampón de homogenización para los ensayos MitoRiboTag en ratones Vglut:Ndufs4cCT. De nuevo, la comparativa entre el enriquecimiento en las muestras IP respecto a sus *inputs* para el transcrito *Nd2* con digitonina demostró un incremento significativo en comparación a los ensayos sin digitonina (Figura 41A).

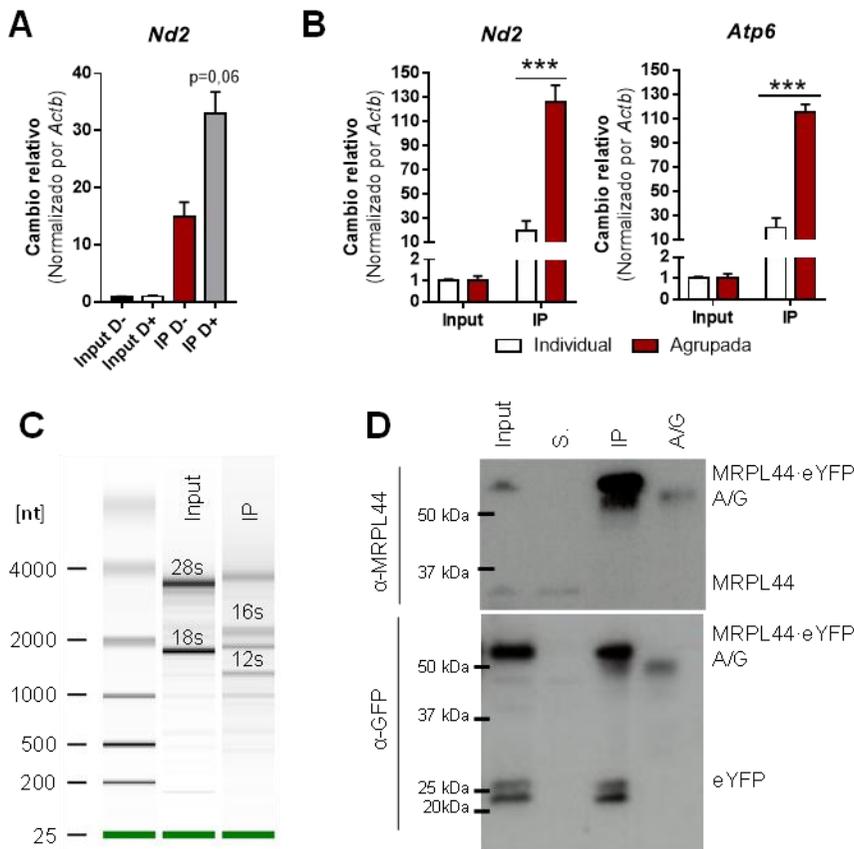


Figura 41. Análisis de la eficiencia de la metodología MitoRiboTag *in vivo*. A) Análisis por qRT-PCR del enriquecimiento para el transcrito *Nd2* en muestras inmunoprecipitadas (IP) respecto a sus *inputs* en ensayos MitoRiboTag con un tampón de homogenización con (+) o sin (-) digitonina (D). El ensayo MitoRiboTag se realizó en muestras individuales de NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* transducidos con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag. Se representan las medias \pm SEM analizadas por el test estadístico Kruskal-Wallis ($n=2$). B) Análisis por qRT-PCR del enriquecimiento de los transcritos mitocondriales *Nd2* y *Atp6* en muestras IP respecto a sus *inputs* de ensayos MitoRiboTag en muestras individuales (1 animal/IP) o agrupadas (4 animales/IP) de disecciones de NV en ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* inyectados con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag. Se representan las medias \pm SEM analizadas por el test estadístico Two-way ANOVA con comparaciones múltiples Sidak's ($n=2-4$, *** p -valor $<0,001$). C) Análisis de las especies de ARNr y su integridad en las muestras *input* e IP de ensayos MitoRiboTag (agrupada) en disecciones de NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* transducidos con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag. Se puede observar que mientras la muestra INPUT contiene principalmente ARNr de origen citosólico (28s y 18s), la IP contiene aproximadamente un 50% de citosólico y un 50% de mitocondrial (16s y 12s). Ambas muestras carecen de signos de degradación. D) Análisis por Western blot de la eficiencia de la inmunoprecipitación en ensayos MitoRiboTag utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-MRPL44 para la determinación de los niveles de MRPL44-eYFP. Los ensayos MitoRiboTag fueron realizados en disecciones de NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cCT* transducidos con el vector AAV-DIO-MitoRiboTag. S: Sobrenadante; A/G: proteína A/G presente en las bolas magnéticas utilizadas en la inmunoprecipitación.

Adicionalmente, la eficiencia de la técnica MitoRiboTag *in vivo* depende de la correcta inyección del vector viral en las coordenadas correctas, teniendo en cuenta la variabilidad anatómica de cada animal y del proceso estereotáxico (Armstrong and Tasker, 2014). Por este motivo, la utilización de animales individuales para los ensayos MitoRiboTag conllevaba un riesgo inherente de bajo rendimiento y de elevada variabilidad entre los diferentes ensayos, que podría reducirse significativamente si los ensayos se realizaban con agrupaciones de tejido de varios animales. Por ello, además de la optimización de las coordenadas de inyección con el fin de reducir la variabilidad interindividual de cada cirugía, se realizó el ensayo MitoRiboTag con digitonina en muestra individual y en muestra agrupada (agrupación de tejido de 4 ratones). La comparativa de estos resultados demostró que mientras los ensayos MitoRiboTag individuales, procesados de un único NV de un ratón Vglut2:Ndufs4cCT inyectado, las cantidades de ARN aisladas finales eran muy variables (0-2 ng totales), las muestras agrupadas eran más reproducibles y superiores en cantidad (~20 ng totales), facilitando así su posterior análisis. Asimismo, se determinó un enriquecimiento significativamente superior para los transcritos *Nd2* y *Atp6* en los ensayos MitoRiboTag para las muestras agrupadas en comparación a las individuales (Figura 41B). Esto, además de ser el resultado de corregir la variabilidad interindividual con los ensayos MitoRiboTag en las muestras agrupadas, también podría explicarse por la presencia de una mayor cantidad de MRPL44-eYFP disponible para la inmunoprecipitación en estas muestras. Asimismo, el análisis de las especies de ARNr en los *inputs* e IP de muestras agrupadas confirmó un incremento de los ARNr mitocondriales en las muestras IP respecto a sus *inputs*, además de una calidad óptima para su análisis posterior. No obstante, a diferencia de los resultados *in vitro*, las muestras IP de ensayos MitoRiboTag *in vivo* contienen aproximadamente un 50% de ARNr de origen citosólico (Figura 41C). Este resultado podría indicar la posible inmunoprecipitación del ribosoma citosólico en paralelo con el mitocondrial. En conjunto, el uso de la digitonina y la

Resultados

agrupación de tejido de diferentes animales se traducen en un rendimiento superior de la inmunoprecipitación. En este sentido, la determinación por Western blot de la cantidad de MRPL44·eYFP presente en el *input* y en la IP de ensayos MitoRiboTag indicó una recuperación de aproximadamente el 90% del contenido de MRPL44·eYFP en los *input* mediante la inmunoprecipitación (Figura 41D).

En conjunto, los resultados en cultivo celular e *in vivo* de la aplicación de la herramienta MitoRiboTag demostraron el potencial de esta técnica para analizar el traductoma mitocondrial de tipos celulares específicos en tejidos complejos, como el cerebro.

3. Análisis del traductoma mitocondrial en las neuronas vestibulares glutamatérgicas con deficiencia de complejo I mitocondrial

Una vez completada la validación y optimización de la técnica MitoRiboTag *in vivo*, se procedió a analizar los cambios en los niveles de transcritos asociados al ribosoma mitocondrial de las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de NDUFS4. Dada la relevancia de la subpoblación neuronal glutamatérgica vestibular en el fenotipo patológico del ratón NDUFS4KO (Quintana et al., 2012b; Bolea et al., 2019), estos datos, juntamente con el análisis realizado del traductoma citosólico (Sección 1 Resultados), pretenden aportar una visión completa de los cambios moleculares que gobiernan la población neuronal glutamatérgica vestibular sin NDUFS4.

Para llevar a cabo el análisis del traductoma mitocondrial glutamatérgico vestibular, se utilizaron los ratones experimentales Vglut2:Ndufs4cKO y sus controles Vglut2:Ndufs4cCT. Brevemente, estos animales presentan la misma genética que los ratones utilizados para el estudio del traductoma glutamatérgico vestibular citosólico, con la única diferencia que no presentan el locus *Rpl22*^{HA/+}. Así, los ratones experimentales son deficientes para *Ndufs4* únicamente en la población neuronal VGLUT2 (glutamatérgica), mientras que los

ratones control son heterocigotos para el locus *Ndufs4*, siendo fenotípicamente sanos. Cabe destacar, que ambos grupos expresan la recombinasa iCre bajo el promotor del gen del transportador glutamatérgico vesicular *Slc17a6* (*Vglut2*).

Así pues, mediante cirugía estereotáxica se procedió a inyectar bilateralmente en el NV el vector viral AAV-DIO-MitoRiboTag en 12 ratones experimentales y 12 controles a P35, repartiendo equitativamente hembras y machos entre los grupos. Después de un tiempo mínimo de 16 días para permitir la expresión de la subunidad MRPL44-eYFP en las neuronas VGLUT2 y la reducción de los procesos inflamatorios subyacentes a la cirugía estereotáxica, se diseccionó el NV, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó inmediatamente a -80°C . En este caso, al tratarse de un vector viral, como se ha comentado con anterioridad, aunque el AAV-DIO-MitoRiboTag transduzca células VGLUT2-negativas, únicamente se expresará a nivel proteico en aquellas con expresión de la recombinasa Cre que, en este caso, al ser animales adultos con alta probabilidad será únicamente en las neuronas glutamatérgicas.

Para el aislamiento del mt-ARNm asociado al ribosoma mitocondrial de las neuronas glutamatérgicas mediante el ensayo MitoRiboTag se agruparon 4 núcleos vestibulares (2 hembras + 2 machos) por ensayo, obteniendo un tamaño muestral por grupo (n) de 3, asegurando junto con el uso de la digitonina, el mejor rendimiento. Para cada muestra, se obtuvo el ARN total del área diseccionada (*input*) y el mt-ARNm asociado al ribosoma mitocondrial de las neuronas glutamatérgicas (IP).

Tras la cuantificación y valoración de la integridad de la muestra IP, se procedió a analizar por qRT-PCR los niveles de los distintos transcritos codificados en el ADNmt en ratones control y experimentales. Concretamente, se analizaron los niveles de los transcritos del complejo I (*Nd1*, *Nd2*, *Nd3*, *Nd4l/Nd4* y *Nd5/Nd6*), complejo III (*Cytb*), complejo IV (*Cox1*, *Cox2* y *Cox3*) y complejo V (*Atp6* y *Atp8*), en cantidades iguales de las diferentes muestras. Asimismo, se utilizó la cantidad de *Rnr1* para normalizar los valores de los distintos transcritos. En este sentido,

Resultados

Rnr1 codifica para el ARNr 12s de la subunidad menor ribosomal (28S). El ensamblaje del ribosoma mitocondrial se inicia con la unión del mt-ARNm a la subunidad menor (28S) que, posteriormente, recluta la unidad ribosomal mayor (39S) (Boczonadi and Horvath, 2014; Ott et al., 2016; Mai et al., 2017). De este modo, dado que la herramienta MitoRiboTag permite la inmunoprecipitación del ribosoma mitocondrial a través de la subunidad mayor (donde se encuentra la proteína MRPL44-eYFP), la normalización con *Rnr1* asegura la corrección por la cantidad de monosomas mitocondriales (ribosomas mitocondriales completamente ensamblados), ya que, en principio, en los ensayos MitoRiboTag la subunidad menor solo se aislará en caso de estar unida a la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial. Por el contrario, la normalización por los niveles de ARNr de la subunidad mayor del mitorribosoma (ARNr 16S; codificado por el gen *Rnr2*) podría introducir errores en el análisis, ya que tanto los niveles de *Rnr2* de los monosomas (con transcritos asociados) como los de las subunidades mayores sin ensamblar (sin transcritos asociados) contribuirían a la normalización.

Así pues, el análisis de los transcritos codificados en el ADNmt en las IP de los ensayos MitoRiboTag en el NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cKO* reveló que únicamente aquellos codificantes para las subunidades del complejo I mitocondrial mostraron una tendencia a niveles más reducidos en comparación a las IP del grupo control (Figura 42A-B). En este sentido, únicamente el transcrito *Nd1* presentaba unos niveles significativamente reducidos en las IP de ratones *Vglut2:Ndufs4cKO* respecto a sus controles. El análisis de los transcritos codificados en el ADNmt de las diferentes subunidades de los complejos III, IV y V no mostró cambios, sugiriendo que la delección de la subunidad NDUFS4, perteneciente al módulo N del complejo I, provoca una caída significativa únicamente para *Nd1*, situado en el módulo P del complejo.

Notablemente, recientemente hemos publicado el desarrollo de una nueva aproximación molecular para el aislamiento de mitocondrias de poblaciones

celulares específicas (Gella et al., 2020). Con dicha herramienta (mitoTag), se realizó un análisis proteómico de las mitocondrias de las neuronas glutamatérgicas vestibulares de ratones *Vglut2:Ndufs4cKO* y *Vglut2:Ndufs4cCT*. Gracias a este ensayo, se pudo detectar que los niveles de la proteína ND1, en correlación con los resultados obtenidos a nivel de transcrito, presentaban una disminución significativa en las mitocondrias de las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4 en comparación al grupo control. Asimismo, se pudo detectar también que, de una manera menos significativa, las subunidades ND2 y ND5 también sufrían una caída en los niveles proteicos en estas mitocondrias (Figura 42C).

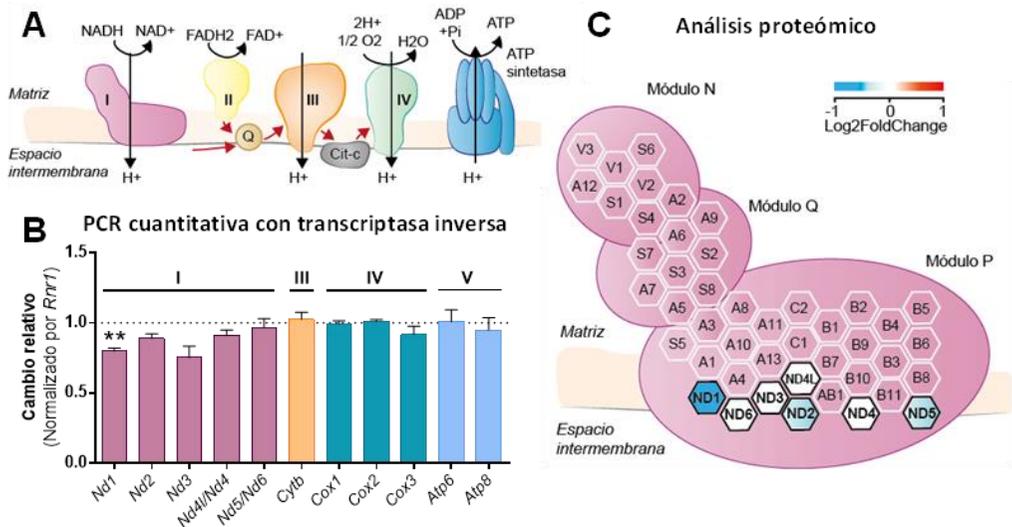


Figura 42. Identificación de los niveles de los transcritos asociados al ribosoma mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares de ratones con deficiencia de complejo I mitocondrial. A) Representación de los complejos integrantes de la fosforilación oxidativa. El color de cada complejo identifica la pertenencia de los transcritos en el panel B. B) Análisis por qRT-PCR de los niveles de los transcritos de los complejos I, III, IV y V codificados en el genoma mitocondrial en las IP de ensayos MitoRiboTag en el NV de ratones *Vglut2:Ndufs4cKO* respecto a sus controles (*Vglut2:Ndufs4cCT*) y normalizados por los niveles de *Rnr1*. Se representan las medias \pm SEM analizadas con la prueba t-student ($n=3$, $**p$ -valor $<0,01$). C) Esquema de las distintas subunidades que componen el complejo I mitocondrial en el que se representa el cambio relativo (Log2FoldChange) analizado por proteómica de las subunidades codificadas en el ADNmt de las neuronas glutamatérgicas vestibulares en ratones *Vglut2:Ndufs4cKO* respecto a ratones *Vglut2:Ndufs4cCT*. Figura adaptada de Gella et al., 2020. FoldChange: cambio relativo.

Discusión

1. El perfil traduccional citosólico define la susceptibilidad neuronal a la deficiencia del complejo I mitocondrial

El Síndrome de Leigh (SL) es una neuropatología, habitualmente mortal, causada por defectos directos en el metabolismo mitocondrial (Chen et al., 2018). Principalmente, el SL afecta a infantes y, aunque tiene un espectro clínico con afectación multisistémica, se caracteriza especialmente por la aparición de problemas neurológicos que resultan en anomalías motoras y alteraciones respiratorias graves (Finsterer, 2008), siendo el fallo respiratorio la principal causa de muerte (Sofou et al., 2014; Gerards et al., 2016). A nivel etiológico, más de 75 genes se han asociado con la aparición del SL (Lake et al., 2016). Debido a la gran diversidad genética y clínica de esta enfermedad, actualmente no existe una cura efectiva (Chen et al., 2018; Schubert and Vilarinho, 2020). A pesar de esta variabilidad, los pacientes con SL suelen identificarse por presentar lesiones focales, necróticas, simétricas y bilaterales que se encuentran a lo largo del encéfalo, principalmente localizadas en el tronco encefálico y los ganglios basales (Lake et al., 2015; Gerards et al., 2016; Schubert and Vilarinho, 2020). Si bien la restricción neuroanatómica de las lesiones no es una característica única del SL, defectos en el metabolismo bioenergético suelen desembocar en problemas neuropatológicos con patrones de susceptibilidad neuroanatómicos y celulares determinados (DiMauro and Schon, 2008; Dubinsky, 2009; Pinto et al., 2012). En este sentido, se cree que la alta demanda energética del sistema nervioso central (SNC) para mantener el potencial de membrana y la neurotransmisión hacen a este tejido especialmente susceptible a la disfunción mitocondrial (Vos et al., 2010; Harris et al., 2012). Sin embargo, existen marcadas diferencias en la vulnerabilidad neuronal a la deficiencia mitocondrial, postulándose que esta sea consecuencia de la diversificación funcional de las distintas subpoblaciones celulares del SNC junto con sus particularidades bioenergéticas, incluso a nivel subcelular (Grimm et al., 2018; Qi et al., 2020).

Discusión

En consonancia, resultados previos de nuestro grupo han mostrado que, en ratón, las neuronas glutamatérgicas son una de las poblaciones neuronales más vulnerables a la deficiencia de la subunidad mitocondrial NDUFS4 del complejo I (Bolea et al., 2019), uno de los genes más frecuentemente mutados en pacientes con SL (Lake et al., 2016). La deficiencia de NDUFS4 en estas células se traduce en lesiones cerebrales localizadas, entre otras, en el área del núcleo vestibular (NV) situado en el tronco encefálico. Por otro lado, la deficiencia condicional de NDUFS4 en la población neuronal GABAérgica conduce al daño localizado en los ganglios basales y, especialmente, en el bulbo olfatorio (BO) (Bolea et al., 2019). Notablemente, la deficiencia de NDUFS4 en las neuronas glutamatérgicas sería la responsable de la aparición de anomalías motoras y respiratorias, mientras que la deficiencia de esta subunidad mitocondrial en las neuronas GABAérgicas generaría un fenotipo epiléptico (Bolea et al., 2019). Por lo tanto, una misma mutación en genes de proteínas con función mitocondrial puede tener múltiples efectos clínicos según el tipo celular afectado y es el conjunto el que define el fenotipo patológico final en el SL, pudiéndose extrapolar en el contexto de enfermedad mitocondrial. No obstante, los mecanismos moleculares que definen y diferencian la susceptibilidad de cada población celular en el contexto de enfermedad mitocondrial no han sido establecidos hasta la fecha, limitando el desarrollo de terapias efectivas para el SL.

En este sentido, la neuroinflamación se ha sugerido como mecanismo fisiopatológico implicado en la progresión del SL (Lake et al., 2015). Acorde con esto, la disfunción mitocondrial puede conducir a una activación de la respuesta inmune innata, entre otras vías, a través de un incremento del estrés oxidativo (Fischer and Maier, 2015; Sandhir et al., 2017). No obstante, los tratamientos antioxidantes o inmunosupresores no se han mostrado efectivos en la progresión del SL (Johnson et al., 2013; Liu et al., 2015; De Haas et al., 2017; Finsterer and Zarrouk-Mahjoub, 2017). En consecuencia, estos resultados sugieren que otras vías moleculares deben dirigir el desarrollo de la patología.

Notablemente, alteraciones moleculares en vías de regulación transcripcional y traduccional, como HIF1- α o mTOR, se han correlacionado con la progresión patológica en pacientes con SL y con la disfunción del complejo I mitocondrial en un modelo murino para la investigación del SL (Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2015; Jain et al., 2016; Ferrari et al., 2017; Jain et al., 2019; Mukaneza et al., 2019). Por tanto, en la presente tesis doctoral, con el objetivo de elucidar las vías moleculares alteradas que determinan la vulnerabilidad celular a la disfunción del complejo I mitocondrial, hemos realizado un análisis del perfil traduccional (o traductoma) citosólico, definido como la totalidad de los ARNm asociados al ribosoma citosólico. Concretamente, debido a su elevada susceptibilidad, este análisis se ha realizado en las neuronas GABAérgicas del BO y las neuronas glutamatérgicas del NV de los ratones con deficiencia de NDUFS4 restringida a nivel neuronal.

Nuestros resultados muestran que el principal componente que define el perfil traduccional citosólico viene determinado por la región neuroanatómica analizada. De acuerdo con estos resultados, el análisis computacional de la expresión génica del cerebro humano ha señalado que, pese a la heterogeneidad celular, existen estructuras anatómicas definidas que presentan patrones de expresión genética conservados dentro del SNC (Negi and Guda, 2017). Adicionalmente, los resultados aquí expuestos señalan que dentro del área cerebral las neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas tienen un perfil traduccional completamente distinto al transcriptoma obtenido del mismo tejido portador de la población neuronal analizada. De igual modo, se ha demostrado que el perfil traduccional de tipos celulares específicos no suele correlacionar con el perfil transcripcional del tejido donde se encuentra (Doyle et al., 2008). Estas diferencias entre ambos perfiles de expresión génica podrían estar sujetas a la naturaleza de los ARNm estudiados (ARNm del transcriptoma o del traductoma) o ser el resultado de las diferencias entre un análisis de la totalidad de ARNm presente en un tejido compuesto por células distintas y un análisis del ARNm presente en un solo tipo celular. De este modo, el análisis de la totalidad

Discusión

del ARNm a nivel de tejido es menos informativo que uno de tipo celular específico, debido a que el primero será siempre el resultado de la combinatoria de las distintas poblaciones celulares que componen los tejidos complejos, como el cerebro, pudiendo difuminar ciertos patrones de expresión génica sujetos al tipo celular. En consonancia, mientras que nuestro análisis del transcriptoma tisular del NV y del BO en ratones con deficiencia condicional para NDUFS4 en poblaciones neuronales excitatorias o inhibitoras muestra principalmente una respuesta inmune común en ambos tejidos, el análisis del perfil traduccional citosólico de cada tipo neuronal afectado por separado indica una correlación nula entre los cambios inducidos por la deficiencia de NDUFS4 en cada tipo celular.

En respuesta a nuestra hipótesis principal, la caracterización del perfil traduccional citosólico de poblaciones neuronales susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial ha permitido elucidar los mecanismos moleculares fisiopatológicos específicos que podrían explicar la vulnerabilidad o supervivencia de cada tipo neuronal en el transcurso de la enfermedad mitocondrial.

1.1. La deficiencia del complejo I mitocondrial en las neuronas GABAérgicas del BO activa una respuesta antiviral

La mitocondria desarrolla un papel crucial en la integración de señales celulares en presencia de agentes nocivos, activando la respuesta inmune innata. Específicamente, este organelo puede intervenir en el reconocimiento de secuencias patógenas o PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*), promoviendo una respuesta proinflamatoria y antiviral mediada por interferón de tipo I (West et al., 2011; Banoth and Cassel, 2018). Esta respuesta antiviral se caracteriza por la expresión de genes estimulados por interferón (ISG: *interferon stimulated genes*) capaces de bloquear la propagación del agente infeccioso (Schoggins and Rice, 2011). En este contexto, el análisis de ontología génica de

los datos obtenidos por RNA-Seq sobre el perfil traduccional citosólico de las neuronas GAD2-positivas del BO deficientes para NDUFS4 aquí realizado indica una robusta activación de la respuesta antiviral, principalmente mediada por interferón de tipo I. En enfermedad mitocondrial, la respuesta antiviral puede ser activada en situaciones de estrés por ciertos componentes de origen mitocondrial o DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), los cuales son reconocidos como agentes infecciosos debido al origen procariota de la mitocondria (West and Shadel, 2017; Banoth and Cassel, 2018). Así, la liberación y acumulación de ADNmt en el citoplasma, como consecuencia de una disfunción mitocondrial, activa la respuesta antiviral (West et al., 2015). De la misma forma, mutaciones en el enzima PNPasa (polinucleótido fosforilasa), implicado en la degradación de transcritos codificados en el genoma mitocondrial, provocan la acumulación de ARNmt en la mitocondria y su posterior liberación en el espacio citosólico, activando la expresión de ISG (Dhir et al., 2018). Notablemente, mutaciones en el gen *PNPT1*, que codifica para la PNPasa, han sido identificadas en individuos con SL (Matilainen et al., 2017b), sugiriendo que alteraciones en el procesamiento del ARNmt pueden desencadenar en esta enfermedad mediante la activación de la respuesta antiviral. De manera significativa, nuestros datos revelaron un incremento en la asociación al ribosoma del transcrito *Eif2ak2* en las neuronas GABAérgicas del BO en ratones con deficiencia del complejo I mitocondrial. Este transcrito codifica para la proteína quinasa R (PKR), dependiente de ARN de doble cadena. Esta quinasa puede reconocer directamente el ARNmt de doble cadena desencadenando la respuesta de interferón (Kim et al., 2018b). Al mismo tiempo, PKR es uno de los genes activados por interferón encargados de bloquear la síntesis proteica mediante la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α (Toth et al., 2006). En consonancia, nuestros datos revelaron que, además de la respuesta antiviral, la deficiencia de NDUFS4 en las neuronas GAD2 promueve una reducción en la asociación al ribosoma de transcritos relacionados con el procesamiento del ARN y la traducción. Por otro lado, es importante destacar que la traducción es un

Discusión

proceso altamente dependiente de los niveles de ATP (Buttgereit and Brandt, 1995; Rangaraju et al., 2019) y esta tiene un control directo en la síntesis de proteínas mitocondriales que controlan el metabolismo bioenergético (Pearce et al., 2017). Por tanto, una reducción en la traducción impacta negativamente en la misma fosforilación oxidativa y viceversa. De acuerdo con esto, nuestros datos revelaron que, juntamente con una reducción en la asociación al ribosoma de transcritos que regulan la maquinaria de traducción, en las neuronas GABAérgicas deficientes para NDUFS4 se produce una disminución de transcritos relacionados con el metabolismo mitocondrial. Por extensión, podría especularse que la respuesta antiviral, al impactar en la síntesis proteica, podría agravar la propia disfunción mitocondrial.

De manera interesante, un estudio reciente ha reportado una activación de la respuesta antiviral principalmente derivada del bloqueo de la fosforilación oxidativa y la liberación de ARNmt en el citoplasma en las neuronas espinosas de tamaño medio afectadas en la enfermedad de Huntington, tanto en ratones como humanos (Lee et al., 2020). Estas neuronas son principalmente de tipo GABAérgico, indicando que al menos una subpoblación de neuronas GABAérgicas podría tener una predisposición a activar la respuesta antiviral en el contexto de disfunción mitocondrial. No obstante, en el caso de las neuronas GABAérgicas del BO, es relevante mencionar que el BO, comparativamente con otras áreas cerebrales, presenta una prematura neurodegeneración y neuroinflamación en los ratones deficientes para NDUFS4 (Quintana et al., 2010), indicando que las neuronas GABAérgicas en esta área serían más vulnerables que las de otras regiones a la deficiencia mitocondrial. En este sentido, el BO es una estructura conocida por ser la vía de entrada de diversos virus al SNC. Evolutivamente, con el fin de proteger el resto del SNC de las infecciones virales, esta estructura ha desarrollado una especial sensibilidad en detectar y responder a estos patógenos (Durrant et al., 2016). Esta capacidad “antiviral” del BO podría explicar la precoz y robusta respuesta de defensa que observamos en las neuronas GABAérgicas de esta región, consecuencia de la deficiencia de

NDUFS4. Adicionalmente, los pacientes con SL suelen desarrollar los primeros signos clínicos después de una infección (Sofou et al., 2014; Schubert and Vilarinho, 2020). Por tanto, una primera infección viral podría ayudar a activar la respuesta antiviral en el BO, que se vería potenciada por la propia disfunción mitocondrial en los pacientes con SL. De acuerdo con esta teoría, la infección por herpes virus es capaz de inducir la liberación de ADNmt potenciando este tipo de reacción antiviral (West et al., 2015). Aunque en los pacientes con SL no se han descrito alteraciones estructurales en el BO, sería interesante determinar cambios moleculares que podrían liderar la neurodegeneración posterior. En consonancia, el BO es una estructura que suele relacionarse con alteraciones moleculares que preceden las lesiones que caracterizan ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer (Gardner et al., 2017; Rey et al., 2018).

No menos relevante es que el BO es una de las estructuras del SNC que presentan neurogénesis en edad adulta. Principalmente, la neurogénesis en el BO tiene lugar en la capa granular, donde los neuroblastos, procedentes de la zona subventricular, se integran y diferencian mayoritariamente en neuronas GABAérgicas (Nagayama et al., 2014; Pallotto and Deprez, 2014), aportando probablemente una mayor capacidad de plasticidad sináptica (Saghatelyan et al., 2005). Comparativamente con otras estructuras que también presentan neurogénesis, como el hipocampo, el BO tendría una mayor tasa de integración neuronal diaria, indicando que la neurogénesis es un proceso relevante en esta estructura (Pignatelli and Belluzzi, 2010). La secuenciación individual de estas neuronas nacientes en ratón indica que, entre otras vías moleculares, la traducción, el metabolismo mitocondrial y la neurotransmisión GABAérgica son procesos potenciados en estas células (Tepe et al., 2018). En consonancia, nuestros datos de RNA-Seq de las neuronas GABAérgicas del BO revela que el procesamiento del ARN y la fosforilación oxidativa son procesos enriquecidos en condiciones fisiológicas. En este sentido, para que los neuroblastos se integren necesitan establecer conexiones sinápticas y, para ello, dependen estrechamente

Discusión

de la actividad traduccional (Wiersma-Meems et al., 2005; Nissant and Pallotto, 2011) que, como se ha mencionado con anterioridad, consume una alta cantidad de energía (Rangaraju et al., 2019). Por tanto, la parada traduccional consecuente a la respuesta antiviral en las neuronas GABAérgicas podría derivar en una disrupción de la neurogénesis del BO, claramente afectando la neurotransmisión inhibitoria en el SNC.

En resumen, con el análisis bioinformático del perfil traduccional citosólico de la población neuronal GABAérgica del BO hemos podido determinar que la disfunción mitocondrial del complejo I promueve una respuesta antiviral mediada por interferón de tipo I, posiblemente bloqueando la síntesis proteica y otros procesos ATP-dependientes, como la neurotransmisión (Figura 43). Específicamente, esta respuesta podría generarse por la liberación de ARNmt de doble cadena al citoplasma, activando directamente la quinasa PKR. Asimismo, dada la hipersensibilidad del BO a las infecciones virales y la importancia de estas en el comienzo del SL (Schubert and Vilarinho, 2020), el estudio de esta respuesta en el área del BO podría establecer las bases que lideran la progresión patológica del SL y explicar la vulnerabilidad celular observada.

pueden contribuir también en este suceso (Bae and Kim, 2017). En este sentido, el análisis del perfil traduccional citosólico de las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4 aquí realizado ha permitido elucidar diversas vías moleculares subyacentes a la progresión patológica y, si bien no explican directamente la desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica, pueden ayudar a entender la progresión patológica de la enfermedad y, en extensión, las vías moleculares que convergen en esta alteración. Notablemente, dado que la disfunción mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares parece ser el origen de la causa de muerte en el modelo murino para el SL (Bolea et al., 2019), estos datos exponen potenciales dianas terapéuticas relevantes en el tratamiento de esta enfermedad.

1.2.1. El metabolismo lipídico como promotor de la neuropatología en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con disfunción del complejo I mitocondrial

La caracterización del transcriptoma citosólico de las neuronas glutamatérgicas del NV deficientes para NDUFS4 mediante secuenciación masiva demostró que, a pesar de que los primeros signos clínicos en el grupo experimental derivados de la disfunción mitocondrial no aparecen hasta una edad posterior a P80 en ratón, las alteraciones moleculares se inician mucho antes. Concretamente, a P50 observamos un incremento de transcritos asociados al ribosoma relacionados con el metabolismo del alcohol y del colesterol. Esto es principalmente derivado de un incremento significativo del transcrito *Star*, que codifica para la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), encargada del transporte de colesterol a la mitocondria, paso limitante en la síntesis de esteroides (Bahat et al., 2014). Contrariamente a lo esperado, los datos aquí presentados reflejan una disminución de transcritos relacionados con la síntesis de progesterona, dependiente de la síntesis de neuroesteroides (Baulieu and Schumacher, 2000). No obstante, los transcritos que explican dicha reducción son *Abhd2*, *Sox21* y

Yap1. El primero, además de codificar para un receptor de progesterona en esperma (Gerhardt, 2016), se ha visto relacionado con el metabolismo de lípidos y la respuesta inmune (Lord et al., 2013), mientras que los dos últimos son factores de transcripción reguladores de múltiples vías, como la diferenciación neuronal (Whittington et al., 2015; Jin et al., 2020). Por tanto, en este caso la disminución de la síntesis de progesterona no se contradeciría con el incremento de StAR.

Significativamente, StAR se ha relacionado con el metabolismo de lípidos (Soccio and Breslow, 2003). En este sentido, la disfunción del complejo I mitocondrial, tanto en ratón como en mosca, deriva en una acumulación en etapas tempranas de gotas lipídicas de origen neuronal en la glía, probablemente causada por un incremento del estrés oxidativo. Dichas gotas lipídicas desaparecen de acuerdo con el avance de la enfermedad, indicando una alteración asociada al inicio patológico (Liu et al., 2015). En el caso del modelo de ratón, entre otras regiones, esta acumulación de colesterol y triglicéridos se localiza en el NV y el BO (Liu et al., 2015). Recientemente, se ha observado que algunos patógenos utilizan los lípidos intracelulares para abastecer sus funciones vitales. Evolutivamente, las células eucariotas han desarrollado la capacidad de modular el contenido proteico anti-microbial de las gotas lipídicas intracelulares como primera línea de defensa ante la presencia de estos agentes infecciosos. Adicionalmente, se ha observado que, en aquellas células infectadas, estas gotas lipídicas se separan físicamente de las mitocondrias, reduciendo el metabolismo oxidativo y evitando la propagación de la infección (Dutra et al., 2020). Por tanto, en concordancia con la respuesta antiviral observada en las neuronas GABAérgicas, la acumulación de las gotas lipídicas, tanto en el NV como en el BO, podría ser también el resultado de la liberación de moléculas DAMPs de origen mitocondrial en el citoplasma, derivadas de la propia disfunción mitocondrial. Concretamente, en las neuronas glutamatérgicas del NV el acúmulo lipídico podría derivar en un incremento de la importación de colesterol a mitocondria a través de la proteína StAR, la cual según nuestros datos se encontraría incrementada. De acuerdo con esto, la

Discusión

hidrólisis del colesterol acumulado en las gotas lipídicas es una fuente para la esteroidogénesis (Manna et al., 2016). En este contexto, en múltiples enfermedades neurodegenerativas se ha observado un incremento de StAR y de colesterol dentro de la mitocondria (Sierra et al., 2003; Torres et al., 2019). Este incremento, podría impactar directamente en la producción de neuroesteroides, la cual se ha visto relacionada con mecanismos de supervivencia neuronal o neuroinflamación en algunas enfermedades neurodegenerativas (Yilmaz et al., 2019). Por otro lado, la acumulación anómala de colesterol en la mitocondria, a pesar de ser un campo aún desconocido, se ha relacionado con alteraciones en el propio ADNmt y con incrementos del estrés oxidativo (Arenas et al., 2017). Asimismo, una acumulación excesiva de la proteína StAR en mitocondria activa la expresión de proteasas en el núcleo para promover su retirada (Bahat et al., 2014; Quirós et al., 2016). Sin embargo, dichas proteasas son ATP-dependientes, por lo tanto, en caso de disfunción mitocondrial, StAR no sería retirado del organelo, induciendo así una respuesta continuada de estrés al núcleo. Por tanto, estos datos sugieren que el incremento observado del transcrito *Star*, consecuencia de una desregulación del metabolismo lipídico, en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4, podría estar involucrado en la progresión patológica, a través de la esteroidogénesis o mecanismos de estrés celular. Cabe mencionar, que en las neuronas glutamatérgicas vestibulares la desregulación del metabolismo lipídico parece persistir a distintos niveles durante toda la patología. Así, nuestros datos sobre el perfil traduccional citosólico de este tipo neuronal con deficiencia del complejo I mitocondrial en una etapa patológica avanzada revelan una reducción de la actividad elongasa de los ácidos grasos, la cual puede tener lugar en el mismo organelo (Jump, 2009).

En conjunto, nuestros datos aportan robustez a la teoría en que durante las primeras etapas de la enfermedad mitocondrial la desregulación del metabolismo lipídico, derivado de un incremento del estrés oxidativo (Liu et al., 2015) o como respuesta de defensa (Dutra et al., 2020), podría dirigir la neurodegeneración observada en el NV (Figura 44). Específicamente, el acúmulo

lipídico potenciaría el transporte de colesterol a la mitocondria mediante la proteína StAR, impactando en la esteroidogénesis y cronificando una respuesta de estrés al núcleo, conjuntamente, contribuyendo en la progresión patológica.

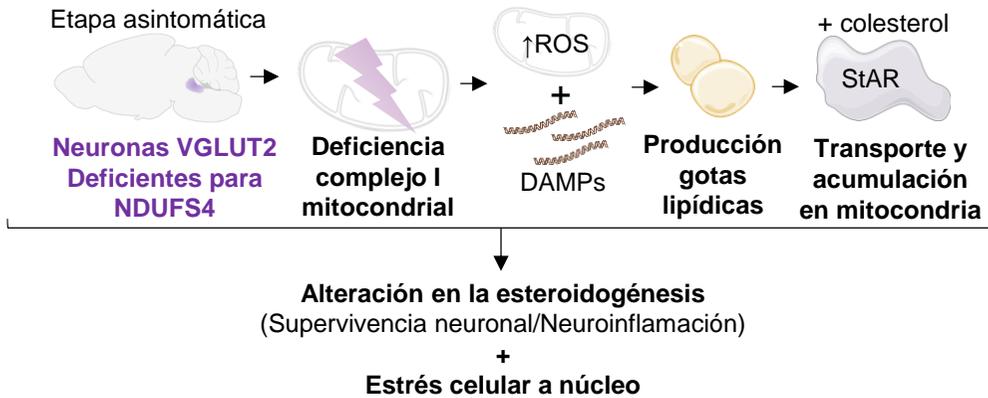


Figura 44. Gráfico secuencial de la posible disregulación del metabolismo lipídico en las neuronas glutamatergicas del NV con deficiencia para NDUFS4 en etapa asintomática. El estrés oxidativo o la liberación de moléculas derivadas de la disfunción mitocondrial (DAMPs) al espacio citoplasmático induciría la producción de gotas lipídicas en el NV. Esto activaría el transporte y acumulación de colesterol mediante la proteína StAR a la mitocondria. La acumulación de colesterol en mitocondria podría inducir una alteración en la síntesis de neuroesteroides y/o promover el estrés celular, acentuando la progresión patológica. Flechas: activación.

1.2.2. Activación de la síntesis de neuropéptidos como respuesta de neuroprotección en las neuronas glutamatergicas vestibulares deficientes para NDUFS4

El análisis de ontología génica sobre los datos obtenidos por RNA-Seq del perfil traduccional citosólico de las neuronas VGLUT2 del NV con disfunción del complejo I mitocondrial indica un incremento de transcritos DAR relacionados con la señalización neuropeptídica. En este contexto, es importante mencionar que el NV se compone, como mínimo, de tres subpoblaciones glutamatergicas definidas, entre otros genes, por la expresión de ciertos neuropéptidos (Kodama et al., 2012). Por tanto, hay que considerar que la inducción de la señalización

Discusión

neuropeptídica aquí expuesta, podría ser el resultado de la combinación de diferentes perfiles de expresión subyacentes a distintas subpoblaciones neuronales excitatorias del NV. Con el fin de reducir esta dificultad, entre los transcritos incrementados relacionados con la vía neuropeptídica destacamos por su alto nivel de significancia el transcrito *Adcyap1*, que codifica para el polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria o PACAP. El análisis de expresión génica por qRT-PCR para este transcrito en la región del NV demostró que el incremento de expresión de este transcrito es exclusivo de la población glutamatérgica con deficiencia de NDUFS4. De igual modo, pudimos confirmar mediante hibridación *in situ* y análisis de los datos de RNA-Seq, que en condiciones fisiológicas una subpoblación neuronal glutamatérgica expresa *Adcyap1*. Concretamente, en el área parvocelular y magnocelular del núcleo vestibular medial. Estos últimos datos fueron previamente descritos en Kodama et al., 2012. Por tanto, la sobreexpresión de *Adcyap1* en el contexto de enfermedad mitocondrial podría ser el reflejo de una inducción *de novo* en una subpoblación glutamatérgica sin expresión previa de PACAP o, simplemente, una sobreexpresión de los niveles fisiológicos en la subpoblación glutamatérgica - PACAP.

La evaluación del nivel de muerte neuronal glutamatérgica en estado severo de nuestro modelo murino experimental reveló aproximadamente un 50% menos de neuronas deficientes para NDUFS4 en estado patológico avanzado. En consonancia, previamente en Quintana et al., 2010 se había demostrado sin resolución de tipo celular que en el NV sucedía una pérdida celular de acuerdo con el avance de la enfermedad. En conjunto, estos resultados indicarían que aquellas neuronas con niveles altos de PACAP tendrían una menor susceptibilidad o una mayor resistencia a la disfunción mitocondrial en comparación con otras neuronas glutamatérgicas. En referencia a esto último, PACAP puede bloquear la apoptosis a nivel transcripcional (Maino et al., 2015). Asimismo, interviene en la regeneración e integridad axonal observada durante la neurodegeneración (Nakamachi et al., 2011). Notablemente, también se ha

descrito como un potenciador de la biogénesis mitocondrial soportando el crecimiento de la proyección neuronal (Kambe and Miyata, 2012) y regulando el estrés oxidativo (Douri et al., 2016). Por otro lado, PACAP conjuntamente a otros neuropéptidos, como la somatostatina, el Neuropéptido Y o Sustancia P, podría modular la respuesta antiinflamatoria mediante activación de la microglía (Morara et al., 2015)(Carniglia et al., 2017). Por tanto, parece altamente probable que la subpoblación glutamatérgica que expresa PACAP a nivel fisiológico pueda inducir fácilmente un incremento de este polipéptido en caso de disfunción mitocondrial, promoviendo su propia supervivencia.

En referencia a los mecanismos reguladores de esta sobreexpresión, nuestro análisis computacional, mediante la herramienta iRegulon, determinó que el factor de transcripción ATF3 puede modular potencialmente la expresión de los ARNm de los neuropéptidos PACAP (*Adcyap1*), Sustancia P (*Tac1*), y Neuropéptido Y (*Npy*), o proteínas relacionadas como la enzima convertidora de endotelina tipo-I (*Ecel1*), los cuales encontramos con asociación incrementada al ribosoma en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de NDUFS4. Significativamente, el transcrito *Atf3* también presenta una mayor asociación al ribosoma citosólico glutamatérgico vestibular en caso de deficiencia del complejo I mitocondrial, incluso en etapa asintomática. En correlación, el daño periférico en el nervio facial de ratón produce una sobreexpresión a nivel transcripcional de *Atf3* acompañada de un incremento en los niveles de expresión de los transcritos *Adcyap1*, *Grp*, *Npy*, *Gal*, *Vip* y *Ngf*, codificantes para neuropéptidos (Gey et al., 2016). Este mismo estudio reveló que la deficiencia de *Atf3* impacta en la expresión de *Adcyap1* y *Grp*, indicando que la inducción de PACAP y de otros neuropéptidos en las neuronas glutamatérgicas podría derivar de una activación directa de ATF3 en respuesta a un daño tisular. Adicionalmente, en el sistema nervioso de *C. elegans* se ha observado que la disrupción mitocondrial promueve el desplazamiento de ATFS-1, ortólogo de ATF4, desde la mitocondria al espacio citoplasmático. Este factor de transcripción podría activar la respuesta de estrés mitocondrial a proteínas

desplegadas o UPRmt a nivel periférico, probablemente, mediante la liberación del neuropéptido Flp-2 (Nargund et al., 2012; Shao et al., 2016). En referencia a ATF4, nuestros datos demuestran un incremento en la asociación ribosomal del transcrito codificante para este factor de transcripción en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia para NDUFS4 en etapa patológica avanzada. Dado que ATF4 se ha descrito como un factor de transcripción para ATF3 (Pakos-Zebrucka et al., 2016), nuestros datos podrían sugerir que la inducción de ATF4 podría activar ATF3 y en extensión, promover la síntesis de neuropéptidos, como PACAP, con un posible papel neuroprotector en caso de disfunción mitocondrial (Figura 45).

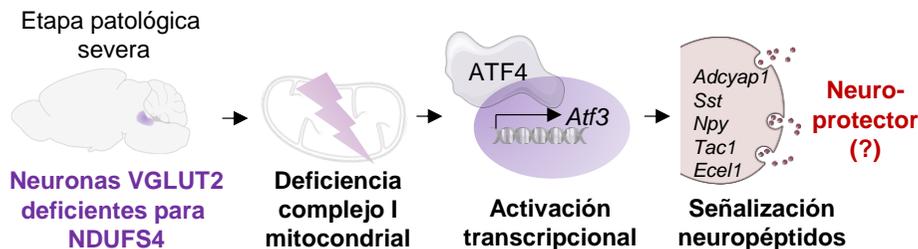


Figura 45. Esquema sobre la posible activación de la señalización neuropéptica en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con disfunción del complejo I mitocondrial. La activación de los factores de transcripción ATF4 y ATF3 en respuesta a la disfunción mitocondrial podría derivar en la liberación de ciertos neuropéptidos con posible efecto neuroprotector. Flecha: activación.

1.2.3. Posible implicación de la vía de mTORC1 en el control de la biogénesis ribosomal en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para NDUFS4

La deficiencia del complejo I en las neuronas VGLUT2 del NV resulta en un incremento en la asociación al ribosoma de transcritos relacionados con la biogénesis ribosomal citosólica, contrario al observado en las neuronas GABAérgicas del BO con la misma mutación. La biogénesis ribosomal requiere de la expresión de las ARN polimerasas I, II y III, que promueven la transcripción de las distintas subunidades desde el nucléolo, pasando por el núcleo de manera secuencial hasta llegar al citoplasma (Piazzini et al., 2019). Este proceso es

regulado por múltiples vías, como la Ras-ERK/MAPK o la PI3K/AKT/mTOR (Mahoney et al., 2009). Entre estos factores, mTOR destaca por su control directo de la biogénesis ribosomal a través de la fosforilación de las ARN polimerasas I, II y III (Iadevaia et al., 2014) o a través de la síntesis proteica de las subunidades ribosomales (Mayer and Grummt, 2006). Notablemente, en el caso de enfermedad mitocondrial, la inhibición de mTOR por administración de rapamicina extiende la supervivencia de los ratones *Ndufs4KO* y retrasa la aparición de las lesiones neuropatológicas (Johnson et al., 2013; Johnson et al., 2015). En conjunto, podría especularse que el incremento de la biogénesis ribosomal observada podría ser un reflejo de la activación o sobre-activación de mTOR en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia del complejo I mitocondrial. Con el propósito de validar esta teoría, dado que una de las dianas más reconocidas de la activación de mTOR es la quinasa S6K1, que fosforila la subunidad ribosomal RPS6 (Laplante and Sabatini, 2009), en esta tesis doctoral se ha analizado el nivel de fosforilación de RPS6 en dos residuos de serina diferentes correlacionados con el nivel de actividad neuronal (Biever et al., 2015). A su vez, la quinasa S6K1, controlada por mTOR, podría estar implicada en la fosforilación de las ARN polimerasas I y II (Iadevaia et al., 2014). Así, la fosforilación de RPS6 sería un indicador de la activación de mTOR y del incremento de la biogénesis ribosomal. Contrariamente a lo esperado, el nivel proteico de la fosforilación de RPS6 no presenta diferencias respecto al grupo control a nivel del NV ni a nivel de las neuronas glutamatérgicas, sugiriendo que el incremento de expresión de los transcritos relacionados con la biogénesis ribosomal no sería mediado por mTOR/S6K1/RPS6 en las neuronas glutamatérgicas vestibulares deficientes para *NDUFS4*.

No obstante, la síntesis ribosomal solo se produce si todos los componentes están disponibles, por tanto, un incremento en la transcripción de las subunidades ribosomales no tiene por qué correlacionar con un incremento proteico de la biogénesis ribosomal o de la actividad traduccional (Mayer and Grummt, 2006). Por otro lado, la inactivación genética de la quinasa S6K1 a nivel

Discusión

neuronal en un ratón con deficiencia del complejo I no se traduce en ningún beneficio (Ito et al., 2017), indicando que quizás el beneficio de la inhibición de mTOR en la regulación traduccional se localizaría en otros tipos celulares o derivaría de otras vías no relacionadas con la actividad de S6K1. En consonancia con esto último, la visualización *in situ* del nivel de fosforilación de RPS6 (pS6) en las neuronas glutamatérgicas del NV, realizada por ensayos de inmunofluorescencia, nos permitió determinar una subpoblación neuronal glutamatérgica con una fosforilación basal de RPS6 superior al resto de las neuronas glutamatérgicas. Esta subpoblación, de tamaño mayor que el resto de las neuronas VGLUT2 del NV, desaparecía en caso de deficiencia de NDUFS4 en estado patológico avanzado, sugiriendo una neurodegeneración selectiva de esta subpoblación glutamatérgica con elevados niveles basales de fosforilación de RPS6. Por tanto, no podemos descartar la idea de que una elevada actividad de mTOR, reflejada por una mayor fosforilación de RPS6, sea un factor de susceptibilidad en caso de disfunción mitocondrial.

Por otro lado, como se ha comentado, vías alternativas a las comentadas podrían explicar el incremento de la biogénesis ribosomal. En este sentido, otra de las dianas clásicas de mTORC1 es 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*). Clásicamente, mTORC1 inhibe este factor por fosforilación. A su vez, 4E-BP en su forma activa inhibe eIF4E, encargado de iniciar la traducción de los ARNm cap-dependientes (Laplanche and Sabatini, 2009). Así, la activación de mTOR controla la maquinaria traduccional, no solo a través de S6K1, sino también a través de 4E-BP, ofreciendo vías alternativas que explicarían el incremento de la biogénesis ribosomal (Park et al., 2017). Cabe destacar, que recientemente se ha relacionado la actividad de mTORC1 con la activación del factor ATF4 (Park et al., 2017). Clásicamente, ATF4 se ha relacionado con la activación de la vía de respuesta de estrés integrada o ISR, la cual produce un bloqueo de la síntesis proteica de los ARNm cap-dependientes, pero induce la expresión de los transcritos con marcos de lectura alternativos (uORF), como ATF4 (Pakos-Zebrucka et al., 2016). Alternativamente, mTORC1 podría activar

ATF4 a través de los represores traduccionales 4E-BP independientemente de la respuesta de ISR. Esta activación permitiría establecer un balance de los niveles de aminoácidos libres de acuerdo con las necesidades celulares en la producción proteica (Park et al., 2017). Así pues, dado que en nuestros datos observamos un incremento en la asociación al ribosoma del transcrito *Atf4*, no podemos descartar una activación de la vía mTORC1/4E-BP, la cual podría modular, a su vez, el incremento de la biogénesis ribosomal observada en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de NDUFS4. Futuras validaciones de esta vía podrían elucidar los mecanismos que expliquen el beneficio de la rapamicina en el modelo murino para SL (Johnson et al., 2013). No obstante, no podemos obviar otros factores y vías, como PKR, GCN2 o Ras-ERK/MAPK, que puedan estar modulando de alguna manera la síntesis de subunidades ribosomales (Mahoney et al., 2009; Li et al., 2018; Piazzini et al., 2019).

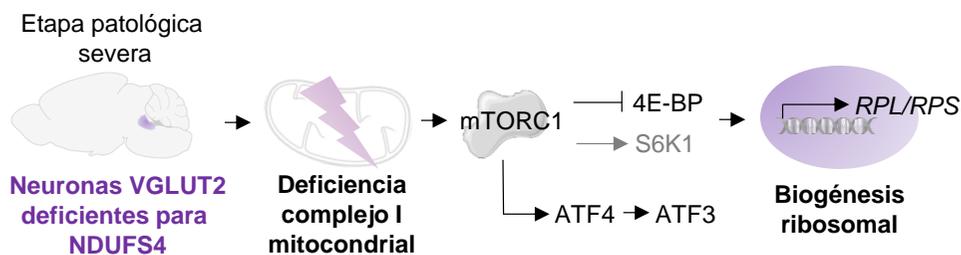


Figura 46. Representación del posible papel de mTORC1 en la activación de la biogénesis ribosomal en las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia para NDUFS4. Alternativamente al papel de S6K1 (gris) en la activación de la maquinaria traduccional, la modulación de 4E-BP podría controlar la expresión de maquinaria traduccional. Asimismo, mTORC1 podría ser el responsable de la inducción transcripcional de los factores ATF4 y, en extensión, ATF3. RPL/RPS: subunidades ribosomales del complejo mayor y menor, respectivamente. Flechas: activación. Línea: inhibición.

1.3. Relevancia y limitaciones de la aproximación de tipo celular específico

La caracterización del perfil traduccional citosólico de dos poblaciones neuronales genéticamente definidas susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial en ratón analizada en la presente tesis doctoral ha señalado la

Discusión

importancia de realizar una aproximación de tipo celular específico para entender las bases moleculares que desencadenan la enfermedad mitocondrial. Por un lado, estos resultados han permitido asociar distintas respuestas fisiopatológicas a una misma mutación según el perfil de expresión génica de cada tipo neuronal, permitiendo entender la susceptibilidad celular de la enfermedad mitocondrial. Dichas respuestas, son el reflejo de la comunicación retrograda de la mitocondria al núcleo en situaciones de estrés, activando la expresión de ciertos factores, que a su vez, tienen como objetivo resolver las perturbaciones originarias mediante la respuesta núcleo-mitocondria (Quirós et al., 2016; Mottis et al., 2019). De acuerdo con esto, la ISR, dentro del conjunto de respuestas retrogradadas mito-nucleares, puede ser activada por distintos tipos de disfunción mitocondrial, induciendo diferentes respuestas según el tipo celular en el que se encuentre (Mick et al., 2020). Por tanto, la aproximación de tipo celular específico aquí aplicada ha permitido identificar distintas respuestas de estrés, a una misma mutación mitocondrial, dependientes del tipo celular.

No obstante, pese a las ventajas expuestas de este tipo de ensayo cabe destacar algunas limitaciones a tener en cuenta. En primer lugar, el análisis del ARNm asociado al complejo ribosomal no debe entenderse como una medida de activación traduccional. Represores traduccionales pueden impedir la síntesis proteica bloqueando el conjunto ARN:Ribosoma, como el factor *Fragile X mental retardation protein* (FMRP) (Darnell et al., 2011). En consecuencia, los mecanismos patológicos aquí descritos requieren de una exhaustiva validación a nivel proteico. Adicionalmente, dado que los resultados aquí expuestos se basan principalmente en el análisis de ratones macho, sería conveniente realizar la confirmación también en hembras con el fin de descartar posibles diferencias sexuales. No obstante, ya que ni en ratón ni en humano se han reportado diferencias por dimorfismo sexual en la progresión patológica para el SL, no predecimos cambios en este sentido. Por otro lado, otra de las limitaciones de la investigación aquí realizada está sujeta a las complicaciones de la tecnología Cre-LoxP, base del ensayo RiboTag (Sanz et al., 2009; Sanz et al., 2019) usado para

marcar los ribosomas de tipos celulares específicos. Específicamente, la posible expresión transitoria de la recombinasa Cre en tipos celulares distintos al de estudio durante el desarrollo pueden impedir la realización de un estudio de tipo celular específico (Song and Palmiter, 2018; Luo et al., 2020). No obstante, con el fin de evitar este inconveniente hemos documentado cuidadosamente que la expresión de la recombinasa Cre se localizara en el grupo neuronal de interés, asegurando la inmunoprecipitación del ARNm de origen neuronal glutamatérgico o GABAérgico. En conjunto, nuestros datos indican que mientras el modelo para el estudio de la población GABAérgica permite dicho análisis, un grupo de ratones utilizados para el análisis glutamatérgico sufre expresión de la recombinasa Cre en poblaciones VGLUT2-negativas. La diferencia en el patrón de expresión de la recombinasa Cre en cada grupo de animales puede estar sujeta al diseño de la línea murina que dirige la expresión de la recombinasa Cre. En el caso del grupo GABAérgico, los ratones presentan el gen codificante para la recombinasa Cre en el locus de *Gad2* (*Knock In* o KI), tras una secuencia IRES (*internal ribosome entry site*) justo después del codón de terminación del gen, evitando la inactivación del gen *Gad2* (Taniguchi et al., 2011), mientras que en el caso del grupo glutamatérgico la secuencia codificante para la recombinasa Cre se introdujo en el locus de *Slc17a6* de un cromosoma bacteriano de integración aleatoria en el genoma (Borgius et al., 2010). En este sentido, en el caso del grupo GABAérgico, aunque la expresión de la recombinasa puede presentarse reducida en comparación al ARNm principal presente antes de la secuencia IRES, la expresión de la recombinasa Cre correlaciona con la expresión del gen endógeno *Gad2* al tratarse de un diseño KI. Por el contrario, en el caso del grupo glutamatérgico, la expresión de la recombinasa puede verse afectada por el sitio (aleatorio) de integración del cromosoma bacteriano en el genoma o por el número de copias integradas del transgén, induciendo cambios en su expresión diferentes del gen endógeno (Song and Palmiter, 2018). En este sentido, otras líneas murinas, que codifican la recombinasa Cre en el mismo locus que codifica para *Vglut2* (KI), podrían resultar modelos óptimos para el estudio de la

Discusión

población glutamatérgica en el contexto de enfermedad mitocondrial (Vong et al., 2011). Además del tipo de diseño, es posible que parte de la expresión indeseada de la recombinasa Cre se deba a dinámicas reguladoras de los genes durante el desarrollo que son inevitables, en las cuales la expresión de *Slc17a6* (*Vglut2*) es transitoria (Borgius et al., 2010). En cualquier caso, la caracterización de los distintos ratones aquí presentada garantizó el aislamiento de muestras de ARNm asociado a ribosoma suficientemente puras para la población GABAérgica o glutamatérgica, permitiendo el análisis del perfil traduccional con resolución de tipo celular mediante RNA-Seq. No obstante, no debe descartarse la presencia de otros tipos celulares consecuencia de un porcentaje bajo de contaminación o co-expresión fisiológica. Así, por ejemplo, la mayoría de las neuronas dopaminérgicas del BO son a la vez GABAérgicas (Parrish-Aungst et al., 2007). Notablemente, esta es la primera vez que se realiza dicha caracterización para los animales presentados en el contexto de deficiencia en *Ndufs4*. Sin embargo, otros estudios recientes han utilizado estos modelos sin tener en cuenta esta posible recombinación inesperada, evadiendo el posible impacto de esta en los resultados finales (Johnson et al., 2020).

En conjunto, el estudio del traductoma citosólico de dos poblaciones neuronales susceptibles a la deficiencia del complejo I mitocondrial, aquí realizado, ha permitido explorar potenciales vías moleculares implicadas en la progresión de la enfermedad. Entre estas, la quinasa PKR y el neuropéptido PACAP podrían jugar un papel clave a nivel neurodegenerativo en las neuronas GABAérgicas del BO y neuroprotector en las neuronas glutamatérgicas del NV, respectivamente. La futura comprobación de estas vías podría colaborar significativamente en el desarrollo de tratamientos para la enfermedad mitocondrial del SL. Sin embargo, no podemos descartar que otras vías estén también implicadas en la susceptibilidad neuronal observada en el SL, ni que otras subpoblaciones celulares sean también relevantes en la patología. En este sentido, este trabajo ha relacionado una robusta actividad basal de mTOR (medida por la fosforilación de RPS6) con una subpoblación neuronal glutamatérgica vestibular

especialmente vulnerable en caso de deficiencia del complejo I. Dado que esta población muere prematuramente no hemos podido incluir su perfil traduccional en esta investigación, pero podría resultar de especial interés dado el beneficio del tratamiento con rapamicina en enfermedad mitocondrial (Johnson et al., 2013). En cualquier caso, esta tesis doctoral ha expuesto relevantes vías fisiopatológicas subyacentes a los principales signos clínicos observados en el SL, ofreciendo potenciales dianas terapéuticas que podrían mejorar la calidad de vida de estos pacientes, y en extensión, preceder de base para otras enfermedades mitocondriales, primarias o secundarias.

2. Obtención del perfil traduccional mitocondrial de poblaciones definidas genéticamente en tejidos complejos

Las células eucariotas, además de contener el genoma nuclear, contienen el genoma mitocondrial, el cual también posee su propia maquinaria de transcripción y traducción (Boczonadi et al., 2018). Esta maquinaria mitocondrial está especializada en la síntesis de 13 proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, las cuales pueden conllevar a múltiples enfermedades si se encuentran alteradas (Boczonadi et al., 2018). Notablemente, cientos de factores codificados en el núcleo coordinan la expresión génica del genoma mitocondrial (Pearce et al., 2017), señalando que una coordinación correcta entre el núcleo y la mitocondria es esencial para sostener el metabolismo bioenergético. Igualmente, esta coordinación es importante en la integración de señales externas e internas con el fin de coordinar las distintas funciones celulares (Quirós et al., 2016; Mottis et al., 2019), siendo especialmente relevante en situaciones patológicas o de estrés (Dubinsky, 2009; Vafai and Mootha, 2012). En consecuencia, alteraciones en la expresión génica de un genoma tienen un impacto directo en la del otro y viceversa, demostrando, además, una marcada restricción tisular o celular de la susceptibilidad según la disfunción mitocondrial (Dubinsky, 2009; Boczonadi et al., 2018; Mick et al., 2020). De

Discusión

acuerdo con esto, nuestros resultados demuestran que la disfunción del complejo I mitocondrial en distintos tipos neuronales impacta de manera diferencial en el perfil traduccional citosólico a través de la respuesta retrograda basada en la comunicación mitocondria-núcleo. Por tanto, entender los cambios en el perfil traduccional mitocondrial y nuclear en conjunto es crucial para desenmascarar las vías moleculares que gobiernan la célula. Para ello, en esta tesis doctoral se ha diseñado, desarrollado y validado, por primera vez, una herramienta (MitoRiboTag) capaz de aislar el perfil traduccional mitocondrial de poblaciones celulares definidas genéticamente de tejidos complejos como el encéfalo. Esta técnica permite, juntamente con las herramientas para el análisis del traductoma citosólico, investigar la complejidad de la comunicación mito-nuclear, así como la regulación del traductoma mitocondrial a nivel fisiológico y patológico.

La tecnología desarrollada en la presente tesis doctoral está basada en un vector viral adenoasociado (AAV) que codifica para la subunidad ribosomal mitocondrial MRPL44 fusionada con la proteína eYFP. Este vector viral, denominado AAV-DIO-MitoRiboTag, únicamente se expresa a nivel proteico en presencia de la recombinasa Cre, permitiendo su expresión en los tipos celulares de interés. La validación del uso del AAV-DIO-MitoRiboTag en cultivo celular de HEK293T, aquí presentada, demuestra la dependencia de Cre de esta herramienta, así como su localización mitocondrial. Asimismo, esta herramienta permite el aislamiento del ARNm asociado al ribosoma mitocondrial. Una inmunoprecipitación que *in vivo* permite aislar casi el 90% de los ribosomas mitocondriales marcados con MitoRiboTag (MRPL44·eYFP).

En comparación con las herramientas basadas en ratones transgénicos para el análisis de tipos celulares genéticamente definidos, los vectores virales Cre-dependientes permiten realizar un marcaje en un marco temporal y región anatómica definidos, evitando los problemas asociados a la expresión transitoria de la recombinasa Cre en etapas del desarrollo que puedan interferir en el nivel

de resolución celular (Song and Palmiter, 2018). Acorde con esto, el análisis de la expresión de *eYFP*, correspondiente a la expresión del constructo MitoRiboTag, localiza únicamente en el tipo celular de interés.

Por el contrario, una de las limitaciones de los vectores virales, en su aplicabilidad *in vivo* en el SNC, es que estos requieren de cirugía estereotáxica. Este proceso puede introducir variabilidad en los resultados finales mediante la subóptima localización de la transducción del vector viral y/o procesos inflamatorios asociados a la misma cirugía o al vector viral (Mastakov et al., 2002; Armstrong and Tasker, 2014). No obstante, en este trabajo hemos demostrado que la posible variabilidad introducida puede optimizarse mediante agrupación de tejido de varios animales. Asimismo, los vectores AAV han demostrado tener un amplio espectro de seguridad en la clínica y una baja inmunogenicidad comparativamente con otros vectores virales (Shirley et al., 2020), reduciendo así la aparición de efectos no deseados en nuestro diseño experimental. Finalmente, la expresión durante largos períodos de tiempo de estos vectores virales (Berns and Muzyczka, 2017) permite la atenuación de los procesos neuro-inflamatorios asociados a la cirugía estereotáxica.

En el contexto de la aplicabilidad de esta técnica, el análisis de las muestras de ARN aisladas mediante la tecnología MitoRiboTag de neuronas glutamatérgicas vestibulares ha indicado que estas presentan ARNr de origen citosólico, además del ARNr de origen mitocondrial. Este dato podría considerarse como un factor de contaminación. No obstante, el constructo AAV-DIO-MitoRiboTag se expresa y traduce en el citoplasma. Así, la inmunoprecipitación de este en el momento de su traducción podría incrementar el contenido de ARNr citosólico en la muestra final. Adicionalmente, especialmente en levadura, algunos estudios señalan la presencia de ribosomas citosólicos cercanos a la membrana externa mitocondrial encargados de la traducción de proteínas mitocondriales (Huang et al., 2018; Vardi-Oknin and Arava, 2019). Por tanto, esta proximidad podría afectar también la pureza del perfil traduccional mitocondrial. Sin embargo, con

Discusión

la introducción de la digitonina (detergente no-iónico), en los tampones de homogenización y de lavado, hemos demostrado un mayor enriquecimiento de transcritos codificados en el ADNmt en relación con el contenido del homogenado inicial. La digitonina es comúnmente usada en preparaciones mitocondriales (Busch et al., 2019). Esta presenta una afinidad mayor por el colesterol, permitiendo una mayor solubilidad de la membrana plasmática celular y la membrana mitocondrial externa (Niklas et al., 2011; Clerc and Polster, 2012). La membrana mitocondrial interna, en comparación, presenta un contenido menor de colesterol, siendo más rica en otros fosfolípidos, como la cardiolipina (Paradies et al., 2014). Así, este detergente no-iónico nos ha permitido permeabilizar las membranas celulares conservando los componentes internos de la mitocondria, reduciendo la posible contaminación de componentes citosólicos.

Finalmente, cabe mencionar que la proteína fusión MRPL44-eYFP, según el análisis proteico aquí expuesto, se expresa paralelamente con la proteína MRPL44 nativa. Esto podría reflejar una menor eficiencia en la incorporación de MRPL44-eYFP en el complejo ribosomal mitocondrial por su posible competición. No obstante, nuestros resultados demuestran que pese a esta posible interferencia la tecnología MitoRiboTag permite aislar eficientemente el perfil traduccional mitocondrial de poblaciones celulares definidas. Sin embargo, es importante resaltar que algunos estudios han demostrado que el ribosoma mitocondrial presenta cierta plasticidad en referencia a su conformación estructural, composición del ARNr u organización espacial (Kehrein et al., 2015; Rorbach et al., 2016; Koripella et al., 2020). Así, la incorporación de la proteína eYFP podría modular su funcionalidad en cierto sentido. Por otro lado, otros estudios han señalado que diferentes factores nucleares como C12ORF62 o la familia MITRAC pueden anteponer la traducción de ciertos transcritos codificados en el genoma mitocondrial (Richter-Dennerlein et al., 2016; Wang et al., 2020), posiblemente permitiendo la incorporación secuencial de las subunidades proteicas de la fosforilación oxidativa según la demanda energética

o factores externos (Richter-Dennerlein et al., 2015). Por tanto, no podemos descartar que la proteína MRPL44-eYFP pueda afectar la traducción mitocondrial. Sería conveniente pues, dada la importancia de los factores nucleares, determinar el interactoma de estos ribosomas mitocondriales marcados con el fin de establecer posibles diferencias en su regulación. Así, recientemente un ratón transgénico con marcaje FLAG en los ribosomas mitocondriales a nivel constitutivo ha reflejado la importancia del interactoma del ribosoma mitocondrial en la regulación del metabolismo bioenergético (Busch et al., 2019).

En resumen, la aproximación MitoRiboTag desarrollada en esta tesis doctoral abre nuevas puertas para entender los mecanismos de regulación de la expresión génica mitocondrial, mediante el análisis del perfil traduccional mitocondrial. Asimismo, su posible aplicabilidad en el análisis del interactoma podría representar otra ventaja en la comprensión de dicha regulación. Por otro lado, esta herramienta podría combinarse con otras aproximaciones que permitan el análisis del perfil traduccional citosólico, como la herramienta RiboTag (Sanz et al., 2009; Sanz et al., 2019), permitiendo la investigación de la comunicación mito-nuclear en distintas situaciones fisiológicas y patológicas. Notablemente, dado que esta comunicación parece estar sujeta al tipo celular, la aplicabilidad del ensayo MitoRiboTag es óptima al permitir el estudio del traductoma mitocondrial con resolución de tipo celular específico.

3. La deficiencia del gen nuclear *Ndufs4* afecta la asociación al ribosoma del transcrito *Nd1* codificado en el genoma mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares

Gracias al desarrollo de la herramienta MitoRiboTag hemos podido observar que la deficiencia de NDUFS4 en las neuronas glutamatérgicas del NV de ratón produce una reducción de la asociación del transcrito *Nd1* con el ribosoma mitocondrial, sin afectación significativa del resto de transcritos codificados en

Discusión

el ADNmt. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado un estudio del proteoma mitocondrial de este mismo tipo neuronal, en el que podemos observar que la subunidad ND1 del complejo I es la subunidad que presenta una mayor reducción a nivel proteico (Gella et al., 2020), señalando que el nivel de asociación al ribosoma del transcrito se corresponde con los niveles proteicos. Al contrario que en nuestros resultados, en *Nicotiana tabacum* se observó que el nivel de ARNm para *Cox2* asociado a ribosoma no correlaciona con el nivel proteico de COX2 (Hameed et al., 2017), indicando que la expresión génica mitocondrial implica un complejo proceso de regulación transcripcional, postranscripcional y traduccional. La observación aquí expuesta de que únicamente el transcrito *Nd1*, del complejo I, presenta una menor asociación al ribosoma sugiere que la deficiencia de NDUFS4 a nivel nuclear impacta preferentemente en la subunidad ND1. De la misma manera, la deficiencia del gen nuclear *COX4*, del complejo IV, en cultivo de células humanas HEK293T bloquea primariamente la traducción del transcrito *MTCO1*, también del complejo IV, codificado en el genoma mitocondrial (Richter-Dennerlein et al., 2016), indicando que la deficiencia mitocondrial a nivel nuclear puede bloquear prioritariamente la síntesis proteica de ciertos transcritos codificados en el genoma mitocondrial, probablemente del mismo complejo mitocondrial. No obstante, los factores específicos que determinan esta preferencia es una cuestión aún por resolver. Una posible explicación sería que la traducción de las distintas subunidades proteicas codificadas en el ADNmt se realiza de acuerdo con el orden de ensamblaje de las distintas subunidades en el complejo final (Richter-Dennerlein et al., 2016; Wang et al., 2020). En este sentido, ND1 participa en la unión de la estructura hidrofílica e hidrofóbica del complejo I (Hirst, 2013) y su deficiencia causa una disrupción de la biogénesis del complejo I, impidiendo el ensamblaje de las distintas subunidades (Lim et al., 2016). Asimismo, esta subunidad se encontraría en las primeras subunidades ensambladas del complejo I de 400kDa (Mimaki et al., 2012), aunque ND2 también se ha propuesto como una de las primeras subunidades del ensamblaje

(Guerrero-Castillo et al., 2017; Wang et al., 2020). Por lo tanto, podría especularse que la deficiencia de NDUFS4 podría bloquear la biogénesis del complejo I, impactando en la traducción de las primeras subunidades proteicas en unirse. En este contexto, la delección de los factores de ensamblaje NDUF3, NDUF4, C8orf38 y C20orf7 en fibroblastos humanos tiene un impacto directo en los niveles de ND1. Estos factores están implicados en las primeras etapas del ensamblaje del complejo I mitocondrial, en la cual se encuentra el paso de incorporación de la subunidad ND1. La deficiencia de estos factores promueve, en este caso, la rápida proteólisis de la subunidad ND1 dada la falta del ensamblaje (Zurita Rendón and Shoubridge, 2012). En el caso de nuestros resultados, por tanto, quedaría por resolver que mecanismos, transcripcionales o traduccionales, modulan la disminución transcripcional de *Nd1* en ausencia de NDUFS4.

Es importante destacar, además, que la deficiencia de NDUFS4 en cultivo celular de HEK293T no parece tener un impacto en los niveles de ND1 (Stroud et al., 2016), mientras que la deficiencia de ND1 en cultivo de sinaptosomas híbridos citoplasmáticos afectaría la expresión de NDUFS4 (Lim et al., 2016). Estos resultados resaltarían la importancia del modelo y tipo celular utilizado en la investigación del proceso de expresión génica mitocondrial. En este sentido, esta es la primera vez que se realiza el análisis del perfil traduccional mitocondrial de un tipo neuronal específico desde un modelo animal, que además permite integrar las respuestas celulares no-autónomas.

En resumen, la deficiencia de NDUFS4 tiene un impacto directo en la estabilidad estructural del complejo I (Petruzzella and Papa, 2002; Papa et al., 2012b). No obstante, nuestro análisis del perfil traduccional mitocondrial de las neuronas glutamatérgicas vestibulares con deficiencia de NDUFS4 señalaría que, adicionalmente, la síntesis proteica de la subunidad ND1 se vería reducida, en parte, debido a una reducción en la asociación al ribosoma mitocondrial del transcrito *Nd1* (Figura 47). Adicionalmente, aunque el nivel de asociación al

Discusión

ribosoma mitocondrial del resto de las subunidades codificadas en el ADNmt no difiere significativamente del grupo control en caso de deficiencia de NDUFS4 en las neuronas glutamatérgicas vestibulares murinas, no podemos descartar otro tipo de afectación a estas subunidades a otros niveles. Así, el nivel proteico de las subunidades ND2 y ND5 sí se ven reducidas en este mismo tipo neuronal (Gella et al., 2020).

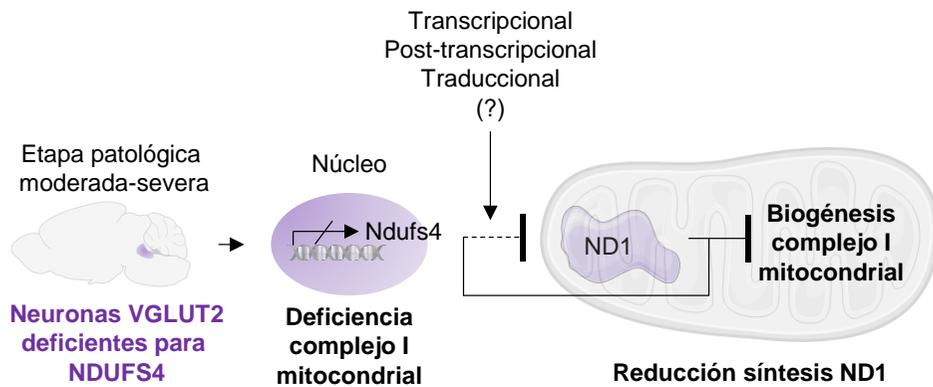


Figura 47. Representación del posible impacto de la delección de NDUFS4 en el control de la expresión génica mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares. La delección del gen *Ndufs4* podría inhibir directamente la biogénesis del complejo I mitocondrial por la falta de estabilidad estructural del complejo I. Asimismo, esta deficiencia podría modular la expresión génica y proteica de la subunidad ND1 codificada en el ADNmt, la cual impediría la biogénesis del complejo I en etapas iniciales del ensamblaje. Flechas: activación. Líneas: inhibición.

Dada la importancia de los factores de ensamblaje nucleares en el metabolismo mitocondrial (Alston et al., 2017), sería interesante determinar su potencial terapéutico dirigiendo el ensamblaje del complejo I en caso de disfunción de NDUFS4 en las neuronas glutamatérgicas vestibulares como posible tratamiento para los pacientes con SL. Esta mejora podría reducir los problemas motores y respiratorios asociados a la disfunción mitocondrial en las neuronas glutamatérgicas vestibulares (Bolea et al., 2019), resolviendo una de las primeras causas de muerte en el SL (Sofou et al., 2014).

En conjunto a los resultados del perfil traduccional citosólico, esta tesis doctoral ha aportado potenciales mecanismos patológicos que pueden resultar de interés en el tratamiento del SL. Significativamente, una aproximación de tipo celular ha permitido entender la patología en el contexto de disfunción del complejo I mitocondrial, más allá de un ambiente neurodegenerativo y neuroinflamatorio, elucidando nuevas dianas terapéuticas que representan una nueva oportunidad para los pacientes afectados por enfermedades mitocondriales sin cura.

Conclusions

(Conclusiones)

Based on the outlined aims and hypothesis of this doctoral thesis, the results obtained here allowed us to conclude:

1. NDUFS4 deficiency, both in rodent GABAergic and glutamatergic neurons, activates an immune response in the host tissue. However, the molecular mechanisms underlying neuronal susceptibility to mitochondrial complex I dysfunction are unique and defined, at least, by the cytosolic translational profile of each neuronal population, as demonstrated by the following evidences:
 - 1.1. Complex I deficiency in GABAergic neurons from the olfactory bulb early promotes an antiviral response mediated by interferon type I. This response could be driven by mitochondria-derived factors triggered by NDUFS4 deficiency that, in turn, would activate PKR to initiate an antiviral response, potentially blocking protein synthesis, exacerbating the impairment on oxidative phosphorylation, and disturbing inhibitory neurotransmission.
 - 1.2. NDUFS4 deficiency in vestibular glutamatergic neurons leads to an increase of *Star* transcript at early stages of the disease, potentially suggesting either a retrograde stress response or the upregulation of mechanisms that require cholesterol import to mitochondria, such as steroidogenesis, which may be related to the known lipid droplet accumulation observed in *Ndufs4*KO mice.
 - 1.3. Complex I dysfunction in vestibular glutamatergic neurons results in an increase of ATF3 expression, which may lead to an increase of neuropeptide signaling as a neuroprotective response at severe pathological state.

Conclusions

- 1.4. Complex I deficiency in vestibular glutamatergic neurons leads to an increase of ribosome biogenesis related transcripts, which are not regulated by an increase in mTOR/S6K1 activity, measured by RPS6 phosphorylation. Alternatively, mTOR/4E-BP pathway could mediate the ribosome biogenesis upregulation.
2. Viral vector- based MitoRiboTag approach allows a fast and efficient isolation of the mitochondrial ribosome bound mRNA from genetically defined cell populations in complex tissues. This technology offers, for first time, the opportunity to evaluate the mitochondrial translational profile and the mitochondria-nucleus communication in physiological and pathological conditions *in vivo*, with an unprecedented cell type specific resolution.
3. NDUFS4 deficiency negatively impacts the association of *Nd1* mRNA to the mitochondrial ribosome in rodent vestibular glutamatergic neurons. Remarkably, this reduced association is likely to result in decreased levels of ND1 protein, therefore interfering with mitochondrial complex I biogenesis and aggravating bioenergetic insufficiency in this neuronal type.
4. Overall, the findings presented in this doctoral thesis provide ground-breaking insights on the pathogenic mechanisms resulting from mitochondrial complex I deficiency in susceptible neurons, offering potential therapeutic targets that could slow or halt neurodegeneration in Leigh syndrome. Further investigation is warranted to validate the functional relevance and therapeutic potential of the described mechanisms in the pathophysiology of Leigh syndrome.

Referencias

- Accardi, M. V, Daniels, B. A., Brown, P. M. G. E., Fritschy, J., Tyagarajan, S. K., and Bowie, D. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nat. Commun.* 5, 3168.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., and Enríquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539.
- Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Anikin, M., and Temiakov, D. (2015). Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science (80-)*. 347, 548–551.
- Agnello, C. D., Leo, S., Agostino, A., Tiveron, C., Zulian, A., Prella, A., et al. (2007). Increased longevity and refractoriness to Ca-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 16, 431–444.
- Agostino, A., Invernizzi, F., Tiveron, C., Fagiolari, G., Prella, A., Lamantea, E., et al. (2003). Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 399–413.
- Alston, C. L., Rocha, M. C., Lax, N. Z., Turnbull, D. M., and Taylor, R. W. (2017). The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J. Pathol.* 241, 236–250.
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W., and Ramakrishnan, V. (2015). The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science (80-)*. 348, 95–98.
- Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2015). HTSeq — a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>.
- Apelo, S. I. A., and Lamming, D. W. (2016). Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71, 841–849.
- Arenas, F., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J. C. (2017). Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 382.
- Arii, J., and Tanabe, Y. (2000). Leigh syndrome: serial MR imaging and clinical follow-up. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 21, 1502–1509.
- Armstrong, W. E., and Tasker, J. G. (2014). *Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons.*, ed. Wiley.
- Ashton, J. C., Khalessi, A., Kapoor, M., Clarkson, A., Sammut, I. A., Darlington, C. L., et al. (2005). Characterization of mitochondrial respiratory chain energetics in the vestibular nucleus complex. *Acta Otolaryngol.* 125, 422–425.
- Assouline, Z., Jambou, M., Rio, M., Bole-feysot, C., Lonlay, P. De, Barnerias, C., et al. (2012). A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUF54 mutations in patients with Leigh syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1062–1069.
- Ast, T., Meisel, J. D., Patra, S., Wang, H., Kim, S. H., Calvo, S. E., et al. (2019). Hypoxia

Referencias

- rescues frataxin loss by restoring iron sulfur cluster biogenesis. *Cell* 177, 1507-1521.e16.
- Attwell, D., and Laughlin, S. B. (2001). An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145.
- Bae, J. R., and Kim, S. H. (2017). Synapses in neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* 50, 237–246.
- Baertling, F., Mayatepek, E., and Distelmaier, F. (2013). Hypertrichosis in presymptomatic mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* 36, 1081–1082.
- Baertling, F., Rodenburg, R. J., Schaper, J., Smeitink, J. A., Koopman, W. J. H., Mayatepek, E., et al. (2014). A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 85, 257–265.
- Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-book, N., Lauria, I., Langer, T., and Orly, J. (2014). StAR Enhances Transcription of Genes Encoding the Mitochondrial Proteases Involved in Its Own Degradation. *Mol Endocrinol* 28, 208–224.
- Banoth, B., and Cassel, S. L. (2018). Mitochondria in innate immune signaling. *Transl. Res.* 202, 52–68.
- Barchiesi, A., and Vascotto, C. (2019). Transcription, Processing, and Decay of Mitochondrial RNA in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2221.
- Barrell, B. G., Bankier, A. T., and Dourin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282, 189–194.
- Barres, B. A., Silverstein, B. E., Corey, D. P., and Chun, L. L. (1988). Immunological, Morphological, and Electrophysiological Variation among Retinal Ganglion Cells Purified by Panning. *Neuron* 1, 791–803.
- Barriocanal-Casado, E., Hidalgo-Gutiérrez, A., Raimundo, N., González-García, P., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., et al. (2019). Rapamycin administration is not a valid therapeutic strategy for every case of mitochondrial disease. *EBioMedicine* 42, 511–523.
- Baulieu, E., and Schumacher, M. (2000). Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 65, 605–612.
- Bayraktar, E. C., Baudrier, L., Özderem, C., Lewis, C. A., Ham, S., Kunchok, T., et al. (2019). MITO-Tag Mice enable rapid isolation and multimodal profiling of mitochondria from specific cell types in vivo. *PNAS* 116, 303–312.
- Behrens, M. I., Koh, J. Y., Muller, M. C., and Choi, D. W. (1996). NADPH Diaphorase-Containing Striatal or Cortical Neurons Are Resistant to Apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 3, 72–75.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., et al. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848.
- Berns, K. I., and Muzyczka, N. (2017). AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum. Gene Ther.* 28, 308–313.
- Biever, A., Valjent, E., and Puighermanal, E. (2015). Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 75.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., et al.

- (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093.
- Bird, M. J., Wijeyeratne, X. W., Komen, J. C., Laskowski, A., Ryan, M. T., Thorburn, D. R., et al. (2014). Neuronal and astrocyte dysfunction diverges from embryonic fibroblasts in the *Ndufs4* fky/fky mouse Bioscience Reports. *Biosci Rep* 34, 701–715.
- Blankenberg, F. G., Kinsman, S. L., Cohen, B. H., Goris, M. L., Spicer, K. M., Perlman, S. L., et al. (2012). Brain uptake of Tc99m-HMPAO correlates with clinical response to the novel redox modulating agent EPI-743 in patients with mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 107, 690–699.
- Boczonadi, V., and Horvath, R. (2014). Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 48, 77–84.
- Boczonadi, V., Ricci, G., and Horvath, R. (2018). Mitochondrial DNA transcription and translation: Clinical syndromes. *Essays Biochem.* 62, 321–340.
- Bolea, I., Gella, A., Sanz, E., Prada-Dacasa, P., Eraso-Pichot, A., Menardy, F., et al. (2019). Defined neuronal populations drive fatal phenotype in a mouse model of Leigh syndrome. *Elife* 8, e47163.
- Bonekamp, N. A., and Larsson, N.-G. (2018). SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* 172, 388–388.e1.
- Borgius, L., Restrepo, C. E., Leao, R. N., Saleh, N., and Kiehn, O. (2010). A transgenic mouse line for molecular genetic analysis of excitatory glutamatergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 45, 245–257.
- Borowski, L. S., Dziembowski, A., Hejnowicz, M. S., Stepień, P. P., and Szczesny, R. J. (2013). Human mitochondrial RNA decay mediated by PNPase – hSuv3 complex takes place in distinct foci. *Nucleic Acids Res.* 41, 1223–1240.
- Bratic, A., and Larsson, N. (2013). The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 123, 951–957.
- Breda, C. N. de S., Davanzo, G. G., Basso, P. J., Olsen, N., Câmara, S., Manoel, P., et al. (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol.* 26, 101255.
- Brenner, O., and Wakshlag, J. J. (2000). Alaskan Husky encephalopathy – a canine neurodegenerative disorder resembling subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). *Acta Neuropathol* 100, 50–62.
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X., Sugimoto, Y., Edwards, P. C., Murshudov, G., et al. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science* (80-.). 346, 718–722.
- Busch, J. D., Cipullo, M., Atanassov, I., Bratic, A., Silva-Ramos, E., Schondorf, Th., et al. (2019). MitoRibo-Tag Mice Provide a Tool for In Vivo Studies of Mitoribosome Composition. *Cell Rep.* 29, 1728–1738.
- Buttgereit, F., and Brandt, M. D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* 312, 163–167.
- Cabral-Costa, J. V., and Kowaltowski, A. J. (2020). Neurological disorders and mitochondria. *Mol. Aspects Med.* 71, 100826.
- Cadenas, E., and Davies, K. J. A. (2000). Mitochondrial Free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.

Referencias

- Cagin, U., Duncan, O. F., Gatt, A. P., Dionne, M. S., Sweeney, S. T., and Bateman, J. M. (2015). Mitochondrial retrograde signaling regulates neuronal function. *PNAS* 112, E6000–E6009.
- Calvaruso, M. A., Willems, P., Brand, M. van den, Valsecchi, F., Kruse, S., Palmiter, R., et al. (2012). Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity. *Hum. Mol. Genet.* 21, 115–120.
- Canto, C., Menzies, K. J., and Auwerx, J. (2015). NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* 22, 31–53.
- Capt, C., Passamonti, M., and Breton, S. (2016). The human mitochondrial genome may code for more than 13 proteins. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 27, 3098–3101.
- Carniglia, L., Ramírez, D., Durand, D., Saba, J., Turati, J., Caruso, C., et al. (2017). Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017, 5048616.
- Castle, M. J., Turunen, H. T., Vandenberghe, L. H., and Wolfe, J. H. (2016). Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. *Methods Mol Biol* 1382, 133–149.
- Chance, B. B., and Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 17, 65–134.
- Chen, B., Hui, J., Montgomery, K. S., Gella, A., Bolea, I., Sanz, E., et al. (2017). Loss of Mitochondrial Ndufs4 in Striatal Medium Spiny Neurons Mediates Progressive Motor Impairment in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* 10.
- Chen, L., Cui, Y., Jiang, D., Ma, C. Y., Tse, H., Hwu, W. L., et al. (2018). Management of Leigh syndrome : Current status and new insights. *Clin. Genet.* 93, 1131–1140.
- Chen, W. W., Freinkman, E., Wang, T., Birsoy, K., and Sabatini, D. M. (2016). Absolute Quantification of Matrix Metabolites Reveals the Dynamics of Mitochondrial Metabolism. *Cell* 166, 1324–1337.
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., et al. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif.* 53, e12781.
- Chi, C.-S., Mak, S.-C., and Shian, W.-J. (1994). Leigh syndrome with progressive ventriculomegaly. *Pediatr. Neurol.* 10, 244–246.
- Chi, C., Lee, H., Tsai, C., Chen, W., Tung, J.-N., and Hung, H.-C. (2011). Lactate peak on brain MRS in children with syndromic mitochondrial diseases. *J. Chinese Med. Assoc.* 74, 305–309.
- Chinnery, P. F., and Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *Br. Med. Bull.* 106, 135–159.
- Cho, Y., Shin, J. E., Ewan, E. E., Oh, Y. M., Pita-Thomas, W., and Cavalli, V. (2015). Activating injury-responsive genes with hypoxia enhances axon regeneration through neuronal HIF-1 α . *Neuron* 88, 720–734.
- Chocron, E. S., Munkacsy, E., and Pickering, A. M. (2019). Cause or Casualty: The

- Role of Mitochondrial DNA in Aging and Age-Associated Disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 285–297.
- Choi, W., Kruse, S. E., Palmiter, R. D., and Xia, Z. (2008). Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *PNAS* 105, 15136–15141.
- Chugani, H. T., Phelps, M. E., and Mazziotta, J. C. (1987). Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 22, 487–197.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., et al. (2006). Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling. *Cell* 126, 163–175.
- Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S., et al. (2015). Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metab.* 21, 845–854.
- Clerc, P., and Polster, B. M. (2012). Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons. *PLoS One* 7, e34465.
- Collart, M. A., and Weiss, B. (2020). Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic Acids Res.* 48, 1043–1055.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-cabrero, D., Cervera, A., Mcpherson, A., et al. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 17, 13.
- Couvillion, M. T., and Churchman, L. S. (2017). Mitochondrial Ribosome (Mitoribosome) Profiling for Monitoring Mitochondrial Translation In Vivo. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 119, 4.28.1–4.28.25.
- Couvillion, M. T., Soto, I. C., Shipkovenska, G., and Churchman, L. S. (2016). Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. *Nature* 533, 499–503.
- Cunningham, F., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Amode, M. R., Armean, I. M., et al. (2019). Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, 745–751.
- Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., and Mootha, V. K. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1 – PGC-1 a transcriptional complex. *Nature* 450, 29.
- D’Souza, A. R., and Minczuk, M. (2018). Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays Biochem.* 62, 309–320.
- Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A., Holme, E., and Tulinius, M. (2001). The Incidence of Mitochondrial Encephalomyopathies in Childhood: Clinical Features and Morphological, Biochemical, and DNA Abnormalities. *Ann Neurol* 49, 377–383.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., et al. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146, 247–261.
- Datta, S., and Nettleton, D. (2014). *Statistical Analysis of Next Generation Sequencing Data*. Springer.

Referencias

- Davis, C. O., Kim, K., Bushong, E. A., Mills, E. A., Boassa, D., Shih, T., et al. (2014). Transcellular degradation of axonal mitochondria. *PNAS* 111, 9633–9638.
- De Haas, R., Das, D., Garanto, A., Renkema, H. G., Greupink, R., Van Den Broek, P., et al. (2017). Therapeutic effects of the mitochondrial ROS-redox modulator KH176 in a mammalian model of Leigh Disease. *Sci. Rep.* 7, 11733.
- Devine, M. J., and Kittler, J. T. (2018). Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19, 63–80.
- Dhar, S. S., Liang, H. L., and Wong-Riley, M. T. T. (2009). Transcriptional coupling of synaptic transmission and energy metabolism: Role of nuclear respiratory factor 1 in co-regulating neuronal nitric oxide synthase and cytochrome c oxidase genes in neurons. *BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 1604–1613.
- Dhir, A., Dhir, S., Borowski, L. S., Jimenez, L., Teitell, M., Rötig, A., et al. (2018). Mitochondrial double-stranded RNA triggers antiviral signalling in humans. *Nature* 560, 238–242.
- Di Filippo, M., Chiasserini, D., Tozzi, A., Picconi, B., and Calabresi, P. (2010). Mitochondria and the Link Between Neuroinflammation and Neurodegeneration. *J. Alzheimer's Dis.* 20, S369–S379.
- DiMauro, S., and Schon, E. A. (2008). Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci* 31, 91–123.
- DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V., and Hirano, M. (2013). The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 429–444.
- Distelmaier, F., Haack, T. B., Wortmann, S. B., Mayr, J. A., and Prokisch, H. (2017). Treatable mitochondrial diseases: cofactor metabolism and beyond. *Brain* 140, e11.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Dobin, A., and Gingeras, T. R. (2016). Mapping RNA-seq Reads with STAR Alexander. *Curr Protoc Bioinforma.* 51, 11.14.1–11.14.19.
- Dougherty, X. J. D. (2017). The Expanding Toolkit of Translating Ribosome Affinity Purification. *J. Neurosci.* 37, 12079–12087.
- Douri, S., Bahdoudi, S., Hamdi, Y., Cubi, R., Basille, M., Fournier, A., et al. (2016). Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 137, 913–930.
- Doyle, J. P., Dougherty, J. D., Heiman, M., Schmidt, E. F., Stevens, T. R., Ma, G., et al. (2008). Application of a Translational Profiling Approach for the Comparative Analysis of CNS Cell Types. *Cell* 135, 749–762.
- Dubinsky, J. M. (2009). Heterogeneity of nervous system mitochondria: Location, location, location! *Exp. Neurol.* 218, 293–307.
- Durrant, D. M., Ghosh, S., and Klein, R. S. (2016). The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 464–469.
- Dutra, F., Moreira, L., López, J. A., Campo, R., Morales-paytuví, F., Tort, O., et al.

- (2020). Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. *Science (80-.)*. 370, eaay8085.
- Elstner, M., Morris, C. M., Heim, K., Bender, A., Mehta, D., Jaros, E., et al. (2011). Expression analysis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease and aging links transcriptional dysregulation of energy metabolism to cell death. *Acta Neuropathol* 122, 75–86.
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., et al. (1996). Laser Capture Microdissection. *Science (80-.)*. 274, 998–1001.
- Englmeier, R., Pfeffer, S., and Forster, F. (2017). Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied In Situ by Cryoelectron Tomography. *Structure* 25, 1574–1581.
- Enns, G. M., Moore, T., Le, A., Atkuri, K., Shah, M. K., Cusmano-, K., et al. (2014). Degree of Glutathione Deficiency and Redox Imbalance Depend on Subtype of Mitochondrial Disease and Clinical Status. *PLoS One* 9, e100001.
- Eraso-Pichot, A., Braso-Vives, M., Golbano, A., Menacho, C., Claro, E., Galea, E., et al. (2018). GSEA of mouse and human mitochondriomes reveals fatty acid oxidation in astrocytes. *Glia* 66, 1724–1735.
- Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: A Historical Review. *J. Cell Biol.* 91, 227–255.
- Espinosa-Jovel, C., Toledano, R., Jimenez-Huete, A., Aledo-Serrano, A., Garcia-Morales, I., Campo, P., et al. (2019). Olfactory function in focal epilepsies: Understanding mesial temporal lobe epilepsy beyond the hippocampus. *Epilepsia Open* 4, 487–492.
- Falk, M. J., Kayser, E., Morgan, P. G., and Sedensky, M. M. (2006). Report Mitochondrial Complex I Function Modulates Volatile Anesthetic Sensitivity in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 16, 1641–1645.
- Fassone, E., and Rahman, S. (2012). Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet* 49, 578–590.
- Fecher, C., Trovò, L., Müller, S. A., Snaidero, N., Wettmarshausen, J., Heink, S., et al. (2019). Cell-type-specific reveals functional and molecular diversity. *Nat. Neurosci.* 22, 1731–1742.
- Felici, R., Cavone, L., Lapucci, A., Guasti, D., Bani, D., and Chiarugi, A. (2014). PARP Inhibition Delays Progression of Mitochondrial Encephalopathy in Mice. *Neurotherapeutics* 11, 651–664.
- Fendt, S. M., and Verstreken, P. (2017). Neurons eat glutamate to stay alive. *J Cell Biol* 216, 863–865.
- Ferrari, M., Jain, I. H., Goldberger, O., Rezoagli, E., Thoonen, R., Cheng, K., et al. (2017). Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome. *PNAS* 114, E4241–E4250.
- Finsterer, J. (2008). Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatr Neurol* 39, 223–235.
- Finsterer, J., and Scorza, F. A. (2017). Effects of antiepileptic drugs on mitochondrial functions, morphology, kinetics, biogenesis, and survival. *Epilepsy Res.* 136, 5–11.

Referencias

- Finsterer, J., and Zarrouk-Mahjoub, S. (2017). Why does Leigh syndrome respond to immunotherapy? *Mol. Genet. Metab. Reports* 11, 90–91.
- Fischer, R., and Maier, O. (2015). Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 610813.
- Franklin, K., and Paxinos, G. (2007). *The mouse brain atlas in stereotaxic coordinates*. Third. Elsevier.
- Gardner, B., Dieriks, B. V, Cameron, S., Mendis, L. H. S., Turner, C., Faull, R. L. M., et al. (2017). Metal concentrations and distributions in the human olfactory bulb in Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 7, 10454.
- Gehrke, S., Wu, Z., Klinkenberg, M., Sun, Y., Auburger, G., Guo, S., et al. (2015). PINK1 and Parkin Control Localized Translation of Respiratory Chain Component mRNAs on Mitochondria Outer Membrane. *Cell Metab.* 21, 95–108.
- Gella, A., Prada-Dacasa, P., Urpi, A., González-Torres, M., Abian, J., Sanz, E., et al. (2020). Mitochondrial Proteome of Affected Glutamatergic Neurons in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Front. cell Dev. Biol.* 8, 660.
- Gerards, M. (2014). Leigh syndrome: the genetic heterogeneity story continues. *Brain* 137, 2872–2878.
- Gerards, M., Bosch, B. J. C. Van Den, Danhauser, K., Serre, V., Weeghel, M. Van, Wanders, R. J. A., et al. (2011). Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene. *Brain* 134, 210–219.
- Gerards, M., Sallevelt, S. C. E. H., and Smeets, H. J. M. (2016). Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Mol. Genet. Metab.* 117, 300–312.
- Gerhardt, K. (2016). Progesterone and Endocannabinoid Interaction Alters Sperm Activation. *Biol. Reprod.* 95, 9.
- Gey, M., Wanner, R., Schilling, C., Pedro, M. T., Sinske, D., and Knoll, B. (2016). Atf3 mutant mice show reduced axon regeneration and impaired regeneration-associated gene induction after peripheral nerve injury. *Open Biol* 6, 160091.
- Gibson, G. E., and Thakkar, A. (2018). Neurochemistry International Mitochondria / metabolic reprogramming in the formation of neurons from peripheral cells: Cause or consequence and the implications to their utility. *Neurochem. Int.* 117, 65–76.
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., et al. (2013). The Mitochondrial Nucleoid: Integrating mitochondrial dna into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a011080.
- Goldman, S. A., Pulsinelli, W. A., Clarke, W. Y., Kraig, R. P., and Plum, F. (1989). The Effects of Extracellular Acidosis on Neurons and Glia In Vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 471–477.
- Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C. R., Cummins, A., Hatten, M. E., Heintz, N., et al. (2007). Targeting Cre Recombinase to Specific Neuron Populations with Bacterial Artificial Chromosome Constructs. *J. Neurosci.* 27, 9817–9823.

- Gorman, S., Schaefer, A. M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E. L., Alston, C. L., et al. (2015). Prevalence of Nuclear and Mitochondrial DNA Mutations Related to Adult Mitochondrial Disease. *Ann Neurol* 77, 753–759.
- Gray, F., Louarn, F., Gherardi, R., Eizenbaum, J. F., and Marsaultt, C. (1984). Adult form of Leigh's disease: a clinico pathological case with CT scan examination. *J. Neurosurg. Psychiatry* 47, 1211–1215.
- Greber, B. J., and Ban, N. (2016). Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annu Rev Biochem* 85, 103–132.
- Greber, B. J., Boehringer, D., Leibundgut, M., Bieri, P., Leitner, A., Schmitz, N., et al. (2014). The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* 515, 283–286.
- Grimm, A., Cummins, N., and Götz, J. (2018). Local Oxidative Damage in the Soma and Dendrites Quarantines Neuronal Mitochondria at the Site of Insult. *iScience* 6, 114–127.
- Gu, H., Zou, Y.-R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155–1164.
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H. J., Arnold, S., Brandt, U., et al. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* 25, 128–139.
- Guo, R., Gu, J., Zong, S., Wu, M., and Yang, M. (2018). Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed. J.* 41, 9–20.
- Gurumurthy, C. B., and Lloyd, K. C. K. (2019). Generating mouse models for biomedical research: technological advances. *Dis. Model. Mech.* 12, dmm029462.
- Haack, T. B., Klee, D., Strom, T. M., Mayatepek, E., Meitinger, T., Prokisch, H., et al. (2014). Infantile Leigh-like syndrome caused by SLC19A3 mutations is a treatable disease. *Brain* 137, e295.
- Hameed, M. W., Juszczak, I., Bock, R., and van Dongen, J. T. (2017). Comparison of mitochondrial gene expression and polysome loading in different tobacco tissues. *Plant Methods* 13, 112.
- Hammans, S. R., Sweeney, M. G., Brockington, M., Morgan-Hughes, J. A., and Harding, A. E. (1991). Mitochondrial encephalopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 337, 1311–1313.
- Hannon, G. J. (2010). FASTX-Toolkit. Available at: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit.
- Harris, J. J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron* 75, 762–777.
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., et al. (2017). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535, 551–555.
- Hayashi, G., and Cortopassi, G. (2015). Oxidative Stress in Inherited Mitochondrial Diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 10–17.
- Hayhurst, H., Anagnostou, M., Bogle, H. J., Grady, J. P., Taylor, R. W., Bindoff, L. A., et al. (2019). Dissecting the neuronal vulnerability underpinning Alpers'

Referencias

- syndrome: a clinical and neuropathological study. *Brain Pathol* 29, 97–113.
- Hegde, V. R., Vogel, R., and Feany, M. B. (2014). Glia are critical for the neuropathology of complex I deficiency in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4686–4692.
- Heiman, M., Kulicke, R., Fenster, R. J., Greengard, P., and Heintz, N. (2014). Cell type - specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* 9, 1282–1291.
- Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J. D., Day, M., Ramsey, K. E., et al. (2008). A Translational Profiling Approach for the Molecular Characterization of CNS Cell Types. *Cell* 135, 738–748.
- Hernandez, J. P., Xu, F., and Frazier, D. T. (2004). Medial vestibular nucleus mediates the cardiorespiratory responses to fastigial nuclear activation and hypercapnia. *J Appl Physiol* 97, 835–842.
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M., and Berridge, M. V (2017). Functional Mitochondria in Health and Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 296.
- Heyer, E. E., and Moore, M. J. (2016). Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell* 164, 757–769.
- Hillen, H. S., Temiakov, D., and Cramer, P. (2018). Structural basis of mitochondrial transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 754–765.
- Hinton, T., and Johnston, G. A. R. (2018). “GABA, The Major Inhibitory Neurotransmitter in the Brain,” in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier), 1–15.
- Hirose, M., Schilf, P., Gupta, Y., Zarse, K., Künstner, A., Fähnrich, A., et al. (2018). Low-level mitochondrial heteroplasmy modulates DNA replication, glucose metabolism and lifespan in mice. *Sci. Rep.* 8, 5872.
- Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 551–575.
- Holt, I. J., Harding, A. E., and Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717–719.
- Huang, J., Liu, P., and Wang, G. (2018). Regulation of mitochondrion-associated cytosolic ribosomes by mammalian mitochondrial ribonuclease T2 (RNASET2). *J Biol Chem* 293, 19633–19644.
- Hubbard, W. B., Harwood, C. L., Prajapati, P., Springer, J. E., Saatman, K. E., and Sullivan, P. G. (2019). Fractionated mitochondrial magnetic separation for isolation of synaptic mitochondria from brain tissue. *Sci. Rep.* 9, 9656.
- Iadevaia, V., Liu, R., and Proud, C. G. (2014). mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 113–120.
- Iborra, F. J., Kimura, H., and Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2, 9.
- Ighodaro, O. M., and Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293.
- Ignatenko, O., Chilov, D., Paetau, I., De Miguel, E., Jackson, C. B., Capin, G., et al. (2018). Loss of mtDNA activates astrocytes and leads to spongiform

- encephalopathy. *Nat. Commun.* 9, 70.
- Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, A. M., and Weissman, J. S. (2012). The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* 7, 1534–1550.
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., and Weissman, J. S. (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science (80-.)*. 324, 218–224.
- Ingraham, C. A., Burwell, L. S., Skalska, J., Brookes, P. S., Howell, R. L., Sheu, S., et al. (2009). NDUFS4: Creation of a mouse model mimicking a Complex I disorder. *Mitochondrion* 9, 204–210.
- Ito, T. K., Lu, C., Khan, J., Nguyen, Q., Huang, H. Z., Kim, D., et al. (2017). Hepatic S6K1 Partially Regulates Lifespan of Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency. *Front. Genet.* 8, 113.
- Jabeen, S. A., Sandeep, G., Mridula, K. R., Meena, A. K., Borgohain, R., and Sundaram, C. (2016). Adult-onset Leigh's disease: A rare entity. *Ann. Indian Acad. Neurol.* 19, 140–142.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2010). THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113–127.
- Jain, I. H., Zazzeron, L., Goldberger, O., Ichinose, F., Zapol, W. M., and Mootha, V. K. (2019). Leigh Syndrome Mouse Model Can Be Rescued by Interventions that Normalize Brain Hyperoxia , but Not HIF Activation. *Cell Metab.* 30, 824–832.
- Jain, I. H., Zazzeron, L., Goli, R., Alexa, K., Schatzman-Bone, S., Dhillon, H., et al. (2016). Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science (80-.)*. 352, 6281.
- Janky, R., Verfaillie, A., Imrichova, H., Sande, B. Van de, Standaert, L., Christiaens, V., et al. (2014). iRegulon: From a Gene List to a Gene Regulatory Network Using Large Motif and Track Collections. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003731.
- Jelitai, M., and Madarasz, E. (2005). The role of gaba in the early neuronal development. *Int. Rev. Neurobiol.* 71, 27–62.
- Jin, J., Zhao, X., Fu, H., and Gao, Y. (2020). The Effects of YAP and Its Related Mechanisms in Central Nervous System Diseases. *Front. Neurosci.* 14, 595.
- Johnson, S. C., Kayser, E., Bornstein, R., Stokes, J., Bitto, A., Yeon, K., et al. (2020). Regional metabolic signatures in the Ndufs4(KO) mouse brain implicate defective glutamate α -ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 130, 118–132.
- Johnson, S. C., Yanos, M. E., Bitto, A., Castanza, A., Gagnidze, A., Gonzalez, B., et al. (2015). Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front. Genet.* 6, 247.
- Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E.-B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., et al. (2013). mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science (80-.)*. 342, 1524–1528.
- Johnston, M. V (2005). Excitotoxicity in Perinatal Brain Injury. *Brain Pathol* 15,

Referencias

- 234–240.
- Jump, D. B. (2009). Mammalian Fatty Acid Elongases. *Methods Mol Biol* 579, 375–389.
- Jung, J., and Jung, H. (2016). Methods to analyze cell type-specific gene expression profiles from heterogeneous cell populations. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. 20, 113–117.
- Justice, M. J., and Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Dis. Model. Mech.* 9, 101–103.
- Kambe, Y., and Miyata, A. (2012). Role of Mitochondrial Activation in PACAP Dependent Neurite Outgrowth. *J Mol Neurosci* 48, 550–557.
- Kang, C., and Ji, L. L. (2012). Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1271, 110–117.
- Karamanlidis, G., Lee, C. F., Garcia-menendez, L., Kolwicz, S. C., Suthammarak, W., Gong, G., et al. (2013). Mitochondrial Complex I Deficiency Increases Protein Acetylation and Accelerates Heart Failure. *Cell Metab.* 18, 239–250.
- Karkucinska-Wieckowska, A., Lebidzinska, M., Jurkiewicz, E., Pajdowska, M., Trubicka, J., Szymanska-Debinska, T., et al. (2011). Increased reactive oxygen species (ROS) production and low catalase level in fibroblasts of a girl with MEGDEL association (Leigh syndrome, deafness, 3-methylglutaconic aciduria). *Folia Neuropathol* 49, 56–63.
- Kayser, E., Sedensky, M. M., and Morgan, P. G. (2016). Region-Specific Defects of Respiratory Capacities in the Ndufs4(KO) Mouse Brain. *PLoS One* 11, e0148219.
- Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., and Huang, D. (2018). Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during. *Cell Biol. Int.* 42, 384–392.
- Kehrein, K., Schilling, R., Möller-Hergt, B. V., Wurm, C. A., Jakobs, S., Lamkemeyer, T., et al. (2015). Organization of Mitochondrial Gene Expression in Two Distinct Ribosome-Containing Assemblies. *Cell Rep.* 10, 843–853.
- Khalifa, A. R. M., Abdel-Rahman, E. A., Mahmoud, A. M., Ali, M. H., Noureldin, M., Saber, S. H., et al. (2017). Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. *Physiol. Rep.* 5, e13125.
- Khazal, F. Al, Holte, M. N., Bolon, B., White, T. A., Lebrasseur, N., and Maher, L. J. (2019). A conditional mouse model of complex II deficiency manifesting as Leigh-like syndrome. *Faseb J.* 33, 13189–13201.
- Kilbride, S. M., Telford, J. E., Tipton, K. F., and Davey, G. P. (2008). Partial inhibition of complex I activity increases Ca²⁺ independent glutamate release rates from depolarized synaptosomes. *J. Neurochem.* 106, 826–834.
- Kim, H.-W., Choi, W.-S., Sorscher, N., Park, H. J., Tronche, F., Palmiter, R. D., et al. (2015). Genetic reduction of mitochondrial complex I function does not lead to loss of dopamine neurons in vivo. *Neurobiol. Aging* 36, 2617–2627.
- Kim, H., Kim, M., Im, S., and Fang, S. (2018a). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34, 147–159.
- Kim, Y., Park, J., Kim, S., Kim, M. A., Kang, M. G., Kwak, C., et al. (2018b). PKR Senses

- Nuclear and Mitochondrial Signals by Interacting with Endogenous Double-Stranded RNAs. *Mol. Cell* 71, 1051–1063.
- King, H. A., and Gerber, P. (2016). Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genomics* 15, 22–31.
- Kiss, D. S., Toth, I., Jocsak, G., Sterczar, A., Bartha, T., Frenyo, L. V., et al. (2016). Preparation of purified perikaryal and synaptosomal mitochondrial fractions from relatively small hypothalamic brain samples. *MethodsX* 3, 417–429.
- Knight, R. D., Landweber, L. F., and Yarus, M. (2001). How Mitochondria Redefine the Code. *J Mol Evol* 53, 299–313.
- Knight, Z. A., Tan, K., Birsoy, K., Schmidt, S., Garrison, J. L., Wysocki, R. W., et al. (2012). Molecular Profiling of Activated Neurons by Phosphorylated Ribosome Capture. *Cell* 151, 5.
- Kodama, T., Guerrero, S., Shin, M., Moghadam, S., Faulstich, M., and Lac, S. (2012). Neuronal Classification and Marker Gene Identification via Single-Cell Expression Profiling of Brainstem Vestibular Neurons Subserving Cerebellar Learning. *J. Neurosci.* 32, 7819–7831.
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. *CRAN*. Available at: <https://cran.r-project.org/package=pheatmap>.
- Koopman, W. J. H., Verkaart, S., Vries, S. E. V. E., Grefte, S., Smeitink, J. A. M., Nijtmans, L. G. J., et al. (2008). Mitigation of NADH: Ubiquinone oxidoreductase deficiency by chronic Trolox treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 853–859.
- Kopinski, P. K., Janssen, K. A., Schaefer, P. M., Trefely, S., Perry, C. E., Potluri, P., et al. (2019). Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. *PNAS* 116, 16028–16035.
- Koripella, R. K., Sharma, M. R., Bhargava, K., Datta, P. P., Kaushal, P. S., Keshavan, P., et al. (2020). Structures of the human mitochondrial ribosome bound to EF-G1 reveal distinct features of mitochondrial translation elongation. *Nat. Commun.* 11.
- Kouga, T., Takagi, M., Miyauchi, A., Shimbo, H., Iai, M., Yamashita, S., et al. (2018). Japanese Leigh syndrome case treated with EPI-743. *Brain Dev* 40, 145–149.
- Kristian, T. (2010). Isolation of mitochondria from the CNS. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter, Unit: 7.22.1-7.22.12.
- Kruse, S. E., Watt, W. C., Marcinek, D. J., Kapur, R. P., Kenneth, A., and Palmiter, R. D. (2008). Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy. *Cell Metab* 7, 312–320.
- Kumar, T. R., Larson, M., Wang, H., McDermott, J., and Bronshteyn, I. (2009). Transgenic Mouse Technology: Principles and Methods. *Methods Mol Biol* 590, 335–362.
- Kuzawa, C. W., Chugani, H. T., Grossman, L. I., Lipovich, L., Muzik, O., Hof, P. R., et al. (2014). Metabolic costs and evolutionary implications of human brain development. *PNAS* 111, 13010–13015.
- Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P., and Paetau, A. (2015). Leigh Syndrome:

Referencias

- Neuropathology and Pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 74, 482–492.
- Lake, N. J., Compton, A. G., Rahman, S., and Thorburn, D. R. (2016). Leigh Syndrome: One Disorder, More Than 75 Monogenic Causes. *Ann Neurol* 79, 190–203.
- Lakhani, R., Vogel, K. R., Till, A., Liu, J., Burnett, S. F., Gibson, K. M., et al. (2014). Defects in GABA metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by mTOR inhibition. *EMBO Mol Med* 6, 551–566.
- Lane, N., and Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* 467, 929–934.
- Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594.
- Larsson, O., Morita, M., Topisirovic, I., Alain, T., Blouin, M., Pollak, M., et al. (2012). Distinct perturbation of the transcriptome by the antidiabetic drug metformin. *PNAS* 109, 8977–8982.
- Lazarou, M., Mckenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D. R., and Ryan, M. T. (2007). Analysis of the Assembly Profiles for Mitochondrial- and Nuclear-DNA-Encoded Subunits into Complex I. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4228–4237.
- Lechuga-Vieco, A. V., Latorre-Pellicer, A., Johnston, I. G., Prota, G., Gileadi, U., Justo-Méndez, R., et al. (2020). Cell identity and nucleo-mitochondrial genetic context modulate OXPHOS performance and determine somatic heteroplasmy dynamics. *Sci Adv* 6, eaba5345.
- Lee, C. F., Caudal, A., Abell, L., Gowda, G. A. N., and Tian, R. (2019a). Targeting NAD⁺ Metabolism as Interventions for Mitochondrial Disease. *Sci. Rep.* 9, 3073.
- Lee, H., Fenster, R. J., Pineda, S. S., Gibbs, W. S., Mohammadi, S., Davila-Velderrain, J., et al. (2020). Cell Type-Specific Transcriptomics Reveals that Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial RNA Release and Neuronal Innate Immune Activation. *Neuron* 107, 891-908.e8.
- Lee, S., Na, J., and Lee, Y. (2019b). Epilepsy in Leigh Syndrome With Mitochondrial DNA Mutations. *Front. Neurol.* 10, 496.
- Leigh, D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 14, 216–221.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176.
- Leister, D., and Herrmann, J. M. (2007). *Mitochondria Practical Protocols*. Springer International Publishing.
- Leonard, W. R., Robertson, M. L., Snodgrass, J. J., and Kuzawa, C. W. (2003). Metabolic correlates of hominid brain evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* 136 Part A, 5–15.
- Leong, D. W., Komen, J. C., Hewitt, C. A., Arnaud, E., Mckenzie, M., Phipson, B., et al. (2012). Proteomic and Metabolomic Analyses of Mitochondrial Complex I-deficient Mouse Model Generated by Spontaneous B2 Short Interspersed Nuclear Element (SINE) Insertion into NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S Protein 4 (Ndufs4) Gene. *J. Biol. Chem.* 287, 20652–20663.

- Leshinsky-Silver, E., Lev, D., Malinger, G., Shapira, D., Cohen, S., Lerman-sagie, T., et al. (2010). Leigh disease presenting in utero due to a novel missense mutation in the mitochondrial DNA – ND3. *Mol. Genet. Metab.* 100, 65–70.
- Li, B. B., Qian, C., Gameiro, P. A., Liu, C., Jiang, T., Roberts, T. M., et al. (2018). Targeted profiling of RNA translation reveals mTOR- 4EBP1/2-independent translation regulation of mRNAs encoding ribosomal proteins. *PNAS* 115, E9325–E9332.
- Li, H., and Auwerx, J. (2020). Mouse Systems Genetics as a Prelude to Precision Medicine. *Trends Genet.* 36, 259–272.
- Lian, X., Guo, J., Gu, W., Cui, Y., Zhong, J., Jin, J., et al. (2016). Genome-Wide and Experimental Resolution of Relative Translation Elongation Speed at Individual Gene Level in Human Cells. *PLOS Genet.* 12, e1005901.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., and Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* 47, W199–W205.
- Lim, S. C., Hroudová, J., Van Bergen, N. J., Lopez Sanchez, M. I. G., Trounce, I. A., and McKenzie, M. (2016). Loss of mitochondrial DNA-encoded protein ND1 results in disruption of complex I biogenesis during early stages of assembly. *FASEB J.* 30, 2236–2248.
- Ling, N. X. Y., Kaczmarek, A., Hoque, A., Davie, E., Ngoei, K. R. W., Morrison, K. R., et al. (2020). mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat. Metab.* 2, 41–42.
- Lisowski, P., Kannan, P., Mlody, B., and Prigione, A. (2018). Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. *EMBO Rep.* 19, e45432.
- Liu, L., Mackenzie, K. R., Putluri, N., Maletic-Savatic, M., and Bellen, H. J. (2017a). The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab.* 26, 719–737.
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., et al. (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* 160, 177–190.
- Liu, X., Trakooljul, N., Hadlich, F., Murani, E., Wimmers, K., and Ponsuksili, S. (2017b). Mitochondrial-nuclear crosstalk, haplotype and copy number variation distinct in muscle fiber type, mitochondrial respiratory and metabolic enzyme activities. *Sci. Rep.* 7, 14024.
- Lopez-Gallardo, E., Emperador, S., Solano, A., Llobet, L., Martín-Navarro, A., Lopez-Perez, M. J., et al. (2014). Expanding the clinical phenotypes of MT-ATP6 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 23, 6191–6200.
- Lopez-Sanchez, M. I. G., Mercer, T. R., Davies, S. M. K., Shearwood, A.-M. J., Nygård, K. K. A., Richman, T. R., et al. (2011). RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle* 10, 2904–2916.
- Lopez, K. G. de la C., Guzman, M. E. T., Sanchez, E. O., and Carranca, A. G. (2019). mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front. Oncol.* 9, 1373.
- Lord, C. C., Thomas, G., and Brown, J. M. (2013). Mammalian alpha beta hydrolase

Referencias

- domain (ABHD) proteins: lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1831, 792–802.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Luo, L., Ambrozkiwicz, M. C., Benseler, F., Chen, C., Dumontier, E., Falkner, S., et al. (2020). Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors. *Neuron* 106, 37–65.
- Luo, L., Callaway, E. M., and Svoboda, K. (2008). Genetic Dissection of Neural Circuits. *Neuron* 57, 634–660.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N., Slone, J., Gui, B., et al. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *PNAS* 115, 13039–13044.
- Ma, Y., Wu, T., Liu, Y., Wang, Q., Song, J., Li, X., et al. (2013). Genetic and biochemical findings in Chinese children with Leigh syndrome. *J Clin Neurosci* 20, 1591–1594.
- Mahoney, S. J., Jamie, M., and Blenis, J. (2009). *Cell Signaling in Protein Synthesis: Ribosome Biogenesis and Translation Initiation and Elongation*. Elsevier Inc.
- Mai, N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., and Lightowlers, R. N. (2017). The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res.* 367, 5–20.
- Maino, B., Agata, V. D., Severini, C., Ciotti, M. T., Calissano, P., Copani, A., et al. (2015). Igf1 and Pacap rescue cerebellar granule neurons from apoptosis via a common transcriptional program. *Cell Death Discov.* 1, 15029.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Lebacquer, O., and Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416–6422.
- Manna, P. R., Stetson, C. L., Slominski, A. T., and Pruitt, K. (2016). Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine* 51, 7–21.
- Martinelli, D., Catteruccia, M., Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Dionisi-Vici, C., et al. (2012). EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease — Genetically defined Leigh Syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 107, 383–388.
- Mastakov, M. Y., Baer, K., Symes, C. W., Leichtlein, C. B., Kotin, R. M., and During, M. J. (2002). Immunological Aspects of Recombinant Adeno-Associated Virus Delivery to the Mammalian Brain. *J. Virol.* 76, 8446–8454.
- Matilainen, O., Quirós, P. M., and Auwerx, J. (2017a). Mitochondria and Epigenetics – Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends Cell Biol.* 27, 453–463.
- Matilainen, S., Carroll, C. J., Richter, U., Euro, L., Pohjanpelto, M., Paetau, A., et al. (2017b). Defective mitochondrial RNA processing due to PNPT1 variants causes Leigh syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3352–3361.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25, 6384–6391.
- Mckelvie, P., Infeld, B., Marotta, R., Chin, J., Thorburn, D., and Collins, S. (2012).

- Late-adult onset Leigh syndrome. *J. Clin. Neurosci.* 19, 195–202.
- Mcwilliams, T. G., and Suomalainen, A. (2019). Fate of a father's mitochondria cell's force producers. *Nature* 565, 296–297.
- Mehrabian, Z., Liu, L., Fiskum, G., Rapoport, S. I., and Chandrasekaran, K. (2005). Regulation of mitochondrial gene expression by energy demand in neural cells. *J. of Neurochemistry* 93, 850–860.
- Meo, I. Di, Marchet, S., Lamperti, C., Zeviani, M., and Viscomi, C. (2017). AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther.* 24, 661–667.
- Mercer, T. R., Neph, S., Dinger, M. E., Crawford, J., Smith, M. A., Shearwood, A.-M. J., et al. (2011). The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 146, 645–658.
- Meyerson, C., Van Stavern, G., and McClelland, C. (2015). Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clin. Ophthalmol.* 9, 1165–1176.
- Mick, E., Titov, D. V., Skinner, O. S., Sharma, R., Jourdain, A. A., and Mootha, V. K. (2020). Distinct mitochondrial defects trigger the integrated stress response depending on the metabolic state of the cell. *Elife* 9, e49178.
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-suabedissen, A., and Molnár, Z. (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 78.
- Miller, W. L. (2013). Molecular and Cellular Endocrinology Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 379, 62–73.
- Mimaki, M., Wang, X., Mckenzie, M., Thorburn, D. R., and Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochem. Biophys. Acta* 1817, 851–862.
- Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., et al. (2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 4284–4299.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Morara, S., Colangelo, A. M., and Provini, L. (2015). Microglia-Induced Maladaptive Plasticity Can Be Modulated by Neuropeptides In Vivo. *Neural Plast.* 2015, 135342.
- Morello, L. G., Hesling, C., Coltri, P. P., Castilho, B. A., Rimokh, R., and Zanchin, N. I. T. (2011). The NIP7 protein is required for accurate pre-rRNA processing in human cells. *Nucleic Acids Res.* 39, 648–665.
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A., et al. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 7, 324–335.
- Morin, C., Mitchell, G., Larochelle, J., Lambert, M., Ogier, H., Robinson, B. H., et al. (1993). Clinical, Metabolic, and Genetic Aspects of Cytochrome C Oxidase Deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet* 53, 488–496.
- Morita, M., Gravel, S.-P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., et al. (2013). mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab* 18, 698–711.
- Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., et al. (2017).

Referencias

- mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol. Cell* 67, 922–935.
- Mottis, A., Herzig, S., and Auwerx, J. (2019). Mitocellular communication: Shaping health and disease. *Science* (80-.). 366, 827–832.
- Mukaneza, Y., Cohen, A., Rivard, M.-ève, Tardif, J., Deschênes, S., Ruiz, M., et al. (2019). mTORC1 is required for expression of LRPPRC and cytochrome- c oxidase but not HIF-1a in Leigh syndrome French Canadian type patient fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 317 317, 58–67.
- Murru, S., Hess, S., Barth, E., Almajan, E. R., Schatton, D., Hermans, S., et al. (2019). Astrocyte-specific deletion of the mitochondrial m-AAA protease reveals glial contribution to neurodegeneration. *Glia* 67, 1526–1541.
- Nagayama, S., Homma, R., and Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* 8, 98.
- Nakamachi, T., Farkas, J., Watanabe, J., Ohtaki, H., Dohi, K., Arata, S., et al. (2011). Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte--from neural development to neural repair. *Curr Pharm Des* 17, 973–984.
- Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C. J., Baker, B. M., and Haynes, C. M. (2012). Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation. *Science* (80-.). 337, 587–591.
- Nectow, A. R., Moya, M. V., Ekstrand, M. I., Mousa, A., McGuire, K. L., Sferrazza, C. E., et al. (2017). Rapid Molecular Profiling of Defined Cell Types Resource Rapid Molecular Profiling of Defined Cell Types Using Viral TRAP. *Cell Rep.* 19, 655–667.
- Negi, S. K., and Guda, C. (2017). Global gene expression profiling of healthy human brain and its application in studying neurological disorders. *Sci. Rep.* 7, 897.
- Ng, Y. S., and Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial disease: genetics and management. *J. Neurol.* 263, 179–191.
- Nicholls, T. J., and Minczuk, M. (2014). In D-loop : 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp. Gerontol.* 56, 175–181.
- Niklas, J., Melnyk, A., Yuan, Y., and Heinzle, E. (2011). Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells. *Anal. Biochem.* 416, 218–227.
- Nissant, A., and Pallotto, M. (2011). Integration and maturation of newborn neurons in the adult olfactory bulb – from synapses to function. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1069–1077.
- Niyazov, D. M., Kahler, S. G., and Frye, R. E. (2016). Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol. Syndromol.* 7, 122–137.
- Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470–474.
- Onyango, I. G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A. B., and Swerdlow, R. H. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 228–234.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., and Duchen, M. R. (2012). Cellular and molecular

- mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723.
- Ostergaard, E., Hansen, F. J., Sorensen, N., Duno, M., Vissing, J., Larsen, P. L., et al. (2007). Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain* 130, 853–861.
- Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem* 85, 77–101.
- Paden, C. M., Berglund, D. L., Hapner, S. J., and Welsh, C. J. (1986). A Flow Cytometric Method for Intracellular Labeling and Purification of Rare Neuronal Populations: Isolation of Fixed Neurophysin Neurons. *Brain Res.* 376, 310–319.
- Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., et al. (2016). AgRP Neural Circuits Mediate Adaptive Behaviors in the Starved State. *Nat Neurosci* 19, 734–741.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., and Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep.* 17, 1374–1395.
- Palotto, M., and Deprez, F. (2014). Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABA_A-receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 166.
- Pamenter, M. E. (2014). Mitochondria: a multimodal hub of hypoxia tolerance. *Can. J. Zool.* 92, 569–589.
- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., Rasmø, D. De, Signorile, A., et al. (2012a). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. *Adv. Mitochondrial Med.* 942, 3–37.
- Papa, S., Rasmø, D. De, Technikova-dobrova, Z., Panelli, D., Signorile, A., Scacco, S., et al. (2012b). Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett.* 586, 568–577.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 408–417.
- Parikh, S., Saneto, R., Falk, M. J., Anselm, I., Cohen, B. H., Haas, R., et al. (2009). A Modern Approach to the Treatment of Mitochondrial Disease. *Curr Treat Options Neurol* 11, 414–430.
- Park, Y., Reyna-Neyra, A., Philippe, L., and Thoreen, C. C. (2017). mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *CellReports* 19, 1083–1090.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M., Erdelyi, F., Szabo, G., and Puche, A. (2007). Quantitative Analysis of Neuronal Diversity in the Mouse Olfactory Bulb. *J. Comp. Neurol.* 501, 825–836.
- Pearce, S. F., Rebelo-Guimar, P., D'Souza, R., Powell, C. A., Haute, L. Van, and Minczuk, M. (2017). Regulation of Mammalian Mitochondrial Gene Expression: Recent Advances. *Trends Biochem. Sci.* 42, 625–639.
- Peng, M., Ostrovsky, J., Kwon, Y. J., Polyak, E., Licata, J., Tsukikawa, M., et al. (2015). Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in

Referencias

- mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4829–4847.
- Pereira, L., and Sampaio, B. (2016). Ketogenic diet for epilepsy treatment. *Arq Neuropsiquiatr* 74, 842–848.
- Perlman, R. L. (2016). Mouse models of human disease An evolutionary perspective. *Evol. Med. Public Heal.*, 170–176.
- Perry, A., and Brat, D. (2017). *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. 2n Edition. Elsevier.
- Petruzzella, V., and Papa, S. (2002). Mutations in human nuclear genes encoding for subunits of mitochondrial respiratory complex I: the NDUF54 gene. *Gene* 286, 149–154.
- Piazzini, M., Bavelloni, A., Gallo, A., Faenza, I., and Blalock, W. L. (2019). Signal Transduction in Ribosome Biogenesis: A Recipe to Avoid Disaster. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2718.
- Piccirillo, C. A., Bjur, E., Topisirovic, I., Sonenberg, N., and Larsson, O. (2014). Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nat. Immunol.* 15, 503–511.
- Pickett, E. K., Rose, J., McCrory, C., McKenzie, C. A., King, D., Smith, C., et al. (2018). Region-specific depletion of synaptic mitochondria in the brains of patients with Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol.* 136, 747–757.
- Pickrell, A. M., Fukui, H., Wang, X., Pinto, M., and Moraes, C. T. (2011). The Striatum Is Highly Susceptible to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Dysfunctions. *J. Neurosci.* 31, 9895–9904.
- Pignatelli, A., and Belluzzi, O. (2010). “Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb,” in *The Neurobiology of Olfaction* (Frontiers in Neuroscience).
- Pinto, M., and Moraes, C. T. (2013). Mitochondrial genome changes and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1198–1207.
- Pinto, M., Pickrell, A. M., and Moraes, C. T. (2012). Regional susceptibilities to mitochondrial dysfunctions in the CNS. *Biol. Chem.* 393, 275–281.
- Piroli, G. G., Manuel, A. M., Clapper, A. C., Walla, M. D., Baatz, J. E., Palmiter, R. D., et al. (2016). Succination is Increased on Select Proteins in the Brainstem of the NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) Knockout Mouse, a Model of Leigh Syndrome. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 445–461.
- Plaitakis, A., Kalef-Ezra, E., Kotzamani, D., Zaganas, I., and Spanaki, C. (2017). The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel)*. 6, 11.
- Poian, A. T. Da, El-Bacha, T., and Luz, M. R. M. P. (2010). Nutrient Utilization in Humans: Metabolism Pathways. *Nat. Educ.* 3, 11.
- Powell, S. K., and Rivera-Soto, R. (2015). Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. *Discov Med* 19, 49–57.
- Priesnitz, C., and Becker, T. (2018). Pathways to balance mitochondrial translation and protein import. *Genes Dev.* 32, 1285–1296.
- Pulliam, D. A., Deepa, S. S., Liu, Y., Hil, S., Lin, A.-L., Bhattacharya, A., et al. (2014). Complex IV Deficient Surf1^{-/-} Mice Initiate Mitochondrial Stress Responses. *Biochem J* 462, 359–371.

- Qi, G., Mi, Y., and Yin, F. (2020). Cellular Specificity and Inter-cellular Coordination in the Brain Bioenergetic System: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front. Physiol.* 10, 1531.
- Quattrocchi, C. C., Fariello, G., and Longo, D. (2016). Brainstem tegmental lesions in neonates with hypoxic- ischemic encephalopathy: Magnetic resonance diagnosis and clinical outcome. *World J Radiol* 8, 117–124.
- Quintana, A., Kruse, S. E., Kapur, R. P., Sanz, E., and Palmiter, R. D. (2010). Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *PNAS* 107, 10996–11001.
- Quintana, A., Morgan, P. G., Kruse, S. E., Palmiter, R. D., and Sedensky, M. M. (2012a). Altered anesthetic sensitivity of mice lacking Ndufs4, a subunit of mitochondrial complex I. *PLoS One* 7, e42904.
- Quintana, A., Zanella, S., Koch, H., Kruse, S. E., Lee, D., Ramirez, J. M., et al. (2012b). Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *J. Clin. Invest.* 122, 2359–2368.
- Quirós, P. M., Mottis, A., and Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 213–226.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. *Found. Stat. Comput. Vienna Austria*. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Rackham, O., Mercer, T. R., and Filipovska, A. (2012). The human mitochondrial transcriptome and the RNA-binding proteins that regulate its expression. *WIREs RNA* 3, 675–695.
- Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H. M., Danks, D. M., Kirby, M. D., Chow, C. W., et al. (1996). Leigh Syndrome: Clinical Features and Biochemical and DNA Abnormalities. *Ann Neurol* 39, 343–351.
- Ramadasan-Nair, R., Hui, J., Itsara, L. S., Morgan, P. G., and Sedensky, M. M. (2019). Mitochondrial Function in Astrocytes Is Essential for Normal Emergence from Anesthesia in Mice. *Anesthesiology* 130, 423–434.
- Ramanathan, A., and Schreiber, S. L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *PNAS* 106, 22229–22232.
- Ramsay, R. R. (2019). Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. *ChemTexts* 5, 9.
- Rangaraju, V., Lauterbach, M., and Schuman, E. M. (2019). Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity. *Cell* 176, 1–12.
- Reeve, A. K., Grady, J. P., Cosgrave, E. M., Bennison, E., Chen, C., Hepplewhite, P. D., et al. (2018). Mitochondrial dysfunction within the synapses of substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* 4.
- Rekas, A., Nagai, T., Miyawaki, A., and Ikura, M. (2002). Crystal Structure of Venus, a Yellow Fluorescent Protein with Improved Maturation and Reduced Environmental Sensitivity. *J. Biol. Chem.* 277, 50573–50578.
- Rey, N. L., Wesson, D. W., and Brundin, P. (2018). The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* 109, 226–248.

Referencias

- Reynaud-Dulaurier, R., Benegiamo, G., Marrocco, E., Al-Tannir, R., Surace, E. M., Auwerx, J., et al. (2020). Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome. *Brain* 143, 1686–1696.
- Richman, T. R., Spähr, H., Ermer, J. A., Davies, S. M. K., Viola, H. M., Bates, K. A., et al. (2016). Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice. *Nat. Commun.* 7, 11884.
- Richter-Dennerlein, R., Dennerlein, S., and Rehling, P. (2015). Integrating mitochondrial translation into the cellular context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 586–592.
- Richter-Dennerlein, R., Oeljeklaus, S., Lorenzi, I., Ronsor, C., Bareth, B., Schendzielorz, A. B., et al. (2016). Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein. *Cell* 167, 471–483.
- Richter, U., Lahtinen, T., Marttinen, P., Jacobs, H. T., Lietze, N., Nyman, T. A., et al. (2013). A Mitochondrial Ribosomal and RNA Decay Pathway Blocks Cell Proliferation. *Curr. Biol.* 23, 535–541.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y. I., Litonin, D., Cramer, P., and Temiakov, D. (2011). Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478, 269–273.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566–578.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Rocco, B. R., Oh, H., Shukla, R., Mechawar, N., and Sibille, E. (2017). Fluorescence-based cell-specific detection for laser-capture microdissection in human brain. *Sci. Rep.* 7, 14213.
- Roger, A. J., Muñoz-Gomez, S. A., and Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr. Biol.* 27, 1177–1192.
- Rojo, A. I., Mcbean, G., Cindric, M., Egea, J., Lo, M. G., Rada, P., et al. (2014). Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1766–1801.
- Rooijers, K., Loayza-puch, F., Nijtmans, L. G., and Agami, R. (2013). Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nat. Commun.* 4, 2886.
- Rorbach, J., Gao, F., Powell, C. A., D’Souza, A., Lightowers, R. N., Minczuk, M., et al. (2016). Human mitochondrial ribosomes can switch their structural RNA composition. *PNAS* 113, 12198–12201.
- Rorbach, J., and Minczuk, M. (2012). The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem. J.* 444, 357–373.
- Rose, E. M., Koo, J. C. P., Antflick, J. E., Ahmed, S. M., Angers, S., and Hampson, D. R. (2009). Glutamate Transporter Coupling to Na, K-ATPase. *J. Neurosci.* 29, 8143–8155.
- Rosenthal, N., and Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat. Cell Biol.* 9, 993–999.

- Rossi, A., Biancheri, R., Bruno, C., Rocco, M. Di, Calvi, A., Pessagno, A., et al. (2003). Leigh Syndrome with COX Deficiency and SURF1 Gene Mutations: MR Imaging Findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 24, 1188–1191.
- Rostovtseva, T. K., Queralt-martín, M., Rosencrans, W. M., and Bezrukov, S. M. (2020). Targeting the Multiple Physiologic Roles of VDAC With Steroids and Hydrophobic Drugs. *Front. Physiol.* 11, 446.
- Roth, F. C., and Draguhn, A. (2012). GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. *Neural Plast.* 2012, 805830.
- Ruhoy, I. S., and Saneto, R. P. (2014). The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl. Clin. Genet.* 7, 221–234.
- Rusecka, J., Kaliszewska, M., Bartnik, E., and Tonska, K. (2018). Nuclear genes involved in mitochondrial diseases caused by instability of mitochondrial DNA. *J. Appl. Genet.* 59, 43–57.
- Sagan, L. (1967). On the Origin of Mitosing Cells. *J Theor. Biol* 14, 225–274.
- Sage-Schwaede, A., Engelstad, K., Salazar, R., Curcio, A., Khandji, A., Garvin Jr, J. H., et al. (2019). Exploring mTOR inhibition as treatment for mitochondrial disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 6, 1877–1881.
- Saghatelyan, A., Roux, P., Migliore, M., Rochefort, C., Desmaisons, D., Charneau, P., et al. (2005). Activity-Dependent Adjustments of the Inhibitory Network in the Olfactory Bulb following Early Postnatal Deprivation. *Neuron* 46, 103–116.
- Salama, M., El-desouky, S., Alsayed, A., El-hussiny, M., Moustafa, A., Taalab, Y., et al. (2019). FOXRED1 silencing in mice: a possible animal model for Leigh syndrome. *Metab. Brain Dis.* 34, 367–372.
- Salvi, V., Sozio, F., Sozzani, S., and Prete, A. Del (2017). Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Front. Aging Neurosci.* 9, 148.
- Sandhir, R., Halder, A., and Sunkaria, A. (2017). Mitochondria as a centrally positioned hub in the innate immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1090–1097.
- Sanz, A., Hiona, A., Kujoth, G. C., Seo, A. Y., Hofer, T., Kouwenhoven, E., et al. (2007). Evaluation of gender differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.* 42, 173–182.
- Sanz, E., Bean, J. C., Carey, D. P., Quintana, A., and Mcknight, G. S. (2019). RiboTag: Ribosomal Tagging Strategy to Analyze Cell-Type-Specific mRNA Expression In Vivo. *Curr. Protoc. Neurosci.* 88, e77.
- Sanz, E., Quintana, A., Deem, J. D., Steiner, R. A., Palmiter, R. D., and Mcknight, G. S. (2015). Fertility-Regulating Kiss1 Neurons Arise from Hypothalamic Pomc -Expressing Progenitors. *J. Neurosci.* 35, 5549–5556.
- Sanz, E., Yang, L., Su, T., Morris, D. R., Mcknight, G. S., and Amieux, P. S. (2009). Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *PNAS* 106, 13939–13944.
- Schimel, A. M., Abraham, L., Cox, D., Sene, A., Kraus, C., Dace, D. S., et al. (2011). N -Acetylcysteine Amide (NACA) Prevents Retinal Degeneration by Up-

Referencias

- Regulating Reduced Glutathione Production and Reversing Lipid Peroxidation. *Am. J. Pathol.* 178, 2032–2043.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schoggins, J. W., and Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 1, 519–525.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
- Schubert, M. B., and Vilarinho, L. (2020). Molecular basis of Leigh syndrome: a current look. *Orphanet J. Rare Dis.* 15, 131.
- Scimemi, A. (2014). Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 161.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504.
- Shao, L., Niu, R., and Liu, Y. (2016). Neuropeptide signals cell non-autonomous mitochondrial unfolded protein response. *Cell Res.* 26, 1182–1196.
- Sheng, Q., Vickers, K., Zhao, S., Wang, J., Samuels, D. C., Koues, O., et al. (2017). Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. *Brief. Funct. Genomics* 16, 194–204.
- Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C., and Herzog, R. W. (2020). Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Mol. Ther.* 28, 709–722.
- Shokolenko, I. N., and Alexeyev, M. F. (2015). Mitochondrial DNA: A disposable genome? *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1805–1809.
- Shokolenko, I. N., and Alexeyev, M. F. (2018). Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Front Biosci* 22, 835–853.
- Shokolenko, I. N., Wilson, G. L., and Alexeyev, M. F. (2014). Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. *World J Exp Med* 4, 46–57.
- Sierra, A., Lavaque, E., Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Hales, D. B., and Garcia-segura, L. M. (2003). Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1458–1467.
- Signes, A., and Fernandez-vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I – V and supercomplexes. *Essays Biochem.* 62, 255–270.
- Silva-Pinheiro, P., Cerutti, R., Luna-Sanchez, M., Zeviani, M., and Viscomi, C. (2020). A Single Intravenous Injection of AAV-PHP.B-hNDUFS4 Ameliorates the Phenotype of Ndufs4^{-/-} Mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 1071–1078.
- Simon, M. C. (2016). The Hypoxia Response Pathways — Hats Off! *N. Engl. J. Med.* 375, 1687–1689.
- Singh, S. K., and Brashier, D. B. S. (2014). Perampanel: New drug for treatment of refractory partial onset seizures. *Muller J. Med. Sci. Res.* 5, 195–199.

- Singh, S., Swarnkar, S., Goswami, P., and Nath, C. (2011). Astrocytes and Microglia: Responses to Neuropathological Conditions. *Int. J. Neurosci.* 121, 589–597.
- Skladal, D., Halliday, J., and Thorburn, D. R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 126, 1905–1912.
- Smith, J. C., Abdala, A. P. L., Borgmann, A., Rybak, I. A., and Paton, J. F. R. (2013). Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci.* 36, 152–162.
- Sobell, M. G. (2014). *A Practical Guide to Ubuntu Linux*. Prentice Hall.
- Sobieski, X. C., Fitzpatrick, X. M. J., and Mennerick, X. S. J. (2017). Differential Presynaptic ATP Supply for Basal and High-Demand Transmission. *J. Neurosci.* 37, 1888–1899.
- Soccio, R. E., and Breslow, J. L. (2003). StAR-related Lipid Transfer (START) Proteins: Mediators of Intracellular Lipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 22183–22186.
- Sofou, K., Coo, I. F. M. De, Isohanni, P., Ostergaard, E., Naess, K., Meirleir, L. De, et al. (2014). A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 52.
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702.
- Solleiro-Villavicencio, H., and Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 114.
- Song, A. J., and Palmiter, R. D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre/lox System. *Trends Genet* 34, 333–340.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., and Seed, B. (2010). PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38, D792–D799.
- Spinazzi, M., Radaelli, E., Horré, K., Arranz, A. M., Gounko, N. V, and Agostinis, P. (2019). PARL deficiency in mouse causes Complex III defects, coenzyme Q depletion, and Leigh-like syndrome. *PNAS* 116, 277–286.
- Stauch, K. L., Purnell, P. R., and Fox, H. S. (2014). Quantitative proteomics of synaptic and nonsynaptic mitochondria: Insights for synaptic mitochondrial vulnerability. *J. Proteome Res.* 13, 2620–2636.
- Stefano, N. De, Matthews, P. M., Ford, B., Genge, A., Karpati, G., and Arnold, D. L. (1995). Short-term dichloroacetate treatment improves indices of cerebral metabolism in patients with mitochondrial disorders. *Neurology* 45, 1193–1198.
- Stefano, G. B., and Kream, R. M. (2016). Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. *Biomed. reports* 4, 259–262.
- Sterky, F. H., Hoffman, A. F., Milenkovic, D., Bao, B., Paganelli, A., Edgar, D., et al. (2012). Altered dopamine metabolism and increased vulnerability to MPTP

Referencias

- in mice with partial deficiency of mitochondrial complex I in dopamine neurons. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1078–1089.
- Stettner, G. M., Viscomi, C., Zeviani, M., Wilichowski, E., and Dutschmann, M. (2011). Hypoxic and hypercapnic challenges unveil respiratory vulnerability of Surf1 knockout mice, an animal model of Leigh syndrome. *Mitochondrion* 11, 413–420.
- Stewart, J. B., and Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 16, 530–542.
- Stifter, S. A., and Greter, M. (2020). STOP floxing around: Specificity and leakiness of inducible Cre / loxP systems. *Eur. J. Immunol* 50, 338–341.
- Stoica, L., Ahmed, S. S., Gao, G., and Esteves, M. S. (2013). Gene transfer to the CNS using recombinant adeno-associated virus. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 14, Unit14D.5.
- Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., et al. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* 538, 123–126.
- Sun, N., Youle, R. J., and Finkel, T. (2016). The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol. Cell* 61, 654–666.
- Suomalainen, A., and Battersby, B. J. (2017). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 77–92.
- Taivassalo, T., Shoubridge, E. A., Chen, J., Eng, M., Kennaway, N. G., Dimauro, S., et al. (2001). Aerobic Conditioning in Patients with Mitochondrial Myopathies: Physiological, Biochemical, and Genetic Effects. *Ann Neurol* 50, 133–141.
- Tamura, K., Fujimura, T., Iwasaki, K., Sakuma, S., Fujitsu, T., Nakamura, K., et al. (1994). Interaction of tacrolimus(FK506) and its metabolites with FKBP and calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 437–443.
- Tanaka, M., Nishigaki, Y., Fuku, N., Ibi, T., Sahashi, K., and Koga, Y. (2007). Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 7, 399–401.
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., et al. (2011). A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *JNeuron* 71, 995–1013.
- Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-lightowlers, Z. M. (2010). Human mitochondrial mRNAs—like members of all families, similar but different. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1081–1085.
- Tepe, B., Hill, M. C., Pekarek, B. T., Hunt, P. J., Martin, T. J., Martin, J. F., et al. (2018). Single-Cell RNA-Seq of Mouse Olfactory Bulb Reveals Cellular Heterogeneity and Activity- Dependent Molecular Census of Adult-Born Neurons. *CellReports* 25, 2689-2703.e3.
- Terzenidou, M. E., Segklia, A., Kano, T., Papastefanaki, F., Karakostas, A., Charalambous, M., et al. (2017). Novel insights into SLC25A46-related pathologies in a genetic mouse model. *PLOS Genet.* 13, e1006656.

- Toledo-Rodriguez, M., Blumenfeld, B., Wu, C., Luo, J., Attali, B., Goodman, P., et al. (2004). Correlation Maps Allow Neuronal Electrical Properties to be Predicted from Single-cell Gene Expression Profiles in Rat Neocortex. *Cereb. Cortex* 14, 1310–1327.
- Torres, S., García-Ruiz, C. M., and Fernandez-Checa, J. C. (2019). Mitochondrial Cholesterol in Alzheimer ' s Disease and Niemann – Pick Type C Disease. *Front. Neurol.* 10, 1168.
- Toth, A. M., Zhang, P., Das, S., George, C. X., and Samuel, C. E. (2006). Interferon Action and the Double-Stranded RNA-Dependent Enzymes ADAR1 Adenosine Deaminase and PKR Protein Kinase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 81, 369–434.
- Tucker, E. J., Hershman, S. G., Kohrer, C., Belcher-Timme, C. A., Patel, J., Goldberger, O. A., et al. (2011). Mutations in MTFMT Underlie a Human Disorder of Formylation Causing Impaired Mitochondrial Translation. *Cell Metab.* 14, 428–434.
- Vafai, S. B., and Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374–383.
- Valério-Gomes, B., Guimarães, D. M., Szczupak, D., and Lent, R. (2018). The Absolute Number of Oligodendrocytes in the Adult Mouse. *Front. Neuroanat.* 12, 90.
- Vardi-Oknin, D., and Arava, Y. (2019). Characterization of Factors Involved in Localized Translation Near Mitochondria by Ribosome-Proximity Labeling. *Front. cell Dev. Biol.* 7, 305.
- Venezia, N. D., Vincent, A., Marcel, V., Catez, F., and Diaz, J.-J. (2019). Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1226.
- Verkaart, S., Koopman, W. J. H., Vries, S. E. V. E., Nijtmans, L. G. J., Heuvel, L. W. P. J. Van Den, Smeitink, J. A. M., et al. (2007). Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 373–381.
- Vernau, K. M., Runstadler, J. A., Brown, E. A., Cameron, J. M., Huson, H. J., Higgins, R. J., et al. (2013). Genome-Wide Association Analysis Identifies a Mutation in the Thiamine Transporter 2 (SLC19A3) Gene Associated with Alaskan Husky Encephalopathy. *PLoS One* 8, e57195.
- Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., et al. (2011). In Vivo Correction of COX Deficiency by Activation of the AMPK/PGC-1 α Axis. *Cell Metab.* 14, 80–90.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., and Lowell, B. B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 71, 142–154.
- Vos, M., Lauwers, E., and Verstreken, P. (2010). Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 139.
- Vuong, J., and Devergnas, A. (2018). The Role of the Basal Ganglia in the Control of Seizure. *J Neural Transm* 125, 531–545.

Referencias

- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science (80-.)*. 283, 1482–1489.
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M. S., et al. (1988). Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Science (80-.)*. 242, 1427–1430.
- Wang, C., Richter-Dennerlein, R., Pacheu-Grau, D., Liu, F., Zhu, Y., Dennerlein, S., et al. (2020). MITRAC15/COA1 promotes mitochondrial translation in a ND2 ribosome–nascent chain complex. *EMBO Rep.* 21, e48833.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L., Bui, S., Nielson, A., et al. (2012). RNAscope. *J. of Molecular Diagnostics* 14, 22–29.
- Wang, X. (2012). Integrate the Mitochondrial Genome into the Nuclear Genome. *Bioenerg. Open Access* 1, e103.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol* 217, 1915–1928.
- Warner, B. Y. J. R., Knopf, P. M., and Rich, A. (1962). A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Biochemistry* 49, 122–129.
- Wei, W., Tuna, S., Keogh, M. J., Smith, K. R., Aitman, T. J., Beales, P. L., et al. (2019). Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity. *Science (80-.)*. 364, eaau6520.
- Wesolowska, M., Gorman, G. S., Alston, C. L., Pajak, A., Pyle, A., He, L., et al. (2015). Adult Onset Leigh Syndrome in the Intensive Care Setting: A Novel Presentation of a C12orf65 Related Mitochondrial Disease. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, 409–419.
- West, A. P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., Lang, S. M., et al. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553–557.
- West, A. P., and Shadel, G. S. (2017). Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol* 17, 363–375.
- West, A. P., Shadel, G. S., and Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 389–402.
- White, S. L., Collins, V. R., Wolfe, R., Cleary, M. A., Shanske, S., Dimauro, S., et al. (1999). Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis for the Mitochondrial DNA Mutations at Nucleotide 8993. *Am J Hum* 65, 474–482.
- Whittington, N., Cunningham, D., Le, K., Maria, D. De, and Silva, E. M. (2015). Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner. *Dev Biol* 397, 237–247.
- Wickham, H., Navarro, D., and Pedersen, T. L. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*. Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wiersma-Meems, R., Minnen, J. A. N. V. A. N., and Syed, N. I. (2005). Synapse Formation and Plasticity: The Roles of Local Protein Synthesis. *Neurosci.* 11, 228–237.
- Wiese, M., and Bannister, A. J. (2020). Two genomes, one cell: Mitochondrial-nuclear coordination via epigenetic pathways. *Mol. Metab.* 38, 100942.

- Wijburg, F. A., Barth, P. G., Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Blij, J. F. van der, Ruitenbeek, W., et al. (1992). Leigh syndrome associated with a deficiency of the pyruvate dehydrogenase complex: results of treatment with a ketogenic diet. *Neuropediatrics* 23, 147–152.
- Wojtala, A., Karkucinska-Wieckowska, A., Sardao, V. A., Szczepanowska, J., Kowalski, P., Pronicki, M., et al. (2017). Modulation of mitochondrial dysfunction-related oxidative stress in fibroblasts of patients with Leigh syndrome by inhibition of prooxidative p66Shc pathway. *Mitochondrion* 37, 62–79.
- Woods, D. C. (2017). Mitochondrial Heterogeneity: Evaluating Mitochondrial Subpopulation Dynamics in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017, 7068567.
- Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G. K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science (80-.)*. 466, eaan5835.
- Xu, X., Duan, S., Yi, F., Ocampo, A., Liu, G. H., and Belmonte, J. C. I. (2013). Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 18, 325–332.
- Yamada, Y., and Nakano, K. (1999). Increased expression of mitochondrial respiratory enzymes in the brain of activated epilepsy-prone El mice. *Mol. Brain Res.* 73, 186–188.
- Yang, H., Brosel, S., Acin-perez, R., Slavkovich, V., Nishino, I., Khan, R., et al. (2010). Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in Sco2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 170–180.
- Yates, B. J., and Bronstein, A. M. (2005). The effects of vestibular system lesions on autonomic regulation: Observations, mechanisms, and clinical implications. *J. Vestib. Res.* 15, 119–129.
- Yilmaz, C., Karali, K., Fodelianaki, G., Gravanis, A., Chavakis, T., Charalampopoulos, I., et al. (2019). Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Front. Neuroendocrinol.* 55, 100788.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., and Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 11, R14.
- Yu, A. K., Song, L., Murray, K. D., List, D. Van Der, Sun, C., Shen, Y., et al. (2015). Mitochondrial complex I deficiency leads to inflammation and retinal ganglion cell death in the Ndufs4 mouse. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2848–2860.
- Zhang, B., Kirov, S., and Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 33, W741–W748.
- Zhang, J., Liu, H., Luo, S., Lu, Z., Chávez-badiola, A., Liu, Z., et al. (2017). Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod. Biomed. Online* 34, 361–368.
- Zhang, L., Zhang, Z., Khan, A., Zheng, H., Yuan, C., and Jiang, H. (2020). Advances in drug therapy for mitochondrial diseases. *Ann Transl Med* 8, 17.
- Zhang, Z., and Falk, M. (2014). Integrated transcriptome analysis across mitochondrial disease etiologies and tissues improves understanding of common cellular adaptations to respiratory chain dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol* 50, 106–111.
- Zhang, Z., Tsukikawa, M., Peng, M., Polyak, E., Nakamaru-Ogiso, E., Ostrovsky, J.,

Referencias

- et al. (2013). Primary Respiratory Chain Disease Causes Tissue-Specific Dysregulation of the Global Transcriptome and Nutrient- Sensing Signaling Network. *PLoS One* 8, e69282.
- Zhao, J., Qin, B., Nikolay, R., Spahn, C. M. T., and Zhang, G. (2019a). Translatomics: The Global View of Translation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 212.
- Zhao, R. U. Z., Jiang, S., Zhang, L. I. N., and Yu, Z. H. I. B. I. N. (2019b). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int. J. Mol. Med.* 44, 3–15.
- Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Kim, Y., Fan, W., Bardy, C., et al. (2016). Alleviation of neuronal energy deficiency by mTOR inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *Elife* 5, e13378.
- Zhou, P., Zhang, Y., Ma, Q., Gu, F., Day, D. S., He, A., et al. (2013). Interrogating translational efficiency and lineage-specific transcriptomes using ribosome affinity purification. *PNAS* 110, 15395–15400.
- Zhu, J., Vinothkumar, K. R., and Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature* 536, 354–358.
- Zimin, P. I., Woods, C. B., Kayser, E. B., Ramirez, J. M., Morgan, P. G., and Sedensky, M. M. (2018). Isoflurane disrupts excitatory neurotransmitter dynamics via inhibition of mitochondrial complex I. *Br. J. Anaesth.* 120, 1019–1032.
- Zimin, P. I., Woods, C. B., Quintana, A., Ramirez, J., Morgan, P. G., and Sedensky, M. M. (2016). Glutamatergic Neurotransmission Links Sensitivity to Volatile Anesthetics with Mitochondrial Function. *Curr. Biol.* 26, 2194–2201.
- Zurita Rendón, O., and Shoubridge, E. A. (2012). Early complex I assembly defects result in rapid turnover of the ND1 subunit. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3815–3824.

ANEXO 1. Términos significativamente enriquecidos para el análisis de ontología génica (GO) según el listado de transcritos diferencialmente asociados al ribosoma (DAR) en las neuronas glutamatérgicas vestibulares o las GABAérgicas del bulbo olfatorio con deficiencia para el complejo I.

Neuronas vestibulares VGLUT2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50)	
Término GO	Transcritos DAR
Regeneración de tejido	<i>Lgr6, Mdk, Wnt7a, Yap1</i>
Regulación negativa de la gliogénesis	<i>Id2, Sox21, Tmem98</i>
Respuesta a pH	<i>Car2, Pkd2l1, Ttpa</i>
Unión a alcohol	<i>Anxa6, Itpr3, Osbpl5, Star</i>
Respuesta a la progesterona	<i>Abhd2, Sox21, Yap1</i>

Neuronas vestibulares VGLUT2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P100)	
Término GO	Transcritos DAR
Gliogénesis	<i>Arhgef10, Bok, Dag1, Egfr, Eif2b3, Erbb3, Gap43, Gpr17, Itgb4, Lama2, Lamb2, Lamc1, Lef1, Lrp1, Mdk, Med12, Mmp14, Ndn, Notch1, Penk, Ppp3r1, Smo</i>
Regeneración proyección neuronal	<i>Bex1, Bex2, Dag1, Gap43, Lamb2, Lamc1, Ptpfrf</i>
Morfogénesis celular	<i>Atp7a, Boc, Ccdc141, Chrna7, Cxcl12, Cyfip1, Dag1, Ddr1, Egfr, Gap43, Hprrt, Kcne1l, Kdr, Lama2, Lamb2, Lamc1, Llgl1, Lrp1, Lrp4, Mdk, Mfn1, Myh14, Ndn, Nfasc, Notch1, Plxnb3, Ptch1, Rhobtb3, Smo, Vldlr, Wasf2, Wnt7a, Wnt7b</i>
Axón principal	<i>Chrna7, Crhbp, Dag1, Kcna1, Kcnc3, Kif13b, Myo1d, Nfasc, Sptbn1</i>
Organización sináptica	<i>Baiap2, Chrna7, Col4a1, Cyfip1, Gabrb2, Lamb2, Lamc1, Lipa, Lrp4, Myo6, Nfasc, Pcdhgc3, Pgrmc1, Ppfibp1, Ptpfrf, Snca, Wasf2, Wnt7a, Wnt7b</i>
Unión neuregulina	<i>Erbb3, Itga6, Itgb4</i>
Regulación adhesión célula-sustrato	<i>Ccdc80, Cd36, Dag1, Ddr1, Dmp1, Dock1, Dock5, Emp2, Itga6, Kcne1l, Kdr, Lims2, Lrp1, Mdk, Mmp12, Mmp14, Nid1, Notch1, Prex1, S100a10</i>

Neuronas vestibulares VGLUT2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P100) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Citoesqueleto de actina	<i>Aif1, Amot, Arhgap21, Arhgef2, Arpc5l, Bag3, Baiap2, Cdc42ep4, Clic5, Coro1a, Fermt2, Itsn1, Llg1, Lrp4, Myh14, Myo1d, Myo6, Nebl, Notch3, Pdlim2, Pdxp, Pgm5, Pls1, Sh3pxd2b, Slc2a1, Snca, Sorbs1, Sptbn1, Stx1a, Vcam1, Wipf1</i>
Adhesión celular	<i>Boc, Ccdc141, Cd93, Cxcl12, Egfr, Esam, Itga6, Jam2, Lef1, Lims2, Lipa, Nfasc, Pcdhac2, Pcdhga11, Pcdhgc3, Pdgfra, Plxnb3, Ptpfrf, Slc39a8, Stxbp3, Tjp2, Vcam1, Wnt7b, Zfp3611</i>
Unión a membrana	<i>Emp2, Lipa, Lrp4, Sptbn1, Tlcd1</i>
Membrana plasmática basolateral	<i>Abcc4, Atp7a, Dag1, Ddr1, Egfr, Enpp1, Erbb3, Heph, Ide, Itga6, Itgb4, Llg1, Lrp1, Myo1d, Slc22a8, Slc2a1, Slc39a8, Slc41a1, Stxbp3</i>
Proyección neuronal terminal	<i>Adcyap1, Baiap2, Crhbp, Cyfip1, Elk1, Itsn1, Kcna1, Kcnc3, Npy, Nts, Oprk1, Pdyn, Penk, Rpl26, Snca</i>
Actividad hormonal neuropeptídica	<i>Adcyap1, Cartpt, Grp, Npy, Nts, Pdyn</i>
Segregación positiva de catecolaminas	<i>Cartpt, Cxcl12, Oprk1, Pcp4, Stx1a</i>
Regulación transcripcional del promotor para la ARN polimerasa II en respuesta al estrés oxidativo	<i>Atf3, Atf4, Bag3, Cd36, Epas1, Nfe2l2, Notch1</i>
Regulación del <i>splicing</i>	<i>Aff2, Celf4, Celf5, Khdrbs1, Khdrbs2, Magoh, Npm1, Pqbp1, RbmX, Slc38a2, Srsf3, Srsf6, Tra2b</i>
Ensamblaje del complejo ribonucleoproteína	<i>Ago3, Celf4, Celf5, Mcts1, RbmX, Rpl11, Rpl12, Rpl3, Rps28, Snrpd1, Snrpd3, Snrpe, Srsf6</i>
Ribosoma citosólico	<i>Fau, Heg1, Mcts1, Npm1, Rpl11, Rpl12, Rpl17, Rpl19, Rpl26, Rpl28, Rpl3, Rpl30, Rpl36a, Rpl37, Rpl37a, Rpl41, Rps12, Rps20, Rps24, Rps28, Rps3a1, Rps7, Rps8, Snca</i>
Actividad elongasa ácidos grasos	<i>Elovl2, Elovl5, Elovl6, Elovl7</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50)	
Término GO	Transcritos DAR
Proceso biosintético del compuesto nitrógeno	<i>Acadm, Adcy1, Adcy7, Aimp1, Ak2, Aldoa, Aprt, Arrb1, Atp5d, Atp5g1, Atp5g3, Atp5j, Atp5o, Atp5pb, Atpif1, Cd3eap, Chchd1, Cox5b, Dtd1, Eef1a2, Eef1b2, Eif1, Eif1ad, Eif1b, Eif2ak2, Eif2b4, Eif3g, Eif3k, Elob, Elof1, Fau, Gpam, Hint1, Lmo4, Moxd1, Mpc2, Mrpl12, Mrpl13, Mrpl20, Mrpl24, Mrpl33, Mrpl36, Mrpl41, Mrpl43, Mrpl51, Mrpl52, Mrpl55, Mrps12, Mrps18c, Mrps21, Mrps24, Mrps34, Ndufa7, Nhp2, Nt5c, Nt5e, Oasl2, Oaz1, Pam16, Pmm1, Polr2e, Polr2f, Polr2i, Pparg, Ppargc1a, Rpl10a, Rpl11, Rpl12, Rpl13, Rpl13a, Rpl18a, Rpl19, Rpl21, Rpl27, Rpl28, Rpl30, Rpl34, Rpl35, Rpl35a, Rpl36, Rpl37, Rpl6, Rpl8, Rpl9, Rps15, Rps16, Rps17, Rps23, Rps26, Rps27, Rps29, Rps4x, Rps8, Rps9, Samd8, Scai, Snx3, Stat1, Supt4a, Tgfb1, Tma7, Uba52, Ubtf, Uqcc3, Urod, Uxs1, Znr1</i>
Ribosoma	<i>Aip, Aurkaip1, Btf3, Chchd1, Fau, Gadd45gip1, Imp3, Mrpl12, Mrpl13, Mrpl20, Mrpl24, Mrpl28, Mrpl33, Mrpl36, Mrpl41, Mrpl43, Mrpl46, Mrpl51, Mrpl52, Mrpl55, Mrps12, Mrps18c, Mrps21, Mrps24, Mrps26, Mrps34, Mt3, Ndufa7, Ndufab1, Ppargc1a, Rpl10a, Rpl11, Rpl12, Rpl13, Rpl13a, Rpl18a, Rpl19, Rpl21, Rpl27, Rpl28, Rpl30, Rpl34, Rpl35, Rpl35a, Rpl36, Rpl37, Rpl6, Rpl7a, Rpl8, Rpl9, Rps15, Rps16, Rps17, Rps23, Rps25, Rps26, Rps27, Rps29, Rps4x, Rps8, Rps9, Snca, Syp, Uba52</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Ribosoma citosólico	<i>Fau, Ppargc1a, Rpl10a, Rpl11, Rpl12, Rpl13, Rpl13a, Rpl18a, Rpl19, Rpl21, Rpl27, Rpl28, Rpl30, Rpl34, Rpl35, Rpl35a, Rpl36, Rpl37, Rpl6, Rpl7a, Rpl8, Rpl9, Rps15, Rps16, Rps17, Rps23, Rps25, Rps26, Rps27, Rps29, Rps4x, Rps8, Rps9, Uba52</i>
Unión ARNr	<i>Imp3, Mrpl20, Mrps18c, Nop53, Rpl11, Rpl12, Rpl19, Rpl37, Rpl6, Rpl8, Rpl9, Rps4x, Rps9, Sbds</i>
Espliceosoma de tipo U2	<i>Ccdc12, Cwc15, Lsm4, Phf5a, Sart1, Sf3b5, Snrnp70, Snrpa1, Snrpb, Snrpd2, Snrpe, Snrpf, Snrpg, Snrpn, Syf2, U2af2, Zmat2</i>
Proteosoma	<i>Psm2, Psm7, Psmb1, Psmb3, Psmb4, Psmb5, Psmb6, Psmb7, Psmc3, Psmc4, Psmc5, Psm10, Psm4, Psm8, Psm9, Sem1</i>
Complejo proteico mitocondrial	<i>Areg, Atp5d, Atp5g1, Atp5g3, Atp5j, Atp5mpl, Atp5o, Atp5pb, Chchd10, Coa3, Cox4i1, Cox5a, Cox6a1, Mcub, Micos13, Mrpl12, Mrpl13, Mrpl20, Mrpl24, Mrpl28, Mrpl33, Mrpl36, Mrpl41, Mrpl43, Mrpl46, Mrpl51, Mrpl52, Mrpl55, Mrps12, Mrps18c, Mrps21, Mrps24, Mrps26, Mrps34, Ndufa1, Ndufa11, Ndufa13, Ndufa3, Ndufa4, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa7, Ndufa8, Ndufab1, Ndufb1-ps, Ndufb10, Ndufb11, Ndufb3, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs3, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Ndufv2, Pam16, Romo1, Sdhh, Smdt1, Timm13, Tomm7, Uqcc3, Uqcr10, Uqcrb, Uqcrfs1, Uqcrq</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Complejo proteico membrana interna mitocondrial	<i>Areg, Atp5d, Atp5g1, Atp5g3, Atp5j, Atp5mpl, Atp5o, Atp5pb, Chchd10, Coa3, Cox4i1, Cox5a, Cox6a1, Mcub, Micos13, Ndufa1, Ndufa11, Ndufa13, Ndufa3, Ndufa4, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa7, Ndufa8, Ndufab1, Ndufb1-ps, Ndufb10, Ndufb11, Ndufb3, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs3, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Ndufv2, Pam16, Romo1, Sdhh, Smdt1, Uqcc3, Uqcr10, Uqcrb, Uqcrfs1, Uqcrq</i>
Organización mitocondrial	<i>Aip, Alkbh7, Atp5d, Atpif1, Aurkaip1, Calm2, Cav2, Chchd10, Coa3, Coq7, Cox14, Cox16, Cox20, Cox7a2, Dctn6, Dnlz, Fez1, Fis1, Fmc1, Gabarapl2, Hap1, Higd2a, Hk2, Map1lc3a, Micos13, Mtfp1, Mx1, Mx2, Ndufa1, Ndufa11, Ndufa13, Ndufa3, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa8, Ndufab1, Ndufaf3, Ndufaf5, Ndufb1-ps, Ndufb10, Ndufb11, Ndufb3, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Pam16, Park7, Pet100, Pink1, Ppargc1a, Rab3a, Romo1, Septin4, Slirp, Snca, Surf1, Syp, Timm13, Tomm7, Uqcc2, Uqcc3, Uqcr10, Uqcrb, Uqcrq</i>
Supercomplejo mitocondrial	<i>Coa3, Cox4i1, Cox5a, Cox6a1, Cox7a2, Cox7b, Ndufa1, Ndufa11, Ndufa13, Ndufa3, Ndufa4, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa7, Ndufa8, Ndufab1, Ndufb1-ps, Ndufb10, Ndufb11, Ndufb3, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs3, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Ndufv2, Sdhh, Uqcc3, Uqcr10, Uqcrb, Uqcrfs1, Uqcrq</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Cadena de transporte de electrones	<i>Coq7, Cox4i1, Cox5a, Cox5b, Cox6a1, Cox6c, Cox7a2, Cox7b, Glrx5, Ndufa4, Ndufa5, Ndufa7, Ndufa8, Ndufb3, Ndufb6, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc2, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs8, Ndufv2, Pink1, Ppargc1a, Sdhb, Snca, Surf1, Syp, Uqcc3, Uqcr10, Uqcr11, Uqcrb, Uqcrfs1, Uqcrq, Xdh</i>
Cadena respiratoria mitocondrial	<i>Coa3, Cox14, Cox16, Cox20, Ndufa1, Ndufa11, Ndufa13, Ndufa3, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa8, Ndufab1, Ndufaf3, Ndufaf5, Ndufb1-ps, Ndufb10, Ndufb11, Ndufb3, Ndufb5, Ndufb6, Ndufb7, Ndufb8, Ndufb9, Ndufc1, Ndufc2, Ndufs4, Ndufs6, Ndufs7, Ndufs8, Pet100, Surf1, Uqcc2, Uqcc3, Uqcr10, Uqcrb, Uqcrq</i>
Transferencia electrones	<i>Cox4i1, Cox5a, Cox5b, Cox6a1, Cox6c, Cox7a2, Cox7b, Glrx5, Ndufa4, Sdhb, Surf1, Uqcr10, Uqcr11, Uqcrb, Uqcrfs1, Uqcrq, Xdh</i>
Espacio intermembrana mitocondrial	<i>Ak2, Bloc1s1, Chchd10, Chchd7, Cox6b1, Ndufa8, Ndufb7, Park7, Pink1, Snca, Sod1, Syp, Timm13, Timm8b, Uqcc2</i>
Respuesta defensa a virus	<i>Aimp1, Bst2, Ddx58, Ddx60, Dtx3l, Eif2ak2, Exosc4, Gpam, Ifi27, Ifih1, Ifit1, Ifit2, Ifit3, Ifit3b, Ifitm3, Irf7, Irgm2, Isg15, Lgals9, Mx1, Mx2, Nlrc5, Oas1b, Oasl2, Pag1, Parp9, Penk, Pqbp1, Rsad2, Rtp4, Stat1, Stat2, Trim12c, Trim25, Trim34a, Xpr1, Zc3hav1</i>
Complejo de carga peptídica CMH-I	<i>H2-D1, H2-K1, H2-Q4, H2-Q6, H2-Q7, H2-T23, Tap1, Tapbp</i>
Respuesta a interferón-alfa	<i>Axl, Bst2, Eif2ak2, Ifit1, Ifit2, Ifit3, Ifit3b, Ifitm3</i>
Vía señalización mediada por interferón-gamma	<i>Cdc37, Irgm1, Irgm2, Nlrc5, Parp14, Parp9, Pparg</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Sinapsis neurona-neurona	<i>Ablim1, Adcy1, Add3, Arrb1, Camk1, Chmp4b, Dcc, Dst, Fez1, Gng3, Grm7, Igsf9b, Itpr1, Lin7b, Lrp8, Lzts1, Macf1, Mib1, Mt3, Mx1, Mx2, Neto2, Nlgn1, Pag1, Palm, Penk, Ptk2b, Ptprf, Ptprr, Rpl10a, Rpl12, Rpl18a, Rpl30, Rpl6, Rpl8, Rps25, Shisa9, Slc8a2, Sorcs2, Sorcs3, Sptbn1, Syn3, Synpo, Syp, Syt5</i>
Axón	<i>Acadm, Ache, Alcam, Arpc3, Atp5g1, Bloc1s1, C4b, Calm2, Cplx1, Cpne6, Crh, Crhbp, Crmp1, Cyth2, Dcc, Dcx, Dpysl3, Dscaml1, Dst, Dtna, Dync1i1, Dynll1, Eno1b, Fez1, Fkbp1a, Gabrd, Gad2, Grk3, Grm7, Hap1, Hcn1, Kcnq3, Lrp8, Mt3, Mx1, Mx2, Ngdn, Npy, Ntng2, Olfm1, Palm, Park7, Pcdhgb1, Pcp4, Penk, Pink1, Ptk2b, Ptprf, Ptprr, Pvalb, Rab3a, Reln, Rgs10, Robo2, Rogdi, Septin5, Slc1a2, Slc8a2, Snca, Sod1, Sptbn1, Ssh1, Stat1, Stmn3, Syp, Syt5, Tac1, Tac2, Tbc1d24, Tgfb1, Tgfb2, Tpgs1, Tpm3, Tprgl, Txn1, Uchl1, Utrn</i>
Regulación positiva transmisión sináptica	<i>Adcy1, Adra1a, Baiap3, Cacnb3, Crh, Crhr1, Dbi, Flot1, Gfap, Hap1, Igsf9b, Nlgn1, Nlgn2, Pink1, Ptk2b, Reln, Slc8a2, Snca, Ssh1, Stx4a, Syp, Syt5, Tac1, Tac2, Tbc1d24</i>
Presinapsis	<i>Ache, Adra1a, Baiap3, Calm2, Clta, Cplx1, Crhbp, Dbi, Doc2g, Fkbp1a, Flot1, Gad2, Gnb5, Grm7, Hap1, Hcn1, Hip1, Itpr1, Kcnk9, Lin7b, Mt3, Mx1, Mx2, Nlgn1, Nlgn2, Npy, Ntng1, Ntng2, Park7, Penk, Pfn1, Ppfibp1, Ppp1cc, Psenen, Rab3a, Rab40b, Rabac1, Rgs10, Rogdi, Septin3, Septin4, Septin5, Slc1a2, Slc8a2, Snca, Stx4a, Syn3, Syp, Syt5, Tbc1d24, Tprgl, Vti1b</i>

Neuronas del bulbo olfatorio GAD2-positivas con deficiencia para <i>Ndufs4</i> (P50) (Continuación)	
Término GO	Transcritos DAR
Regulación muerte neuronal	<i>Arrb1, Atp5g1, Axl, Cd34, Chmp4b, Crhr1, Dcc, Egl2, Fis1, Gabrb2, Gpnmb, Grm7, Hras, Itpr1, Lancl1, Map3k5, Mt1, Mt3, Ndnf, Nenf, Park7, Pcp4, Pin1, Pink1, Ppargc1a, Prdx2, Ptk2b, Ptpnf, Snca, Sod1, Ssh1, Syp, Tac1, Tac2, Tbc1d24, Tgfb2, Tyro3, Uba52, Vegfa</i>
Regulación corticosterona	<i>Crh, Crhr1, Tac1, Tac2</i>