

## Generació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *Drosophila melanogaster*

Tanit Guitart Rodés

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

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

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



FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 2004-2006  
TESI REALITZADA AL LABORATORI DE TRADUCCIÓ GENÈTICA  
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA

GENERACIÓ D'UN MODEL DE MALALTIA MITOCONDRIAL HUMANA EN  
*DROSOPHILA MELANOGASTER*

Memòria presentada per Tanit Guitart Rodés  
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Director:

Tutor:

Doctoranda:

Lluís Ribas de Pouplana

Antonio Zorzano Olarte

Tanit Guitart Rodés

	INDEX
	ABREVIATURES
	<b>1 INTRODUCCIÓ</b>
	2 OBJECTIUS
<b>3</b>	<b>MATERIAL I MÈTODES</b>
	4 RESULTATS
	5 DISCUSSIÓ
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS</b>
	BIBLIOGRAFIA
	APÈNDIX: PUBLICACIÓ



## 1 INTRODUCCIÓ

El laboratori de traducció genètica, on s'ha dut a terme el projecte d'investigació desenvolupat en el present escrit, centra la seva recerca en l'aparell de síntesi de proteïnes, en concret, en l'acurat procés d'aminoacilació dels ARNt (àcids ribonucleics de transferència) per part d'una família d'enzims essencials i universals anomenats aaRS (aminoacil-ARNt sintetases). Al llarg de la història, la recerca en aquest sistema s'ha centrat, principalment, en la caracterització en profunditat dels mecanismes de reconeixement dels substrats, de les propietats estructurals i de les activitats enzimàtiques d'aminoacilació i edició de les aaRS (Giegé, 2006) i, més recentment, s'ha enfocat en l'estudi de les aaRS des d'un punt de vista biomèdic, tot vinculant-les amb noves funcions no convencionals i amb malalties humanes (Park et al., 2008). El nostre grup de recerca ha desenvolupat diferents camps d'estudi de les aaRS pel que fa a la seva evolució modular, a les seves funcions no convencionals, als mecanismes de reconeixement dels ARNt, als sistemes de fidelitat del codi genètic i, per últim, a les relacions entre aquestes proteïnes i determinades malalties humanes. En humans, així com en la resta d'organismes eucariotes, la síntesi proteica té lloc en diferents compartiments cel·lulars, entre ells, el mitocondri, on se sintetitza un grup reduït de proteïnes que formen part de la cadena respiratòria i l'OXPHOS (*oxidative phosphorylation*; fosforilació oxidativa). Un funcionament incorrecte de la traducció genètica en aquest orgànu degut a mutacions en els elements que hi participen dona lloc a greus afeccions. A part d'un elevat nombre de mutacions descrites en ARN mitocondrials (Ruiz-Pesini et al., 2007), en els darrers anys, també s'han relacionat mutacions en aaRS mitocondrials codificades al genoma nuclear amb algunes malalties (Edvardson et al., 2007; Scheper et al., 2007a; Riley et al., 2010). El gran desconeixement d'aquestes afeccions fa necessària la creació d'animals model que en facilitin la caracterització i la recerca d'estratègies terapèutiques. L'objectiu de la present tesi doctoral és la generació d'un model animal de malaltia de traducció genètica mitocondrial humana provocada per deficiències en l'aminoacilació mitocondrial per part de la SRS (seril-ARNt sintetasa), fent ús de l'organisme *Drosophila melanogaster*. En el procés de desenvolupament d'aquest model de patologia mitocondrial s'ha descobert la presència d'una proteïna homòloga a la SRS mitocondrial en *D. melanogaster*, la caracterització de la qual ha esdevingut objecte addicional d'estudi en aquest treball.

El capítol d'introducció s'inicia amb una descripció general de la traducció genètica eucariota, posant èmfasi en les característiques d'aquest procés en els mitocondris, i relacionant la traducció amb les malalties humanes. Seguidament, s'introdueixen els enzims que són objecte d'estudi en aquest treball, les aaRS i, més concretament, s'explicaran les particularitats de la SRS. A continuació, com que l'estudi es focalitza en la traducció genètica mitocondrial, se centra l'explicació en diferents aspectes del mitocondri i la seva estreta relació amb algunes malalties humanes. Per últim, es parla dels models que són emprats per reproduir malalties

associades amb la síntesi proteica i de l'organisme escollit en aquest projecte per tal de construir un model de malaltia mitocondrial humana, *Drosophila melanogaster*.

### 1.1 LA TRADUCCIÓ GENÈTICA EUKARIOTA

Aquest treball té com a objectiu l'estudi i la manipulació del sistema d'aminoacilació amb el propòsit de generar un model de malaltia mitocondrial en *D. melanogaster*. Per aquesta raó, en primer lloc, és necessari presentar la traducció genètica com a context en el qual es troba la reacció d'aminoacilació, en segon lloc, cal aprofundir en els mecanismes de traducció específics del citoplasma i del mitocondri eucariotes i, en tercer lloc, descriure la relació existent entre els elements de traducció genètica i les malalties humanes.

#### 1.1.1 Visió general de la traducció genètica

La traducció genètica és un procés universal que té lloc en tots els organismes eucariotes i procariotes. La traducció genètica dels ARN (àcids ribonucleics) a proteïnes, juntament amb la replicació de l'ARN i l'ADN (àcid desoxiribonucleic) i la transcripció d'ADN a ARN, són processos essencials per a tot ésser viu i constitueixen el dogma central de la biologia molecular, que es basa en la transferència detallada d'informació seqüencial, residu a residu, entre les biomolècules d'ADN, ARN i proteïnes (Crick, 1958; Crick, 1970).

La traducció genètica consisteix en la descodificació consecutiva de la informació continguda en molècules d'ARNm (ARN missatger) en forma de cadena polipeptídica, tot seguint escrupolosament les normes establertes pel codi genètic. El codi genètic estàndard, amb algunes excepcions, és utilitzat per tots els éssers vius, i consisteix en un conjunt de regles que relacionen específicament els diferents triplets de nucleòtids d'ARNm, anomenats codons, amb els vint aminoàcids naturals existents. El codi genètic es considera degenerat, ja que un mateix aminoàcid pot ser especificat per diferents codons d'ARNm de forma redundat. De tota manera, se segueix la tendència que codons similars codifiquin aminoàcids relacionats estructuralment o metabòlicament (Nirenberg et al., 1965; Woese, 1965b). Aquest fet suggereix que han tingut lloc un seguit de passos evolutius per tal de reduir al màxim la taxa d'error durant la traducció, de tal manera que una mutació o un error de lectura en un dels nucleòtids del codó no comporti un canvi substancial de les propietats bioquímiques de l'aminoàcid (Woese, 1965a; Alff-Steinberger, 1969). La degeneració del codi genètic està típicament relacionada amb la tercera posició del codó, de manera que codons que comparteixen els dos primers nucleòtids del triplet permeten mantenir l'especificitat per a un mateix aminoàcid o per a aminoàcids de característiques similars. Determinats canvis en la primera o la segona posició del triplet també permeten conservar aminoàcids amb propietats semblants (Woese, 1965a; Volkenstein, 1966).

En tots els organismes, la traducció genètica requereix la participació de diferents proteïnes i molècules d'ARN que funcionin de forma coordinada. Els codons d'ARNm no reconeixen directament els aminoàcids que especifiquen, sinó que ho fan a través d'unes molècules adaptadores que relacionen minuciosament cada triplet d'ARNm amb l'aminoàcid corresponent. Els ARNt són aquestes molècules adaptadores. A la cèl·lula existeix almenys un ARNt per a cada aminoàcid, però, en molts casos, diversos isoacceptors tenen l'habilitat de reconèixer els diferents codons que assignen un mateix aminoàcid, de manera única o redundant. Els ARNt són aminoacilats específicament amb l'aminoàcid assignat mitjançant les aminoacil-ARNt sintetases. Aquesta família d'enzims consta d'almenys vint proteïnes, una per a cada aminoàcid del codi genètic estàndard (es descriuran a la secció 1.2).

La traducció genètica, tant procariota com eucariota, consisteix en dos estadis principals: l'aminoacilació dels ARNt i la traducció ribosòmica. El primer estadi (tractat a l'apartat 1.2.1) es basa en el reconeixement específic i l'activació de l'aminoàcid per part de l'aaRS, i en la incorporació d'aquest a l'extrem 3' de l'ARNt adient. Un cop l'ARNt és aminoacilat, és dirigit mitjançant els factors d'iniciació o elongació cap al ribosoma, un complex format per proteïnes associades a molècules d'ARNr (ARN ribosòmic), on té lloc la mecànica d'interacció entre els ARNt aminoacilats i els triplets d'ARNm, i constitueix la peça central de la síntesi de proteïnes.

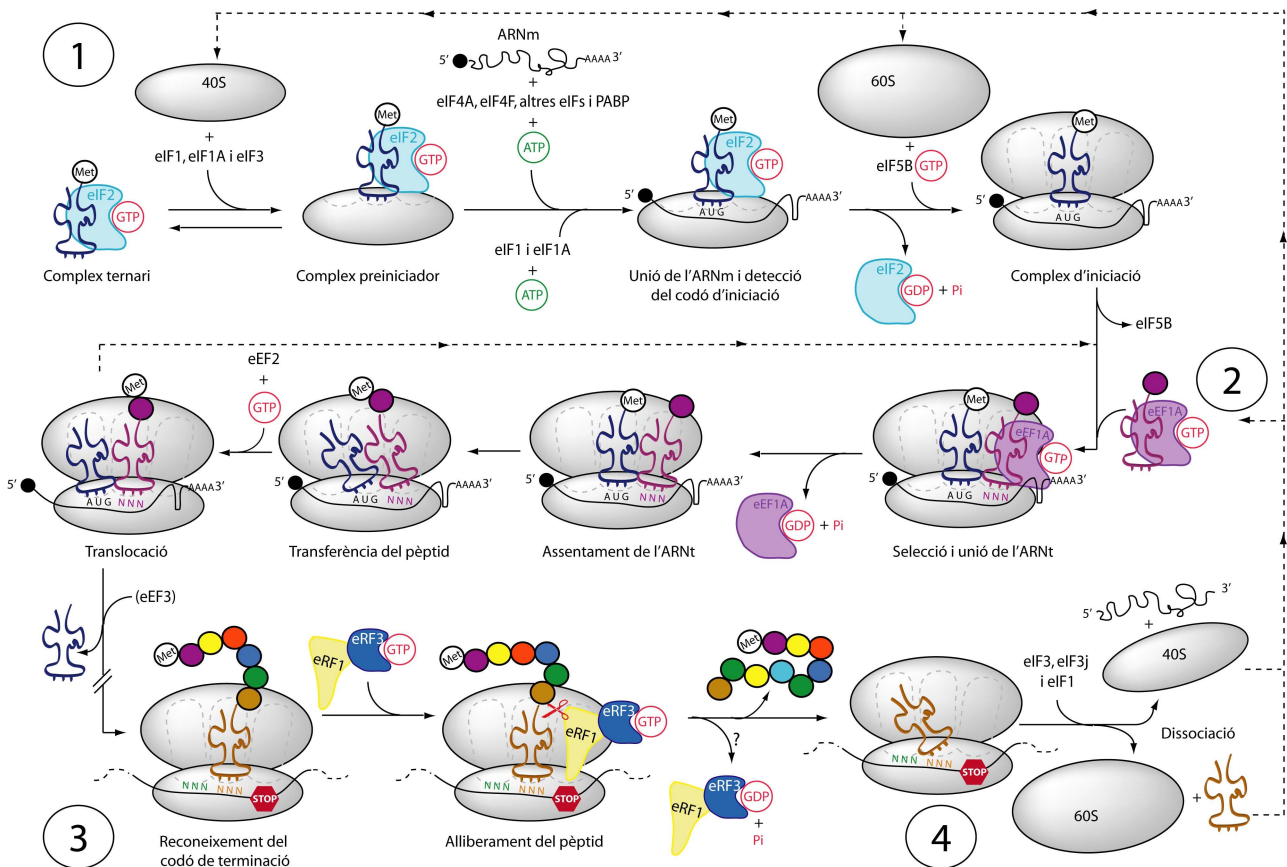
### 1.1.2 La traducció citoplasmàtica eucariota

La traducció ribosòmica citoplasmàtica eucariota consta de quatre fases, que han estat descrites i revisades en profunditat (Pestova et al., 2001; Kapp i Lorsch, 2004; Dale i Uhlenbeck, 2005; Hernández et al., 2010): iniciació, elongació, terminació i reciclatge (vegeu la figura 1.1).

La fase d'iniciació (figura 1.1 (1)) comença amb el reconeixement del Met-ARNt<sub>i</sub> (metionil-ARNt d'iniciació) per part de l'eIF (*eukaryotic initiation factor*; factor d'iniciació eucariòtic) 2 i, juntament amb GTP (*guanosine triphosphate*; guanosina trifosfat), formen el complex ternari eIF2·GTP·Met-ARNt<sub>i</sub>. La subunitat petita del ribosoma (40S), estabilitzada pels factors eIF1, eIF1A i eIF3, s'uneix al complex ternari, i forma el complex preiniciador (43S). En paral·lel, el factor eIF4F reconeix com a punt d'inici l'estructura caputxa (m<sup>7</sup>GpppN) present a l'extrem 5' dels ARNm transcrits al nucli eucariota (Shatkin, 1976). Un cop l'eIF4F ha reconegut la caputxa de l'ARNm, interacciona amb altres factors eIF i amb la PABP (*poly(A) binding protein*; proteïna d'unió a poli(A)), que es troba unida a l'extrem 3' poliadenilat (poli(A)) de l'ARNm. El factor amb activitat helicasa eIF4A desenrotlla estructures de la regió 5'UTR (*untranslated region*; regió no traduïda) de l'ARNm, i el complex que conté l'ARNm, per hidròlisi d'ATP (*adenosine triphosphate*; adenosina trifosfat), s'acobla al complex preiniciador. El ribosoma, amb la participació dels factors eIF1 i eIF1A, explora la seqüència d'ARNm en sentit 5'→3' fins a detectar el codó d'inici AUG dins el context de la seqüència Kozak (Kozak, 1986), tot consumint

ATP. A continuació, el codó d'inici AUG s'emparella amb l'anticodó del Met-ARNT<sub>i</sub>, s'hidrolitza el GTP del complex ternari eIF2·GTP·Met-ARNT<sub>i</sub>, s'allibera el factor eIF2·GDP i el Met-ARNT<sub>i</sub> s'acomoda al lloc P de la subunitat 40S. Simultàniament, el factor eIF5B interacciona amb el complex i afavoreix la unió de la subunitat grossa del ribosoma (60S), tot consumint GTP. Un cop el factor eIF5B és alliberat, s'inicia l'elongació de la cadena peptídica naixent. Cal esmentar que en mamífers existeix un mecanisme d'iniciació alternatiu per alguns ARNm que depèn d'IRES (*internal ribosome entry sites*; llocs interns d'entrada al ribosoma) (Jackson, 2005).

Durant la fase d'elongació (figura 1.1 (2)), el factor eEF (*eukaryotic elongation factor*; factor d'elongació eucariòtic) 1A forma un complex ternari amb GTP i amb el nou aa-ARNT (aminoacil-ARNT), i es dirigeix fins al lloc A del ribosoma. L'emparellament del codó de l'ARNm amb l'anticodó de l'ARNT indueix la interacció de la subunitat petita del ribosoma amb el dúplex ARNm-ARNT i estimula l'activitat GTPasa del factor eEF1A, que allibera l'aa-ARNT. Un cop l'aa-ARNT s'ha assentat al lloc A, el PTC (*peptidyl transferase center*; centre peptidil transferasa) ribosòmic catalitza la formació d'un enllaç peptídic entre l'aminoàcid incorporat i el peptidil-ARNT. El resultat consisteix en un ARNT desacilat en un estat intermedi, amb l'anticodó situat al lloc P i l'extrem acceptor al lloc E del ribosoma, i un peptidil-ARNT en la mateixa situació, entre el lloc A i el lloc P del ribosoma. Aquest complex necessita ésser translocat de manera que l'ARNT desacilat se situï al lloc E del ribosoma i el peptidil-ARNT abandoni el lloc A per acomodar-se en el lloc P. Aquesta translocació, incentivada pel factor eEF2 amb consum de GTP,



**Figura 1.1 La traducció genètica citoplasmàtica eucariota.** S'exposen de manera esquemàtica les quatre fases de la traducció ribosòmica: (1) iniciació, (2) elongació, (3) terminació i (4) reciclatge. Adaptació de (Kapp i Lorsch, 2004).



alhora, mou l'ARNm tres posicions i deixa exposat el següent codó en el lloc A del ribosoma. L'alliberament de l'ARNt desacilat depèn de la presència del factor eEF3 en alguns organismes com ara els fongs, mentre que en altres eucariotes no és necessària la presència de cap factor d'elongació. Aquest cicle es repeteix fins que es detecta un codó de terminació a l'ARNm.

La fase de terminació (figura 1.1 (3)) té lloc en resposta a la presència d'un dels tres codons de terminació eucariotes (UGA, UAA o UAG) al lloc A del ribosoma. El factor eRF (*eukaryotic releasing factor*; factor de terminació eucariòtic) 1, juntament amb el factor eRF3 que hidrolitza l'enllaç èster entre l'ARNt del lloc P i la cadena polipeptídica, alliberen el polipèptid complet del ribosoma.

El reciclatge del ribosoma (figura 1.1 (4)), en eucariotes, no depèn de factors RRF (*ribosome recycling factor*; factor de reciclatge ribosòmic), sinó que es postula que el factor eIF3 participa en la separació de la subunitat 60S unida a l'ARNt i la 40S unida a l'ARNm. L'ARNt acomodat en el lloc P es dissocia del ribosoma mitjançant el factor eIF1, i el factor eIF3j garanteix l'alliberament de l'ARNm (Pisarev et al., 2007).

### 1.1.3 La traducció mitocondrial eucariota

Amb l'objectiu de garantir la síntesi de les proteïnes codificades al genoma mitocondrial, és necessari un sistema de traducció genètica independent del sistema citoplasmàtic. Per tal que la traducció genètica mitocondrial tingui lloc, cal, per una banda, que l'ADNmt (ADN mitocondrial) sigui correctament mantingut, replicat i transcrit i, per l'altra, que els diferents elements codificats a l'ADNn (ADN nuclear) que participen en la traducció genètica en aquest orgànu siguin correctament sintetitzats i transportats des del citoplasma (Smits et al., 2010).

La traducció genètica als mitocondris té moltes similituds amb la traducció genètica procariota, fet que està en consonància amb l'origen endosimbiòtic d'aquests orgànuls (consulteu l'apartat 1.3.1). Tot i així, la traducció mitocondrial presenta certes particularitats que difereixen tant del sistema de traducció citoplasmàtic eucariota com del procariota.

La traducció genètica mitocondrial, igual que la traducció procariota i la citoplasmàtica eucariota, està dividida en dos estadis: l'aminoacilació de l'ARNt i la traducció ribosòmica, que alhora està subdividida en quatre fases: iniciació, elongació, terminació i reciclatge, les quals requereixen la participació dels ribosomes mitocondrials (mitoribosomes) i de diversos factors de traducció.

La composició dels ribosomes citoplasmàtics eucariotes consisteix en una subunitat grossa 60S (formada per gairebé 50 proteïnes i els ARNr 28S, 5,8S i 5S) i una subunitat petita 40S (que consta d'unes 32-33 proteïnes i l'ARNr 18S). Els ribosomes procariotes, en canvi, estan formats per una subunitat grossa 50S (que conté unes 34 proteïnes i els ARNr 23S i 5S) i una subunitat petita 30S (constituïda per 21 proteïnes i l'ARNr 16S) (Doudna i Rath, 2002). La composició dels mitoribosomes és molt variada en els diferents organismes eucariotes, però la tendència general

és que tant les dimensions com la massa molecular dels mitoribosomes superin les dels ribosomes procariotes, degut a una minimització del contingut d'ARNr i a un increment del contingut proteic. La procedència de les MRP (*mitochondrial ribosomal proteins*; proteïnes ribosòmiques mitocondrials) varia segons l'organisme, per exemple: en mamífers, totes les proteïnes són codificades al genoma nuclear; en fongs, només algunes MRP són codificades per l'ADNmt i en protozous i plantes, el mitocondri codifica nombroses MRP (Smits et al., 2007).

Com que els ARNm procariotes no presenten caputxa a l'extrem 5', són reconeguts i reclutats gràcies a una seqüència rica en purines anomenada Shine-Dalgarno, localitzada a la regió 5'UTR, a unes deu posicions del codó d'inici. Aquesta seqüència s'emparella amb l'ARNr 16S de la subunitat petita del ribosoma i posiciona el codó d'inici al lloc P del ribosoma (Shine i Dalgarno, 1974). L'estructura secundària de l'ARNm evita la iniciació incorrecta de la traducció en un codó AUG qualsevol i facilita el reconeixement del codó d'inici (Nakamoto, 2006). Els extrems 5' dels ARNm mitocondrials no presenten la caputxa m<sup>7</sup>GpppN pròpia dels ARNm citoplasmàtics eucariotes, i es caracteritzen per l'absència d'una seqüència Shine-Dalgarno definida, tot i que, depenent de l'organisme, poden presentar regions 5'UTR d'extensió variable. En llevats, aquestes regions poden estendre's fins a centenars de nucleòtids i, tot i que contenen fragments similars a la seqüència Shine-Dalgarno, es postula que aquests no són necessaris per a la identificació del codó d'inici (Chacinska i Boguta, 2000). Els ARNm de mamífers, en canvi, tenen una escassa presència de nucleòtids a l'extrem 5'UTR i no contenen seqüència Shine-Dalgarno. La manca d'evidències de cap senyal que faciliti la unió de l'ARNm amb el mitoribosoma fa que la fase d'iniciació de la traducció mitocondrial sigui encara una incògnita. El descobriment recent d'alguns factors de traducció d'ARNm concrets, com TACO1 o SLIRP en humans, suggereix que el mecanisme de reconeixement dels ARNm pot ser específic per a cada gen (Shutt i Shadel, 2010).

En general, en el citoplasma d'organismes eucariotes, la poliadenilació de l'extrem 3' de l'ARNm proporciona estabilitat a la molècula, en facilita la sortida del nucli i participa en l'inici de la traducció; en canvi, en procariotes, l'ARNm es poliadenila amb l'objectiu de facilitar-ne la degradació. Pel que fa als ARNm mitocondrials, la presència i la funció de l'extrem 3'poli(A) varia segons l'organisme. En llevats, els ARNm no presenten cues 3'poli(A). En plantes superiors, la majoria d'ARNm no estan constitutivament poliadenilats a l'extrem 3', sinó que contenen seqüències en repetició invertida que es pleguen en forma de bucle estable. L'escassa abundància d'ARNm amb cues 3'poli(A) en plantes superiors suggereix un possible rol d'aquestes en el procés de degradació de l'ARNm (Gagliardi et al., 2004). En tripanosomes, coexisteixen poblacions d'ARNm amb extrems poli(A), tant estabilitzadors com desestabilitzadors (Kao i Read, 2005). En mamífers, la majoria dels ARNm mitocondrials contenen cues poli(A) estabilitzadores que inclouen, en molts casos, el codó de terminació, o bé se situen immediatament després d'aquest (Gagliardi et al., 2004).

Mentre que la síntesi proteica en el citoplasma eucariota s'inicia amb l'aminoàcid Met (metionina; M), en els procariotes i en els mitocondris eucariotes comença amb una versió modificada d'aquesta, la fMet (formilmetionina) (Clark i Marker, 1966; Montoya et al., 1981).

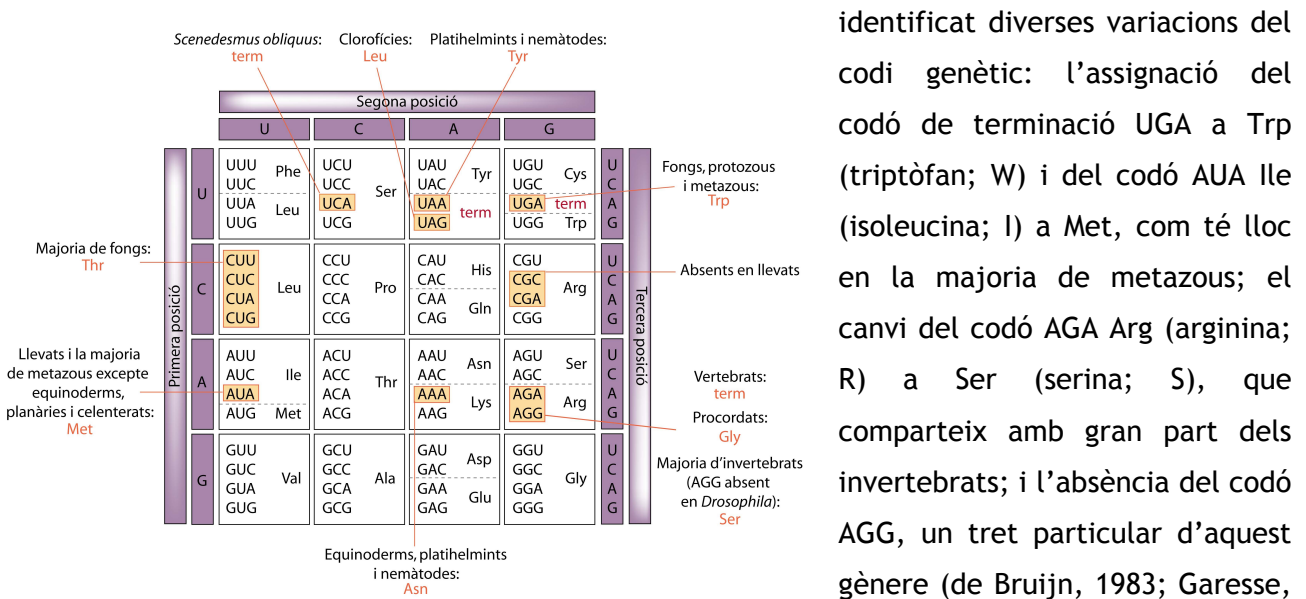
La fase d'iniciació de la traducció procariota és més senzilla que la que té lloc en el citoplasma eucariota, atès que tan sols hi participen tres IF (*initiation factor*; factor d'iniciació). IF1 s'uneix al lloc A de la subunitat petita del ribosoma amb la col·laboració de l'IF2. Aquest, alhora, facilita l'aparellament del codó d'ARNm amb l'anticodó del fMet-ARNt<sub>i</sub> i estimula l'associació de les dues subunitats ribosòmiques. El factor IF3 està implicat en la selecció de l'ARNt<sub>i</sub> entre els ARNt<sup>Met</sup> d'elongació. En el mitocondri d'eucariotes existeixen homòlegs als factors d'iniciació procariotes. En llevats, IFM1 és l'homòleg a l'IF2 procariota i és el responsable d'unir-se al fMet-ARNt<sub>i</sub> i posicionar-lo al ribosoma, sobre el codó d'inici, amb consum de GTP (Towpik, 2005). En mamífers, també existeixen homòlegs als factors IF2 (mtIF2) i IF3 (mtIF3), però no s'ha demostrat la presència d'un ortòleg del factor IF1. Sembla que mtIF2 hauria adquirit funcions pròpies dels factors IF1 i l'IF2 procariotes (Smits et al., 2010). Una singularitat de la iniciació de la traducció mitocondrial és l'ús de triplets no convencionals com a codons d'iniciació.

Durant la fase d'elongació procariota, els EF (*elongation factor*; factor d'elongació) EF-Tu i EF-G duen a terme funcions semblants als factors citoplasmàtics eucariotes eEF1A i eEF2, i els mitocondris eucariotes realitzen aquesta fase de manera similar i contenen homòlegs a aquests dos factors (mtEF-Tu i mtEF-G). Una peculiaritat observada és que en mamífers existeixen dos factors homòlegs a l'EF-G (mtEF-G1 i mtEF-G2) (Hammarsund et al., 2001). El factor mtEF-Ts és l'encarregat de regenerar el GTP unit a l'mtEF-Tu.

En la fase de terminació procariota, hi intervenen tres RF (*releasing factor*; factor de terminació). RF1 i RF2 reconeixen els codons de terminació i hidrolitzen l'enllaç èster entre l'ARNt i la cadena polipeptídica (Scolnick et al., 1968), i el factor RF3 estimula l'activitat i la dissociació dels altres dos factors del ribosoma. En mitocondris, en canvi, aquesta fase no s'ha dilucidat completament. Mentre que en llevats s'ha identificat un sol factor involucrat en la terminació (mRF1) que reconeixeria els dos codons de terminació d'aquest organisme (UAA i UAG), en mamífers, se n'han caracteritzat dos (mtRF1 i mtRF1a). mtRF1 detecta els codons de terminació UAA i UAG, però no s'ha demostrat activitat del factor mtRF1a, així doncs, la terminació vinculada als codons AGG i AGA en mamífers resta sense resoldre (Smits et al., 2010). Recentment, s'ha descrit un tercer factor, anomenat ICT1, que es creu que està implicat en la hidròlisi de motius peptidil-ARNt de terminació prematura (Richter et al., 2010).

El procés de reciclatge procariota depèn de l'activitat del factor RRF, que en associació amb el complex EF-G·GTP i l'IF3, produeix la dissociació del ribosoma. S'han identificat homòlegs al factor RRF en mitocondris eucariotes, que exhibeixen una activitat similar en el procés de reciclatge.

El mitocondri presenta un elevat nombre de desviacions del codi genètic universal en diferents organismes (vegeu la figura 1.2). Per exemple, en els mitocondris del gènere *Drosophila* s'han



**Figura 1.2 Codi genètic estàndard i variacions del codi genètic mitocondrial.** Es representa el codi genètic estàndard a l'interior dels requadres i, en taronja, es marquen les diferències pròpies del codi genètic mitocondrial, que són descrites a l'exterior de la taula, per a diferents organismes eucariotes. Adaptació de (Watanabe, 2010). Vegeu el glossari d'abreviatures d'aminoàcids.

identificat diverses variacions del codi genètic: l'assignació del codó de terminació UGA a Trp (triptòfan; W) i del codó AUA lle (isoleucina; I) a Met, com té lloc en la majoria de metazous; el canvi del codó AGA Arg (arginina; R) a Ser (serina; S), que comparteix amb gran part dels invertebrats; i l'absència del codó AGG, un tret particular d'aquest gènere (de Bruijn, 1983; Garesse, 1988).

El sistema de descodificació mitocondrial permet la traducció de tots els codons de l'ARNm a

partir d'un nombre reduït d'ARNt, per exemple, en els mitocondris de mamífers existeixen tan sols vint-i-dos ARNt, mentre que en el citoplasma s'utilitzen quaranta-nou ARNt diferents (Barrell et al., 1980). En animals, s'han descrit diferents mecanismes que permeten la minimització dels ARNt necessaris per a la traducció mitocondrial, tots ells basats en les relacions d'emparellament codó-anticodó (Watanabe, 2010). El primer d'ells, anomenat *four-way wobble*, consisteix en la capacitat d'una sola espècie d'ARNt per reconèixer quatre codons que comparteixen les dues primeres posicions i assignen un mateix aminoàcid. Es coneix que un U no modificat a la primera posició de l'anticodó (posició *wobble*) té l'habilitat d'emparellar-se amb qualsevol nucleòtid. Seguint aquesta regla, l'ARNt<sup>Ser</sup> (UGA) mitocondrial de *D. melanogaster* seria el responsable de descodificar els quatre codons UCN a serina. El mateix tipus de fenomen ocorre en alguns organismes amb els ARNt<sup>Arg</sup> que presenten una A no modificada, o els ARNt<sup>Ser</sup> amb una m<sup>7</sup>G en aquesta posició. Un segon mecanisme (*three-way wobble*) és emprat per tal de descodificar les famílies de codons dividides 3:1, que es basa en el reconeixement del codó acabat en G per part d'una espècie d'ARNt amb una C no modificada a la primera posició, mentre que la resta de codons de la mateixa família són reconeguts per un ARNt amb una G no modificada. En diversos treballs científics es proposa que aquest sistema permet la descodificació dels codons AGC, AGA i AGU a serina en *Drosophila* a partir de l'ARNt<sup>Ser</sup> (GCU) mitocondrial (Tomita et al., 1999). L'últim mecanisme, *two-way wobble*, té lloc en les famílies de codons dividides 2:2. Mentre que els codons acabats en U o C són reconeguts pels ARNt que presenten una G no modificada o una queosina a la posició *wobble*, els altres dos codons s'emparellen amb els ARNt que posseeixen determinades modificacions al nucleòtid U o una f<sup>5</sup>C.

Tots els aspectes que hem esmentat en aquest apartat fan de la traducció mitocondrial un procés únic, segregat de la traducció citoplasmàtica. La separació entre els dos sistemes de traducció és un aspecte essencial per tal d'assolir l'objectiu inicial d'aquest treball, ja que permet la generació de defectes causats per alteracions específiques en la maquinària de traducció d'aquest orgànu.

#### 1.1.4 Malalties humanes de traducció genètica

Un elevat nombre de malalties humanes són causades per alteracions en components involucrats en la traducció dels ARNm. Algunes d'aquestes patologies són fruit de mutacions en ARNm específics que afecten la seva pròpia traducció, i altres són causades per mutacions en elements de la maquinària traduccional. Aquest grup d'afectacions són identificades com a malalties orfes o rares, que es defineixen per afectar menys d'una persona per cada 2.000. Les mutacions que afecten proteïnes de l'aparell de traducció genètica citoplasmàtica donen lloc a un ampli ventall de malalties que mostren un grau d'afectació variable segons el teixit o l'òrgan (Scheper et al., 2007b).

Existeixen mutacions en proteïnes encarregades de modificar l'ARNr a nivell posttranscripcional, com ho és la disquerina (Heiss et al., 1998), una proteïna nucleolar que, a més, forma part del complex telomerasa. La disqueratosi congènita lligada al cromosoma X està vinculada a mutacions en la disquerina, que causen principalment erosió telomèrica. Tanmateix, en models animals, s'ha observat que aquestes mutacions també provoquen deficiències en la traducció dependent d'IRES d'alguns ARNm involucrats en la regulació del cicle cel·lular o de l'apoptosi.

Diversos treballs han identificat mutacions en alguns gens que codifiquen subunitats de factors de traducció. El factor d'iniciació eIF2B consta de cinc subunitats i està implicat en la regeneració de l'eIF2·GDP a eIF2·GTP. Mutacions en les diferents subunitats del factor eIF2B provoquen greus patologies neurodegeneratives d'herència autosòmica recessiva amb una àmplia variabilitat fenotípica. En individus afectats, l'activitat del factor es redueix però no afecta la taxa de síntesi proteica, fet que suggereix que l'activitat de l'eIF2B no és limitant en les cèl·lules, tot i que desencadena l'activació de la via UPR (*unfolded protein response*; resposta a proteïnes desplegadas) i la inducció de rutes de resposta a estrès (van der Knaap et al., 2002). Un altre cas és el de la cinasa PERK, que fosforila el factor eIF2 com a part de la via UPR. Mutacions en aquesta cinasa provoquen una síndrome que inclou la diabetis infantil, que està causada pel bloqueig parcial o total de l'activitat de PERK, la qual implica la sobreproducció d'insulina per sobre de la capacitat de processament per part de les cèl·lules  $\beta$ , tot activant la via UPR i l'apoptosi d'aquestes cèl·lules (Delepine et al., 2000). Un exemple addicional és la inserció GGC a l'exó 1 del factor de terminació eRF3, que està associat amb el càncer gàstric. El mecanisme patogènic d'aquesta inserció no és del tot clar, pot ser degut a la funció de l'eRF3 en la traducció o en funcions no canòniques relacionades amb el control de la segregació cromosòmica i la regulació de l'apoptosi (Brito et al., 2005).

Hi ha poques malalties causades per mutacions en les proteïnes o els ARNr que formen els ribosomes, probablement perquè són elements tan importants per a la funció cel·lular que les mutacions són letals en el desenvolupament primerenc. Alguns casos d'anèmia de Diamond-Blackfan són causats per mutacions en proteïnes ribosòmiques, com ara la RPS19 o la RPS24. Atès que la RPS19 és essencial per a la maduració de la subunitat ribosòmica 40S, la malaltia pot ser el resultat d'una disminució general en l'abundància de ribosomes. Tot i així, les RPS19 i 24 també estan relacionades amb la unió del factor eIF2 i, per tant, no es pot descartar que mutacions en aquestes proteïnes impedeixin l'inici de la traducció. Per altra banda, diversos síndromes de la medul·la òssia s'han vinculat a mutacions en gens que codifiquen proteïnes involucrades en la maduració, l'acoblament i la funció ribosòmica, com ho són la RMRP (Ridnappa et al., 2001) i la SBDS (Boocock et al., 2003). De tota manera, és difícil determinar si el defecte traduccional és la causa primària d'aquestes patologies de la medul·la òssia.

En darrer lloc, cal esmentar que existeixen diverses mutacions en aaRS citoplasmàtiques que estan relacionades amb malalties humanes (explicades a l'apartat 1.2.5).

A banda de les afeccions causades per defectes de la traducció genètica citoplasmàtica, explicades, fins ara, en aquest apartat, també existeixen malalties mitocondrials hereditàries provocades per mutacions en components de la maquinària de síntesi proteica mitocondrial (desenvolupades a l'apartat 1.3.4).

En aquesta secció s'han descrit els components i el funcionament del procés de la traducció genètica eucariota, tot centrant l'atenció en aquells aspectes que fan de la traducció mitocondrial un fenomen particular. A més, s'ha fet palesa la importància del correcte funcionament de la traducció genètica, tot esmentat un seguit de malalties humanes associades a mutacions en elements de traducció genètica. Tota aquesta informació permet assentar les bases per tal d'aprofundir, a continuació, en l'estudi de les proteïnes protagonistes d'aquest treball: les aminoacil-ARNt sintetases.



## 1.2 AMINOACIL-ARNt SINTETASES

Les aaRS (aminoacil-ARNt sintetases) són una família d'enzims essencials implicats en el primer estadi de la traducció genètica: la reacció d'aminoacilació. A part de la seva funció principal en la traducció genètica, les aaRS també poden estar implicades en un ventall de funcions no convencionals. Tant per la seva funció clàssica, com per les noves funcions descrites, en alguns casos, les aaRS estan relacionades amb diverses malalties humanes.

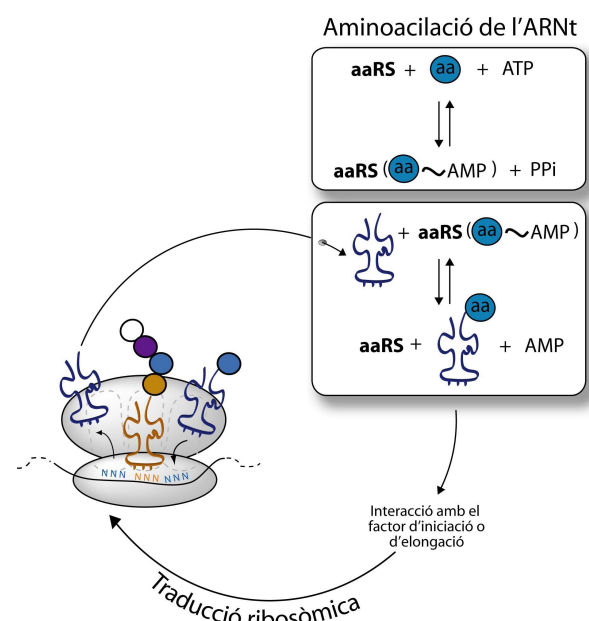
### 1.2.1 La reacció d'aminoacilació

En general, existeix una aaRS per a cada aa (aminoàcid) utilitzat en el codi genètic estàndard, que és capaç de catalitzar específicament l'aminoacilació de l'ARNt adient.

La reacció d'aminoacilació consisteix en dues etapes, esquematitzades a la figura 1.3. En primer lloc, l'aa és activat amb ATP, formant així, l'aa-AMP (aminoacil adenilat), amb l'alliberament de PPi (pirofosfat inorgànic). En segon lloc, l'aa-AMP en complex amb l'enzim és transferit a l'extrem 3' de l'ARNt específic per formació d'un enllaç covalent (aa-ARNt), tot alliberant AMP (*adenosine monophosphate*; adenosina monofosfat).

A part de la selecció dels aa-ARNt per part dels factors de traducció i del ribosoma, l'emparellament acurat de cada aa amb l'ARNt específic per part de les aaRS constitueix el punt central que permet mantenir la fidelitat en el procés de traducció (Ibba i Söll, 1999). El reconeixement incorrecte dels ARNt per part de

les aaRS produiria l'aminoacilació errònia dels ARNt, que serien utilitzats pel ribosoma per tal de descodificar codons de manera incorrecta, tot introduint mutacions en les proteïnes sintetitzades. Per tal d'evitar aquest tipus d'errors, existeixen diferents sistemes de control i d'edició durant el procés de síntesi de proteïnes. Els mecanismes d'edició en el procés d'aminoacilació són classificats depenent de la fase de la reacció en la qual actuen: edició pretransferència o edició posttransferència. L'edició pretransferència pot ser duta a terme pel centre catalític de l'enzim o per un domini d'edició afegit, i consisteix en l'hidròlisi de l'enllaç de l'aa-AMP o en l'alliberament de l'aa-AMP erroni, abans de ser incorporat a l'ARNt (Splan et al., 2008). L'edició posttransferència es realitza a través de dominis d'edició afegits a l'enzim o



**Figura 1.3 Participació de les aaRS en la traducció genètica.** La part superior dreta de la figura representa la reacció d'aminoacilació en dues etapes. Un cop l'ARNt està aminoacilat, és transportat fins al ribosoma on té lloc la traducció ribosòmica, esquematitzada a la part inferior esquerra de la figura.

de dominis d'actuació en *trans*, que hidrolitzen la unió entre l'aa i l'ARNt (Fersht i Dingwall, 1979; Zhao et al., 2005).

A part del mecanisme de control a què estan sotmeses les aaRS, si es forma un aa-ARNt erroni, existeixen altres punts de control al llarg de la traducció, per exemple, el factor EF-Tu procariòtic discrimina alguns ARNt aminoacilats incorrectament (Knowlton i Yarus, 1980).

L'aminoacilació d'ARNt per part de les aaRS té com a principal objectiu la síntesi de proteïnes, tanmateix, els aminoàcids poden ser transferits a d'altres molècules per tal de desenvolupar funcions diferents. Per exemple, en bacteris, l'aminoacilació de l'ARNm de transferència per part de l'ARS (alanil-ARNt sintetasa) és emprada com a mecanisme d'emergència per tal de reciclar ribosomes encallats (Withey i Friedman, 2003), i l'aminoacilació d'ARN d'alguns virus de plantes és necessària per a la seva replicació (Fechter et al., 2001).

### 1.2.2 Origen i evolució de les aaRS

Les aaRS són proteïnes antigues, la majoria de les quals van evolucionar abans de l'últim ancestre comú (Nagel i Doolittle, 1991), i es creu que la seva aparició coincideix amb el desenvolupament primerenc del codi genètic (Woese et al., 2000). Les aaRS es divideixen en enzims de classe I i II, que provenen de dos dominis catalítics ancestrals independents amb arquitectures diferents i simètriques, tots dos amb la capacitat d'activar aminoàcids i incorporar-los als ARNt (Schimmel i Ribas de Pouplana, 1995). Segons diversos anàlisis de seqüències al llarg de l'arbre de la vida, cada classe d'aaRS pot ser subdividida en tres subclasses (a, b i c) que provenen de diferents antecessors (Nagel i Doolittle, 1991; Cusack, 1997). Les aaRS que pertanyen a un mateix subgrup reconeixen aminoàcids semblants i, a més, existeix un elevat grau de simetria entre el tipus d'aminoàcid reconegut per les aaRS de diferent classe, però de subclasses corresponents. Estudis de modelatge molecular mostren que els centres catalítics d'aaRS de diferents classes, però de subclasses corresponents, podrien encaixar en una mateixa molècula l'ARNt, de manera que els ancestres de les diferents subclasses podrien haver unit un mateix ARNt, tot donant lloc a la simetria actual existent entre subclasses d'aaRS (Ribas de Pouplana i Schimmel, 2001).

Aquests progenitors s'haurien duplicat i especialitzat per tal de reconèixer cada aminoàcid, tot donant lloc a dominis catalítics cada cop més refinats, que es traduïrien en un seguit d'aaRS presents en l'últim ancestre comú. Per a moltes d'aquestes aaRS, hi ha residus d'interacció aminoacídics que es mantenen al llarg de l'evolució, fet que indica la seva presència en l'últim ancestre comú. De tota manera, variacions d'aquests aminoàcids crucials en la WRS (triptofanil-ARNt sintetasa) i la YRS (tirosil-ARNt sintetasa) indiquen que, probablement, l'especialització definitiva dels seus centres catalítics podria haver tingut lloc simultàniament amb l'evolució bacteriana i la primera divisió de l'arbre de la vida (Yang et al., 2003). La QRS (glutaminil-ARNt sintetasa), la NRS (asparaginil-ARNt sintetasa) i la CRS (cisteinil-ARNt sintetasa) sembla que haurien evolucionat posteriorment a l'últim ancestre comú, atès que la QRS i la NRS només són



presentes en alguns bacteris i en tots els eucariotes, i la CRS no es troba en alguns arqueobacteris (Freist et al., 1997).

Com ja hem esmentat, cada aaRS pot ser assignada a una classe i subclasse determinades, amb l'excepció de la KRS (lisil-ARNt sintetasa), que existeix en dues formes que pertanyen a classes diferents (Ibba et al., 1997). Els enzims de classe I tenen un centre catalític en forma de plegament de Rossmann que conté els motius característics HIGH i KMSKS per a la interacció amb l'ATP i el  $Mg^{+2}$  (Rould et al., 1989; Eriani et al., 1990). En canvi, els enzims de classe II presenten un domini catalític format de làmines  $\beta$  antiparal·leles flanquejades per hèlixs  $\alpha$ , que exhibeix tres motius conservats. El motiu 1 (g $\Phi$ xx $\Phi$ xxP $\Phi$  $\Phi$ ) forma part de la interfície de dimerització i els motius 2 ((F/Y/H)Rx(E/D)4-12x(R/H)xxxFxxx(D/E)) i 3 ( $\lambda$ x $\Phi$ g $\Phi$ g $\Phi$ eR $\Phi$  $\Phi$  $\Phi$  $\Phi$ ) es troben a prop del centre catalític i participen en la unió de l'ATP, l'aminoàcid i el braç acceptor de l'ARNt (Eriani et al., 1990; First, 2005). Les aaRS de classe I uneixen l'aminoàcid al grup 2'-OH de l'extrem 3' de l'ARNt, mentre que les de classe II ho fan al grup 3'-OH (Fraser i Rich, 1975; Sprinzl i Cramer, 1975). Els enzims de classe I s'aproximen al braç acceptor per la cara del solc menor de l'ARNt, en canvi, els de classe II ho fan per la cara del solc major (Sissler et al., 1997). Per últim, les aaRS de classe I solen ser monomèriques i les de classe II, normalment, funcionen en forma de dímer o tetràmer (First, 2005).

Les aaRS també han patit diversos processos de transferència horitzontal de gens al llarg de l'evolució, amb exemples presents en aaRS de cada subclasse (Dohm et al., 2006). En l'origen dels eucariotes (consulteu l'apartat 1.3.1), un  $\alpha$ -Proteobacteri (protomitocondri) i una cèl·lula nucleada hoste es van fusionar, aportant, cada un, un conjunt sencer d'aaRS, que van ser posteriorment unificats al nucli, gràcies a la transferència lateral dels gens protomitocondrials. Es proposa que l'evolució de les aaRS eucariotes tingué lloc seguint un o diversos passos. Un primer pas consistiria en la transferència horitzontal de gens que codifiquen aaRS des del protomitocondri al nucli, de manera que les aaRS bacterianes haurien de ser dirigides de nou cap al mitocondri, mentre que les aaRS de l'hoste serien dirigides al citoplasma. Un segon pas consistiria en la duplicació del gen nuclear i/o bacterià, en què el nou gen paràleg substituïria un dels gens ancestrals. Un tercer pas seria l'addició de preseqüències de senyalització en gens duplicats que permetessin el transport de cada aaRS al compartiment de destí. Si l'aaRS que procedeix d'una de les dues còpies és dirigida als dos compartiments, l'altra pot ser eliminada.

### 1.2.3 Funcions no convencionals de les aaRS

Tot i que les aaRS han estat considerades tradicionalment enzims dedicats a l'aminoacilació dels ARNt, s'ha determinat la implicació d'aquests enzims en diversos processos biològics independents. Mentre que en bacteris i llevats moltes d'aquestes noves funcions estan relacionades amb la regulació de la transcripció i de la traducció, en eucariotes superiors tendeixen a estar vinculades amb mecanismes més sofisticats, com ara la senyalització cel·lular o el control del cicle cel·lular (Bori-Sanz et al., 2006).

En bacteris, algunes aaRS controlen l'expressió gènica, per exemple, la TRS (treonil-ARNt sintetasa) d'*Escherichia coli* regula negativament l'expressió del seu propi gen (*thrS*) a nivell traduccional. L'enzim s'uneix al seu ARNm i inhibeix l'inici de la traducció per competició amb la subunitat petita del ribosoma (Springer et al., 1985). En llevats, la DRS (aspartil-ARNt sintetasa) també regula la seva expressió per unió específica a l'extrem 5' del seu ARNm, i depenent de la concentració d'ARNt<sup>Asp</sup> a la cèl·lula (Frugier i Giegé, 2003; Ryckelynck et al., 2003; Ryckelynck et al., 2005). En humans, s'ha observat que l'EPRS (glutamil-prolil-ARNt sintetasa), un cop alliberada del complex multisintetasa, regula la traducció de determinats ARNm implicats en la resposta inflamatòria per interacció amb la regió 3'UTR (Sampath et al., 2004).

Algunes de les activitats no convencionals de les aaRS són realitzades pels seus dominis catalítics, per exemple, diverses aaRS, entre les quals es troba la SRS, s'han adaptat per tal de sintetitzar molècules Ap<sub>n</sub>A (diadenosina polifosfat), que alliberades a l'espai extracel·lular tenen influència en un ampli ventall de funcions metabòliques i altres activitats cel·lulars en diferents teixits. Per una banda, es creu que poden actuar com a molècules senyalitzadores de l'estat energètic de la cèl·lula per mitjà de la regulació del metabolisme de la glucosa (Edgecombe et al., 1997; Verspohl et al., 2003). Per altra banda, se suggereix que aquestes molècules estan involucrades en fenòmens de proliferació i mort cel·lular. Per exemple, l'Ap<sub>4</sub>A, sintetitzada per la KRS, inhibeix gens induïts per estrès en procariotes (Wright et al., 2006) i bloca l'efecte d'un gen supressor de tumors en eucariotes (Lee et al., 2004b).

En cèl·lules eucariotes, existeix una estreta relació entre la síntesi de proteïnes i la transducció de senyals. En humans, la YRS és secretada per la cèl·lula i processada, donant lloc a dos fragments amb activitat citoquina. Un dels fragments (mini-YRS), format pel domini catalític, presenta activitat similar a una quimioquina angiogènica (Wakasugi i Schimmel, 1999). L'altre fragment és homòleg al pèptid EMAPII (*endothelial monocyte activating polypeptide II*; polipèptid II activador de monòcits i cèl·lules endotelials), que en ser escindit de la proteïna pot estimular la migració de cèl·lules immunitàries i la producció de TNF (*tumor necrosis factor*; factor de necrosi tumoral) (Yang et al., 2004). Una funció oposada a l'anterior s'ha determinat per a la WRS. Una variant d'aquest enzim, produïda per *splicing* alternatiu (mini-WRS), actua com un inhibidor de l'angiogènesi (Wakasugi et al., 2002). Addicionalment, s'ha descrit que l'EPRS inhibeix l'angiogènesi a través del silenciament traduccional del VEGF (*vascular endothelial growth factor*; factor de creixement de l'endoteli vascular) (Ray i Fox, 2007). Recentment, s'ha relacionat la SRS amb el desenvolupament vascular del peix zebra. Mutants pel gen que codifica la SRS produeixen fenotips caracteritzats per ramificacions i dilatació vasculars, que són abolits quan s'inhibeix el senyal produït pel factor VEGF (Kawahara i Stainier, 2009).

En eucariotes, algunes aaRS s'organitzen formant complexos macromoleculars mitjançant interaccions entre proteïnes. En mamífers, s'han identificat nou aaRS que formen part de l'anomenat complex multisintetasa, en associació amb altres factors no enzimàtics (p43, p38 i

p18) (Kerjan et al., 1994; Han et al., 2003). Es postula que la funció d'aquest complex és la canalització dels ARNt cap al ribosoma per tal de millorar l'eficiència d'aminoacilació (Lee et al., 2004a). Diverses aaRS que formen part del complex multisintetasa presenten funcions no canòniques. Per exemple, la MRS (metionil-ARNt sintetasa) humana actua com un sensor del nivell d'acoblament de la traducció i la síntesi d'ARNr. La MRS és transportada al nucli en situacions de proliferació per tal d'augmentar la síntesi d'ARNr al nuclèol (Ko et al., 2000). Un altre cas és el de la QRS, la qual està implicada en el control de la proliferació i la mort cel·lular mitjançant la interacció antagonista amb ASK1, una cinasa implicada en l'apoptosi (Ko et al., 2001). A part de les aaRS, els factors associats al complex multisintetasa també poden exhibir diverses funcions independents de la síntesi proteica, algunes d'elles relacionades amb l'angiogènesi o la inflamació.

#### 1.2.4 Proteïnes similars a aaRS

L'anàlisi de genomes complets de molts organismes, cada cop més, posa en evidència la presència de diverses proteïnes similars a aaRS, que han aparegut al llarg de l'evolució a causa de nombrosos processos de reorganització genòmica, duplicacions o esdeveniments de transferència lateral de gens. Gran part d'aquestes proteïnes són homòlogues a dominis concrets d'aaRS i poden dur a terme funcions relacionades amb l'aminoacilació o l'edició dels ARNt o bé, funcions totalment independents de la síntesi proteica.

Un grup d'aquestes proteïnes estan implicades en la síntesi d'aminoàcids i cofactors, com per exemple la proteïna HisZ de *Lactococcus lactis*. Aquesta proteïna, que és homòloga al centre catalític de l'HRS (histidil-ARNt sintetasa) tot i que no presenta activitat d'aminoacilació, té un paper essencial en la via de biosíntesi de la histidina (Sissler et al., 1999).

Existeixen proteïnes similars a aaRS que tenen un paper important en la modificació de l'ARN. Aquest és el cas d'unes proteïnes similars a l'ERS (glutamil-ARNt sintetasa), anomenades YadB, que tenen l'habilitat d'activar el Glu (àcid glutàmic; E) i incorporar-lo a la queosina de la primera posició de l'anticodó de l'ARNt<sup>Asp</sup>, en lloc d'unir-lo a l'extrem 3' dels ARNt<sup>Glu/Gln</sup>, com ho faria l'ERS (Blaise et al., 2005).

Algunes proteïnes semblants a dominis d'edició d'aaRS estan involucrades en el control de la fidelitat de la traducció (Ahel et al., 2003; Wong et al., 2003). En bacteris, arqueobacteris i eucariotes s'han detectat proteïnes autònomes similars al domini d'edició de la PRS (prolil-ARNt sintetasa). Per exemple, les proteïnes PrdX de *Clostridium sticklandii* i YbaK d'*Haemophilus influenzae*, hidrolitzen específicament l'Ala-ARNt<sup>Pro</sup> i, així, eviten la incorporació errònia d'Ala (alanina; A) a proteïnes. D'una manera similar, els dominis AlaX homòlegs a l'ARS, de diverses espècies de bacteris, arqueobacteris i eucariotes, hidrolitzen els Ser-ARNt<sup>Ala</sup> i els Gly-ARNt<sup>Ala</sup>.

També s'ha descrit un grup d'aquestes proteïnes vinculades amb processos de transport cel·lular, per exemple la proteïna trbp111 d'*Aquifex aeolicus* (Swairjo et al., 2000) o l'Arc1p de

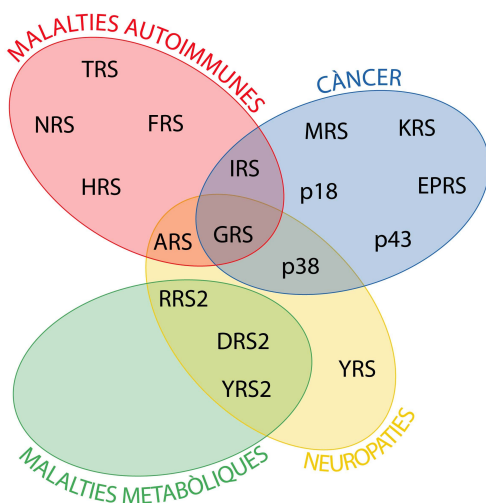
*Saccharomyces cerevisiae* tenen un rol en el transport nuclear de diversos ARNt (Deinert et al., 2001).

L'ADN polimerasa  $\gamma$ , que és l'enzim responsable de la replicació de l'ADN mitocondrial en eucariotes, consta d'una subunitat accessòria que presenta homologia amb GRS (glicil-ARNt sintetases) procariotes. A diferència dels casos mencionats anteriorment, la subunitat accessòria de l'ADN polimerasa  $\gamma$  presenta homologia amb la seqüència completa de la GRS (Carrodegua et al., 1999; Carrodegua et al., 2001).

Pel que fa a proteïnes homòlogues a seril-ARNt sintetases, que són objecte d'interès en el nostre projecte, s'ha descrit la proteïna BirA en bacteris, arqueobacteris i eucariotes (Artymiuk et al., 1994). BirA uneix el grup prostètic biotina a diverses proteïnes relacionades amb processos de carboxilació i descarboxilació i, a més, s'uneix a l'ADN per tal de regular la seva pròpia transcripció, tot emprant la biotina com a corepressor. Per altra banda, s'han trobat duplicacions del gen *serS* en dues espècies del gènere *Streptomyces*. En un cas, la proteïna VImA proporciona el Ser-ARNt necessari per a la producció de l'antibiòtic valanimicina (Garg et al., 2008). En l'altre cas, la proteïna Alb10 és la que confereix resistència a l'antibiòtic albomicina (Zeng et al., 2009). Per últim, recentment s'han identificat i caracteritzat diversos gens bacterians que codifiquen proteïnes similars al domini catalític de SRS d'arqueobacteris metanogènics. Aquests homòlegs transfereixen, de manera específica, aminoàcids activats al grup prostètic fosfopanteteïna de possibles proteïnes transportadores (Mocibob et al., 2010).

### 1.2.5 aaRS i malalties humanes

Les primeres malalties humanes que es van relacionar amb les aaRS van ser les autoimmunes, al voltant dels anys 1980, i des de llavors el nombre d'afeccions vinculades amb aquesta família



d'enzims, en relació amb la seva funció canònica o amb funcions no convencionals, s'ha anat ampliant (consulteu la figura 1.4).

S'han detectat anticossos contra diferents aaRS en pacients amb patologies com ara la polimiositis, la malaltia de pulmó intersticial, l'artritis reumatoide i erosiva o la fibrosi pulmonar, que suposen entorn del 30% dels pacients amb malalties autoimmunes. Aquest grup de patologies sistèmiques s'ha designat amb el nom de síndrome antisintetasa i està causada per la presència d'autoanticossos que reaccionen contra l'HRS (anti-Jo-1), la TRS (anti-PL-7), l'ARS (anti-PL-12), la GRS (anti-EJ), l'IRS (isoleucil-ARNt sintetasa) (anti-OJ), la NRS (anti-KS) o la FRS (fenilalanil-ARNt sintetasa) (anti-Zo) (Park et al., 2008). La raó per la qual les aaRS són

**Figura 1.4** Mapa d'aaRS relacionades amb malalties humanes. S'exposen de manera esquemàtica quatre tipus d'afeccions humanes on s'agrupen diversos exemples d'aaRS i de factors del complex multisintetasa que hi estan implicats.

molècules autoantigèniques no és clara, tot i que s'especula que determinats motius estructurals poden ser crucials per a la producció d'autoanticossos. Això estaria en concordança amb el fet que la majoria d'aaRS autoantigèniques pertanyen a la classe II, tot i així, s'ha descrit que l'epítip antigènic de l'HRS en la majoria de pacients es troba a la regió N-terminal (Raben et al., 1994) que, en general, no és una part clàssicament conservada en les aaRS de classe II.

Alguns elements del sistema de traducció mostren una regulació anormal a l'alça o a la baixa en diversos tipus de càncers, probablement, a causa de diferències en la qualitat i la quantitat de síntesi proteica en cèl·lules tumorals. En càncer de còlon humà, l'ARNm que codifica la MRS és regulat a l'alça (Kushner et al., 1976) i, a més, el seu extrem 3'UTR conté una regió complementària a l'extrem 3'UTR de l'ARNm que codifica CHOP, un factor de transcripció vinculat a l'aparició de determinats tumors (Forus et al., 1994). Un altre exemple és el cas de l'EPRS i l'IRS, l'expressió de les quals està sota el control del protooncogèn *c-myc*, de manera que variacions en el nivell d'expressió d'aquestes aaRS són habituals en condicions oncogèniques (Coller et al., 2000). Entre altres casos, també s'ha evidenciat la regulació a l'alça de la GRS en carcinomes papil·lars de tiroïdes (Wasenius et al., 2003) o la sobreexpressió de la KRS en càncer de mama (Park et al., 2005). A més, algunes aaRS s'han relacionat amb processos pro o antiangiogènics (vegeu l'apartat 1.2.3), de manera que aquestes proteïnes també poden tenir funcions de control de l'angiogènesi en relació amb el desenvolupament de tumors. En darrer lloc, cal mencionar que els factors p43, p38 i p18 associats al complex multisintetasa també s'han vist implicats en vies de senyalització rellevants en càncer (Park et al., 2008).

Mutacions en gens que codifiquen aaRS poden afectar el primer estadi de la síntesi proteica i, per tant, poden interferir amb la correcta lectura del codi genètic. S'han descrit algunes mutacions en gens que codifiquen aaRS, que estan estretament relacionades amb patologies del sistema nerviós. Aquest fet posa de manifest la importància de les aaRS en el desenvolupament i la funció de les neurones i suggereix que les aaRS poden tenir un paper important en malalties neurològiques hereditàries (Antonellis i Green, 2008). Una d'aquestes afeccions és la malaltia CMT (Charcot-Marie-Tooth), que representa el trastorn hereditari del sistema nerviós perifèric més comú. La CMT es classifica en dos grups: de tipus 1, quan és induïda per desmielinització axonal o, de tipus 2, quan no hi ha desmielinització sinó una disminució de l'amplitud de les respostes nervioses evocades motores i sensorials (Dyck i Lambert, 1968). Aquesta malaltia pot ser causada per mutacions en diferents *loci*, entre els quals s'han identificat mutacions de transmissió autosòmica dominant en el gen *GARS* que codifica la GRS humana, i causen el subtipus CMT2D de la malaltia (Antonellis et al., 2003). Algunes mutacions en el gen *GARS* també estan associades amb l'atròfia muscular espinal distal tipus V (Sivakumar et al., 2005). També s'han trobat mutacions al gen de la YRS citoplasmàtica (*YARS*) que produeixen la DI-CMT, un subtipus dominant intermedi de la patologia (Jordanova et al., 2006). El mecanisme de patogènesi de les mutacions que afecten la GRS i la YRS humanes no està clar, pot ser degut a una pèrdua de funció o a un guany de funció que generi toxicitat. A més, mitjançant l'ús d'animals model amb algunes de les mutacions descrites en el gen *GARS* (Seburn et al., 2006;

Chihara et al., 2007) i YARS (Storkebaum et al., 2009) (vegeu l'apartat 1.4.2), s'ha comprovat que els símptomes de la CMT no sempre estan associats a un dèficit en l'aminoacilació i, per això, es considera la possibilitat que la patologia estigui vinculada a funcions desconegudes de les aaRS, relacionades amb el desenvolupament i/o l'homeostasi del sistema nerviós perifèric. Recentment, s'ha identificat una mutació en el gen AARS que codifica l'ARS humana en diversos pacients que pateixen la malaltia CMT2 (Latour et al., 2010).

També s'ha determinat una possible relació del factor p38 del complex multisintetasa amb la PD (*Parkinson's disease*; malaltia de Parkinson). p38 és un dels substrats de la proteïna Parkin que n'estimula la ubiquïtinització i degradació via proteasoma (Corti et al., 2003). Mutacions en la proteïna Parkin provoquen una acumulació de proteïnes anormals que generen la malaltia de Parkinson, i en animals model s'ha observat que l'abolició del gen que la codifica produeix un augment de l'expressió de p38 que indueix l'apoptosi en neurones i la formació d'inclusions similars a agresomes (Ko et al., 2005).

A part de mutacions en aaRS citoplasmàtiques, i en alguns factors associats a aquestes, existeixen desordres vinculats a mutacions en gens nuclears que codifiquen aaRS mitocondrials humanes, com ara el de l'arginil- (*RARS2*), l'aspartil- (*DARS2*) i la tirosil-ARNt sintetasa (*YARS2*) (per a més informació, consulteu l'apartat 1.3.4).

### 1.2.6 Seril-ARNt sintetases

El present treball està focalitzat en la seril-ARNt sintetasa com a diana de manipulació de la maquinària de traducció mitocondrial de *D. melanogaster* i en l'estudi d'una proteïna homòloga a SRS en insectes.

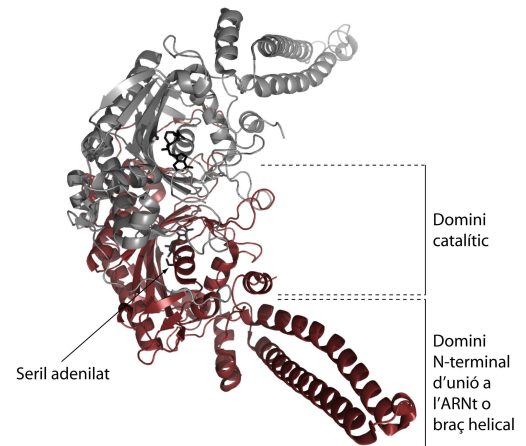
La SRS pertany a la subclasse IIa, juntament amb l'ARS, la PRS, la TRS, la GRS i l'HRS (Cusack et al., 1991), i és l'enzim encarregat d'aminoacilar els ARNt<sup>Ser</sup> amb l'aminoàcid serina. La SRS no només participa directament en la traducció d'ARNm, sinó que també està involucrada en la incorporació cotraduccional de Sec (selenocisteïna) en alguns codons de terminació de determinades proteïnes mitjançant l'aminoacilació de l'ARNt<sup>Sec</sup> amb serina, que posteriorment és transformada en selenocisteïna per acció de la selenocisteïna sintasa.

En els darrers 30 anys s'han resolt estructures tridimensionals de SRS en complex amb la serina, l'ATP, el seril adenilat o l'ARNt<sup>Ser</sup> de diferents organismes: *E. coli* (Cusack et al., 1990), *Thermus thermophilus* (Fujinaga et al., 1993; Belrhali et al., 1994; Biou et al., 1994), *Bos taurus* mitocondrial (Chimnaronk et al., 2005), *Methanosarcina barkeri* (Bilokapic et al., 2006), *Pyrococcus hirikoshii* (Itoh et al., 2008) i *Trypanosoma brucei* (PDB: 3LSS i 3LSQ). Aquests estudis posen de manifest que les SRS són proteïnes homodimèriques i que cada monòmer comprèn un centre catalític C-terminal, que es manté generalment conservat en les diferents espècies, i un domini N-terminal d'unió a l'ARNt poc conservat que es plega donant lloc a una llarga estructura en forma de *coiled-coil* (vegeu la figura 1.5) i que s'anomena braç helical. Existeix una excepció a aquesta estructura convencional en les SRS d'arqueobacteris metanogènics. En aquests



organismes, el centre catalític de la SRS no conserva els motius típics de les aaRS de classe IIa (Bilokapic et al., 2006) i el seu domini N-terminal d'unió a l'ARNt té una conformació globular que utilitza un mecanisme de reconeixement de l'ARNt diferent (Korencic et al., 2004; Jaric et al., 2009).

El domini catalític de les SRS canòniques consta de set fulles  $\beta$  antiparal·leles amb dues hèlix  $\alpha$  connectores, i catalitza el primer pas de la reacció d'aminoacilació tot activant la serina en presència d'ATP-Mg<sup>+2</sup> i generant l'intermediari Ser-AMP (seril adenilat). La SRS no requereix activitat d'edició, ja que el centre catalític assegura l'especificitat per la serina; en primer lloc, gràcies a la mida reduïda de la cavitat on s'acomoda la serina (que permet l'exclusió d'aminoàcids de cadena lateral més llarga, com ara la treonina) i, en segon lloc, per la formació de dos ponts d'hidrogen entre el grup hidroxil de la serina i dos residus conservats dels motius 2 i 3 de la SRS (que permeten excloure els aminoàcids alanina i glicina) (Belrhali et al., 1994). El domini catalític de la SRS de diverses espècies pot sintetitzar el



**Figura 1.5** Estructura de la SRS mitocondrial de *B. taurus*. Es mostra un diagrama de l'estructura dimèrica de la BtSRS2. Cada monòmer es representa en un color diferent i, en negre, es marca el seril adenilat dins la cavitat de cada centre catalític. Adaptació de (Chimnarok et al., 2005) (PDB: 1WLE).

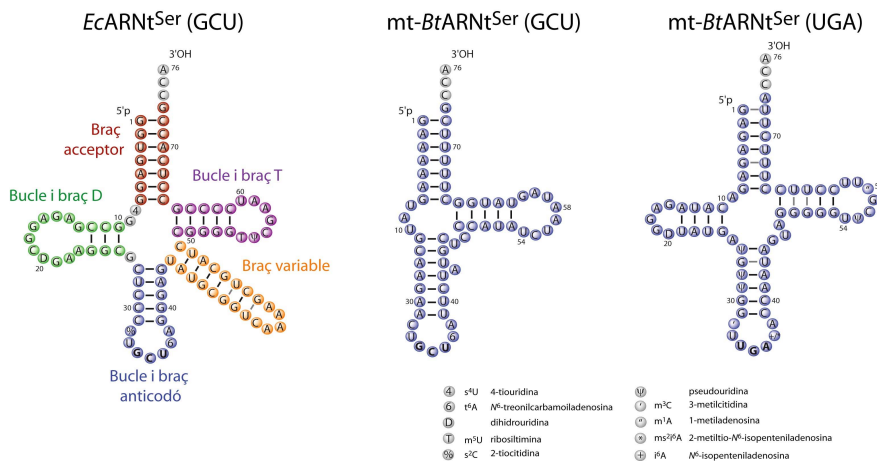
compost Ap<sub>4</sub>A, com ja s'ha esmentat a l'apartat 1.2.3. En diversos treballs se suggereix que la síntesi d'Ap<sub>4</sub>A té lloc per una reacció anàloga a la reacció inversa d'activació de l'aminoàcid. Una segona molècula d'ATP s'uniria a la SRS en complex amb el seril adenilat, en la mateixa posició que el primer ATP i, tot seguit, la reacció es desplaçaria en sentit invers, afavorint, així, la formació de serina i Ap<sub>4</sub>A (Plateau i Blanquet, 1994; Belrhali et al., 1995).

En el codi genètic estàndard, hi consten sis codons serina dividits en dos grups diferents: el grup format pels codons UCN (UCA, UCU, UCC i UCG) i el grup de codons AGY (AGU i AGC) que són descodificats per diversos isoacceptors d'ARNt<sup>Ser</sup>, mitjançant l'aminoacilació per part de la SRS. A més, existeix l'ARNt<sup>Sec</sup> que, després de ser aminoacilat per la SRS, permet la incorporació de selenocisteïna a proteïnes. La manca de consistència en els nucleòtids de l'anticodó dels ARNt<sup>Ser/Sec</sup> fa que la SRS sigui una de les poques aaRS que no reconeixen específicament la regió de l'anticodó. Com ja hem mencionat, la SRS no té el domini C-terminal d'interacció amb l'anticodó de l'ARNt típic de les d'aaRS de classe IIa, sinó un domini N-terminal d'uns 90 residus en forma de *coiled-coil* (vegeu la figura 1.5), que està especialitzat en el reconeixement del braç variable singularment llarg de la majoria d'ARNt<sup>Ser</sup> (vegeu el panell esquerre de la figura 1.6). El braç variable és el principal element d'identitat dels ARNt<sup>Ser</sup> en els tres regnes de la vida (Lenhard et al., 1999). En procariotes, l'ARNt<sup>Tyr</sup> i l'ARNt<sup>Leu</sup> també posseeixen braços variables, però aquests presenten nucleòtids desaparellats a la seva base. La manca de nucleòtids desaparellats als braços variables dels ARNt<sup>Ser</sup>, que permeten una orientació determinada del

braç, i la presència d'insercions en el bucle D són elements crucials per a la discriminació dels ARNt per part de les SRS procariotes (Himeno et al., 1990; Asahara et al., 1993).

A part del braç variable, s'ha descrit que alguns nucleòtids del braç acceptor tenen un paper important en el reconeixement per part de la SRS en bacteris, i que la selectivitat de l'enzim es basa en l'estructura terciària característica de l'ARNt<sup>Ser</sup> (Sampson i Saks, 1993). El mecanisme de reconeixement es du a terme en dues etapes: en primer lloc, es produeix el reconeixement

inicial de l'ARNt<sup>Ser</sup>, que depèn de la interacció entre el braç helical d'una subunitat de l'enzim i el braç variable de l'ARNt<sup>Ser</sup> i, en segon lloc, s'efectua la correcta orientació de l'extrem 3' de l'ARNt<sup>Ser</sup> al domini catalític de l'altra subunitat de la SRS, amb la intervenció del bucle del motiu 2 de l'enzim (Biou et al., 1994). En eucariotes, es proposa que els centres catalítics de les SRS actuen



**Figura 1.6** Característiques estructurals dels ARNt<sup>Ser</sup>. S'ensenyen les estructures secundàries en forma de fulla de trèvol de diversos ARNt<sup>Ser</sup>. A l'esquerra es representa l'ARNt<sup>Ser</sup> (GCU) d'*E. coli*, d'estructura canònica, amb les diferents regions indicades en colors i a la dreta es mostren els dos isoacceptors mitocondrials atípics d'ARNt<sup>Ser</sup> de *B. taurus*. A la part inferior se simbolitza la llegenda de modificacions posttranscripcionals dels ARNt representats.

estructuralment i funcionalment de manera semblant als seus homòlegs bacterians (Lenhard et al., 1997), tot i així, s'han trobat diferències en els elements de discriminació dels ARNt<sup>Ser</sup> per part de la SRS. En llevats, s'ha descrit la interacció entre el braç variable i la SRS, però no s'ha determinat la implicació del braç acceptor en el reconeixement per part de la SRS. En canvi, es proposa que el braç acceptor de l'ARNt<sup>Ser</sup> sí que està involucrat en la discriminació dels ARNt<sup>Ser</sup> per part d'altres aaRS, per tal d'evitar l'aminoacilació inespecífica d'aquests (Dock-Bregeon et al., 1990; Himeno et al., 1990). Mentre que en *E. coli* la discriminació entre els ARNt que posseeixen braços variables per part de la SRS depèn de l'estructura terciària d'aquests, en llevats el rebuig de l'ARNt<sup>Leu</sup> és dependent de seqüència (Soma et al., 1996; Himeno et al., 1997). En humans, l'element principal de discriminació és el braç variable llarg, el reconeixement del qual depèn de la seva orientació i no de la seqüència (Wu i Gross, 1993). El braç acceptor, incloent-hi la base discriminatòria G73, és un altre element de discriminació entre l'ARNt<sup>Ser</sup> i l'ARNt<sup>Leu</sup> (Breitschopf i Gross, 1994).

En metazous, la SRS és un dels enzims que es manté duplicat a la cèl·lula: una isoforma funciona al citoplasma i una altra actua al mitocondri, on ha de reconèixer les estructures atípiques dels ARNt<sup>Ser</sup> d'aquest orgànu (Steinberg et al., 1994; Juhling et al., 2009) (vegeu el panell dret de la figura 1.6). Els dos isoacceptors mitocondrials no presenten una seqüència consens aparent,



tenen una configuració caracteritzada per un braç anticodó extens i els manca el braç variable elongat típic de la resta d'ARNt<sup>Ser</sup>, considerat el principal element d'identitat dels ARNt<sup>Ser</sup>. Als ARNt<sup>Ser</sup> (GCU) mitocondrials els manca el bucle i el braç D. Les SRS mitocondrials d'animals, alternativament, reconeixen nucleòtids del bucle T de cada isoacceptor i la interacció entre els bucles D i T (G19-C56) té un rol essencial en el reconeixement de l'ARNt<sup>Ser</sup> (UGA) mitocondrial, fet que suggereix l'existència de mecanismes diferents per al reconeixement de cada isoacceptor mitocondrial (Shimada et al., 2001). Estudis estructurals de la SRS mitocondrial de *B. taurus* posen de manifest tres regions úniques implicades en el reconeixement d'aquests ARNt<sup>Ser</sup> anormals: una extensió C-terminal, una hèlix distal a l'extrem N-terminal i un seguit de residus carregats positivament al braç helical. El model proposat de reconeixement consisteix en el contacte de l'hèlix distal i de l'extensió C-terminal amb la cara del solc major del braç acceptor dels ARNt<sup>Ser</sup>, mentre que la regió positiva del braç helical s'aproximaria per la cara oposada. Així com l'extensió C-terminal està implicada en el reconeixement de tots dos isoacceptors, diferents residus de l'hèlix distal i del braç helical són essencials per al reconeixement dual d'un o altre isoacceptor de manera específica (Chimnarok et al., 2005). Així doncs, sembla que l'escurçament del braç variable dels ARNt<sup>Ser</sup> mitocondrials es veu compensat evolutivament per l'adquisició de l'hèlix distal i l'extensió C-terminal per part de les SRS mitocondrials, produint-se, així, la modificació dels elements d'identitat implicats en el procés de reconeixement dels ARNt<sup>Ser</sup>.

### 1.3 EL MITOCONDRI

Els mitocondris són orgànuls presents en totes les cèl·lules nucleades eucariotes que transformen energia per tal d'impulsar reaccions cel·lulars, per això la integritat mitocondrial és essencial per a la vida, i el trastorn de la seva funció pot veure's traduït en malaltia i, fins i tot, en mort. En aquest treball, es pretén estudiar els efectes de la depleció de dues proteïnes de *D. melanogaster* de localització mitocondrial en la morfologia i en la funció de l'orgànul.

#### 1.3.1 Origen del mitocondri

En general, les dades que provenen de seqüències i d'estructures moleculars permeten establir relacions evolutives més informatives i reveladores que les clàssiques dades fenotípiques utilitzades inicialment per a la classificació taxonòmica (Woese et al., 1990). La informació molecular emprada per tal de realitzar anàlisis comparatives prové de gens conservats en tots els organismes, com ho són els que estan involucrats en la traducció genètica. Els ARNr s'han considerat les molècules de preferència per a l'estudi de les relacions evolutives entre organismes, degut a la seva distribució universal, al seu manteniment funcional, a la reduïda taxa de canvi de seqüència i a la seva facilitat de seqüenciament (Fox et al., 1980). Les dades que provenen d'estudis amb ARNr estan en consonància amb resultats d'anàlisis filogenètiques realitzades amb altres elements implicats en la transcripció i la traducció genètica (Woese, 2002), i permeten construir un arbre de la vida amb un ancestre comú, dividit en tres grans dominis: els eubacteris, els arqueobacteris i els eucariotes (Woese i Fox, 1977; Woese et al., 1990; Woese, 2002). En la majoria d'anàlisis filogenètiques es veu representada una branca que separa els eubacteris del grup d'arqueobacteris/eucariotes, fa més de 3.000 milions d'anys, seguida d'una segona separació dels arqueobacteris i els eucariotes, fa més de 1.600 milions d'anys (Brown i Doolittle, 1995).

Tot i que l'origen de la cèl·lula eucariota és, encara, motiu de controvèrsia, nombrosos estudis filogenètics recolzen la teoria que aquesta és el producte d'una sèrie de processos endosimbiòtics produïts a través d'evolució horitzontal, per la fusió, o fusions, entre una cèl·lula arqueobacteriana i una cèl·lula eubacteriana (Sagan, 1967; Margulis, 1981; Cavalier-Smith, 1987; Margulis, 1993). En general, es considera que el mitocondri actual té un origen monofilètic, que prové d'un ancestre eubacterià de vida lliure (protomitocondri) que va ser captat per una cèl·lula hoste, tot i així, l'origen d'aquesta última encara està en ple debat (Gray et al., 1999; Davidov i Jurkevitch, 2009). Diferents hipòtesis intenten explicar com l'ancestre mitocondrial va envair i evitar l'eliminació per part de l'hoste. Algunes d'aquestes teories postulen que l'origen dels eucariotes i dels mitocondris es donà de manera simultània, quan un arqueobacteri metanogènic es fusionà amb un  $\alpha$ -Proteobacteri metanotròfic amb l'objectiu d'obtenir compostos essencials per al metabolisme en condicions d'anòxia, com l'hidrogen (Martin i Muller, 1998). Una altra teoria proposa que la simbiosi tingué lloc entre un proteobacteri aerobi i un hoste anaerobi per tal de sobreviure a la presència d'oxigen (Andersson et al., 2003).

Posteriorment, tingué lloc un segon procés d'endosimbiosi, en què l'eucariota mitocondriat captà un cianobacteri ancestral, tot constituint els plastidis dels organismes fotosintètics actuals (Dyall et al., 2004).

Pel seu estat en endosimbiosi, els protomitocondris van anar reduint progressivament el contingut del seu genoma, mitjançant la transferència de molts dels seus gens al genoma nuclear de l'hoste i l'eliminació d'enzims redundants (Gray et al., 1999). Actualment, la majoria de les proteïnes mitocondrials estan codificades al genoma nuclear, mentre que el genoma mitocondrial tan sols conserva un reduït nombre de gens que codifiquen proteïnes involucrades en la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa, alguns ARNt i ARNr.

### 1.3.2 Estructura, biogènesi i transport de proteïnes mitocondrials

Els mitocondris són estructures intracel·lulars que s'associen formant xarxes complexes. Segons la demanda energètica, la densitat mitocondrial pot variar d'un teixit a un altre. Així, les neurones, el múscul esquelètic i el cardíac són rics en mitocondris. Els mitocondris estan delimitats per un sistema de doble membrana, format per la MME (membrana mitocondrial externa) i la MMI (membrana mitocondrial interna), que ocasionalment conflueixen formant punts de contacte. Aquestes dues membranes delimiten dos compartiments diferents: la matriu mitocondrial, que conté un elevat nombre d'enzims relacionats amb el metabolisme mitocondrial, proteïnes implicades en l'expressió de l'ADNmt, ARNt, ARNr i nombroses còpies del genoma mitocondrial; i l'espai intermembrana, que conté proteïnes involucrades amb la fisiologia, amb la mort cel·lular o amb la producció d'energia. La MME té una estructura simple i és permeable a molècules petites i ions. La MMI, en canvi, funciona com una barrera entre la matriu mitocondrial i el citoplasma i, també, com un esquelet on s'acomoden els complexos de la cadena respiratòria. L'elevada proporció del fosfolípid cardiolipina a la MMI fa que aquesta sigui impermeable als ions, i la presència de diverses proteïnes de transport permeten la permeabilitat selectiva a petites molècules necessàries per al metabolisme mitocondrial. La MMI inclou dues regions: la IBM (*inner boundary membrane*; membrana fronterera interna) adjacent a la MME, i la CM (*crystae membrane*; membrana en forma de crestes), que correspon a les invaginacions de la MMI dins la matriu mitocondrial, la qual es troba unida a la IBM a través de les CJ (*crystae junctions*; unions de crestes) (Zick et al., 2009). L'estructura de les crestes mitocondrials en forma de xarxes lamel·lars o tubulars varia segons el teixit, els processos de fusió i fissió, la interacció amb altres components cel·lulars i la composició de proteïnes i lípids de la MMI. A part, hi ha evidències en la literatura científica que la topologia de la MMI té una estreta relació amb la funció mitocondrial (Mannella, 2006). La regió CM és la zona de localització preferent de proteïnes implicades en l'OXPPOS (Gilkerson et al., 2003), en la biogènesi de centres de ferro/sulfur, en la síntesi proteica i en el transport de proteïnes codificades per l'ADNmt. En canvi, la regió IBM està enriquida en proteïnes vinculades a processos de fusió i de transport de proteïnes codificades al nucli (Vogel et al., 2006). La

morfologia mitocondrial està relacionada amb l'estat bioenergètic de la cèl·lula com, per exemple, l'arranjament dels complexos de la cadena respiratòria que contribueix a la integritat estructural del mitocondri (Schneider i Hogeboom, 1951), o bé la convolució de la MMI que produeix un increment de la capacitat de l'OXPPOS (Palade, 1953). L'organització supramolecular de la proteïna  $F_1-F_0$ -ATPasa (ATP sintasa), implicada en la síntesi d'ATP, s'ha relacionat amb la determinació de la morfologia de les crestes mitocondrials (Allen, 1995; Paumard et al., 2002). Cal assenyalar que, recentment, s'han observat defectes estructurals de la MMI en cèl·lules de *Drosophila* que tenen una subunitat de la  $F_1-F_0$ -ATPasa mutada (Celotto et al., 2006). Se suggereix que la dimerització i l'oligomerització de la  $F_1-F_0$ -ATPasa produeixen una certa curvatura de la CM que podria augmentar el gradient de pH, i d'aquesta manera, la  $F_1-F_0$ -ATPasa optimitzaria el seu funcionament (Strauss et al., 2008). A més, s'ha evidenciat que l'estabilitat d'aquests supercomplexos afecta el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), fet que suggereix un possible rol en l'organització de microdominis de complexos OXPPOS dins la MMI (Bornhovd et al., 2006).

La biogènesi mitocondrial consisteix en una sèrie de processos cel·lulars involucrats en la formació de nous mitocondris, que inclouen la replicació i l'expressió de l'ADNmt. Com ja s'ha descrit a l'apartat 1.3.1, el mitocondri prové d'un ancestre bacterià, fet que queda palès per la presència d'un genoma propi, l'ADNmt. El genoma mitocondrial és un ADN circular de cadena doble similar a l'ADN bacterià primitiu (Leblanc et al., 1997) que es troba en un elevat nombre de còpies formant agrupacions d'ADN anomenades nucleoides. Aquestes estructures no estan protegides per histones, però s'han identificat proteïnes associades a elles que tenen un rol essencial en el manteniment de l'ADNmt, com ara Twinkle (Spelbrink et al., 2001) o el factor de transcripció mtTFA (Diffley i Stillman, 1991; Larsson et al., 1998).

Generalment, el genoma mitocondrial es transmet per herència materna, no presenta introns ni extenses regions intergèniques, té gens solapats, utilitza un codi genètic diferent de l'universal (consulteu la figura 1.2) (Clayton, 2000) i, en animals, codifica 22 ARNt, 2 ARNr (12S i 16S) i 13 polipèptids estructurals que formen part del sistema OXPPOS. La resta de subunitats de l'OXPPOS, les proteïnes involucrades en el manteniment de l'ADNmt, en el transport de proteïnes a l'òrganul, en la síntesi de pèptids mitocondrials, etc. són codificades al genoma nuclear, traduïdes als ribosomes del citoplasma i transportades al compartiment mitocondrial. Així doncs, la biogènesi mitocondrial requereix una estreta sincronització entre l'expressió de proteïnes mitocondrials codificades al nucli i al mitocondri (Garesse i Vallejo, 2001).

El genoma mitocondrial es replica i es transcriu dins l'òrganul, amb la participació d'elements nuclears com ara l'ADN polimerasa  $\gamma$ , l'ARN polimerasa mitocondrial i diversos factors de regulació de la replicació, de la transcripció i del processament de l'ARNmt.

La replicació de l'ADNmt és un procés lent que té lloc contínuament al llarg del cicle cel·lular i, tot i que, en general, es considera que ocorre de manera independent de la replicació de l'ADNn, en *Drosophila* s'ha descrit que pot estar-hi vinculat (Ruiz De Mena et al., 2000).

Tradicionalment es considera que, en animals, les dues cadenes d'ADNmt, anomenades H (*heavy*) i L (*light*) segons la seva densitat, són replicades asincrònicament i asimètricament per l'ADN polimerasa  $\gamma$ . L'inici de la replicació té lloc a l'origen de replicació de la cadena H ( $O_H$ ), localitzat a la regió anomenada bucle D i procedeix de forma unidireccional fins arribar a l'origen de replicació de la cadena L ( $O_L$ ), situada a dos terços de distància de l' $O_H$ , que inicia la seva replicació en sentit oposat (Clayton, 1982). Hi ha la possibilitat que altres polimerases participin en la replicació o reparació de l'ADNmt en alguns organismes (Nielsen-Preiss i Low, 2000), així com diversos components estructurals, helicases i topoisomerases. Recentment s'ha determinat un nou origen de replicació a la cadena H en algunes línies cel·lulars humanes, fet que suggereix un possible mecanisme de replicació bidireccional (Fish et al., 2004).

L'ADNmt de mamífers conté tres promotors: L,  $H_1$  i  $H_2$ , situats a la regió del bucle D. La transcripció de la cadena H de l'ADNmt comença en dos llocs,  $IT_{H_1}$  i  $IT_{H_2}$ , mentre que la de la cadena L s'inicia en un sol lloc,  $IT_L$  (Montoya et al., 1982). Els transcrits sintetitzats des de  $IT_L$  i  $IT_{H_2}$  són policistrònics i contenen pràcticament tota la cadena L i H, respectivament (Taanman, 1999). Aquest ARN policistrònic és processat posteriorment, donant lloc als ARNm, amb els ARNt que actuen com a signes de puntuació (Ojala et al., 1981). La funció principal del promotor  $H_1$  és la síntesi regulada dels dos ARNr. L'ARN polimerasa mitocondrial és inespecífica, per això requereix la presència dels factors de transcripció mtTFA, que confereix especificitat a la transcripció, i mtTFB. El mecanisme de traducció dels 13 polipèptids codificats per l'ADNmt s'ha explicat a l'apartat 1.1.3.

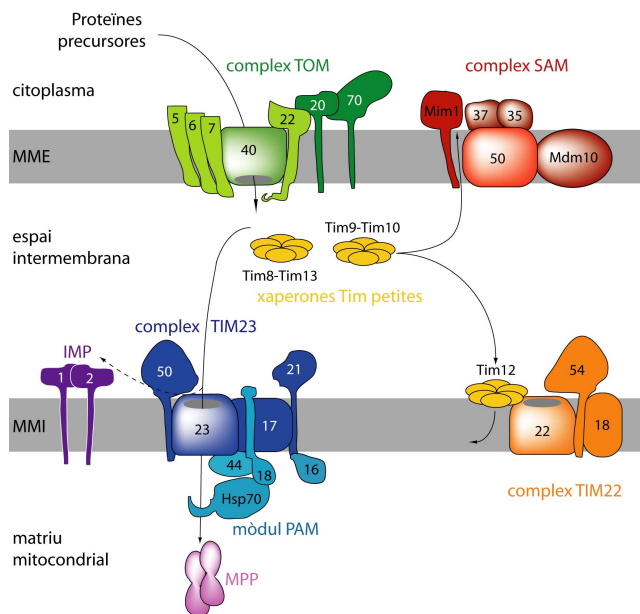
Com s'ha esmentat anteriorment, gran part de les proteïnes mitocondrials són codificades al genoma nuclear, entre elles, totes les proteïnes involucrades en la traducció genètica mitocondrial. El correcte transport d'aquestes proteïnes a l'orgànul és essencial per a la biogènesi i funció mitocondrials.

L'import de proteïnes al mitocondri es considera que té lloc en un 99% de manera posttraduccional (Wickner i Schekman, 2005), és a dir, la traducció de la proteïna sencera és completada abans que aquesta s'uneixi al sistema d'import al mitocondri. Mentrestant, la proteïna es manté desplegada i estabilitzada per xaperones. Tanmateix, estudis recents suggereixen que un percentatge de proteïnes són transportades al mitocondri de manera cotraduccional, és a dir, que la traducció i l'import tenen lloc simultàniament (Ahmed i Fisher, 2009).

La informació que permet el transport de proteïnes al mitocondri depèn de la destinació final d'aquestes (Dolezal et al., 2006). Les proteïnes de matriu mitocondrial normalment posseeixen una preseqüència N-terminal, també anomenada pèptid de senyalització mitocondrial, que pot variar en longitud i seqüència, però és capaç de formar una hèlix  $\alpha$  amfipàtica carregada positivament. Els senyals d'import de proteïnes a la MME, en alguns casos, consisteixen en una preseqüència N-terminal similar a la ja esmentada, no processable, seguida d'una extensió hidrofòbica que permet l'arrest específic de la proteïna a la MME; en altres casos, aquestes

proteïnes presenten una extensió C-terminal o dos dominis transmembrana d'ancoratge a la MME; i, per últim, en les proteïnes en forma de barril  $\beta$  de la MME no s'evidencia cap tipus de senyal d'import. Algunes proteïnes de la MMI presenten una preseqüència N-terminal processable seguida d'una extensió hidrofòbica d'ancoratge a la MMI, mentre que altres proteïnes posseeixen el senyal d'import en posicions internes de la proteïna. Les proteïnes de l'espai intermembrana normalment tenen dos senyals de transport processables: una preseqüència canònica d'import a la matriu mitocondrial seguida d'una extensió hidrofòbica.

Totes les proteïnes mitocondrials, independentment del tipus de pèptid de senyalització, són reconegudes per receptors de la superfície mitocondrial del complex TOM (vegeu la figura 1.7). Aleshores, les proteïnes desplegadas són translocades a través de la MME en sentit N-  $\rightarrow$  C-terminal per mitjà del canal format per la proteïna Tom40. Un cop les proteïnes es troben a l'espai intermembrana, la ruta d'import a la localització de destí segueix una de les quatre vies de transport descrites en animals i fongs (Bolender et al., 2008) (consulteu la figura 1.7):



**Figura 1.7 Transport de proteïnes al mitocondri.** Es mostren les quatre rutes d'import de proteïnes mitocondrials que tenen lloc en animals i fongs (Dolezal et al., 2006).

- Les proteïnes de localització a la MME, que inclouen aquelles en forma de barril  $\beta$ , interaccionen amb xaperons Tim petites (complexos Tim9-Tim10 i Tim8-Tim13) i, seguidament, són integrades a la MME mitjançant el complex SAM.

- Les proteïnes de la matriu mitocondrial, quan es troben a l'espai intermembrana, són reconegudes i unides a membres del complex TIM23. El potencial de membrana activa la proteïna formadora de canal Tim23 i, seguidament, el mòdul PAM (*presequence translocase associated motor*; motor associat a translocasa dependent de preseqüència), que conté les proteïnes Hsp70, Tim44, Pam16, Pam17 i Pam18, s'uneix a la proteïna en

trànsit i la dirigeix a la matriu, amb consum d'ATP. Un cop les proteïnes han assolit la matriu mitocondrial, la preseqüència és processada per la MPP (*mitochondrial processing peptidase*; peptidasa de processament mitocondrial).

- Les proteïnes de MMI que contenen seqüències de senyalització internes, quan han arribat a l'espai intermembrana, interaccionen amb xaperons Tim petites que les dirigeixen a un complex de xaperons modificat, situat a la superfície externa del complex TIM22. Aquest complex conté la proteïna formadora de canal Tim22, que introdueix les proteïnes precursors a la MMI de manera dependent de potencial de membrana. Les proteïnes que presenten una preseqüència N-terminal processable seguida d'una extensió hidrofòbica inicialment segueixen la



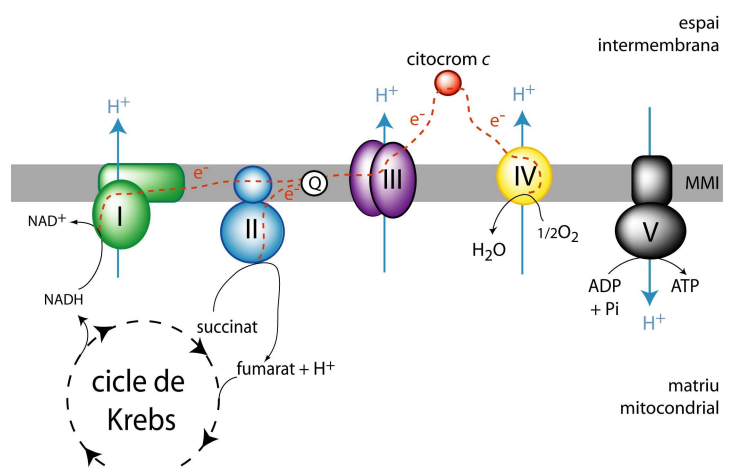
mateixa ruta que les proteïnes de matriu, via TIM23 i, posteriorment, el senyal hidrofòbic bloca la translocació i indueix l'alliberament lateral de la proteïna a la fase lipídica de la MMI.

- Algunes proteïnes de l'espai intermembrana són transportades mitjançant la ruta TIM23. Un cop la preseqüència es troba a la matriu és processada per la MPP. En lloc d'interaccionar amb la Hsp70 mitocondrial, Tim17 indueix l'alliberament lateral des del canal Tim23 i l'extensió hidrofòbica és processada per la IMP (*inner membrane peptidase*; peptidasa de membrana interna), que permet l'alliberament de la proteïna a l'espai intermembrana. Altres proteïnes petites i riques en ponts disulfur, com ara el citocrom *c*, són transportades a través d'una via alternativa que depèn d'un complex específic de la MMI.

### 1.3.3 Funció metabòlica del mitocondri

Els mitocondris són orgànuls que aprofiten l'energia amb finalitats biològiques, mitjançant el procés d'acoblament quimiostàtic que té lloc gràcies a la cadena transportadora d'electrons, també anomenada cadena respiratòria, localitzada a la MMI (Berg et al., 2007). Aquest procés, a grans trets, s'inicia quan l' $\text{NAD}^+$  (*nicotinamide adenine dinucleotide*; dinucleòtid adenina-nicotinamida) reduït (NADH) transfereix els seus electrons altament energètics a la cadena transportadora d'electrons i, a mesura que els electrons avancen a través d'ella, aquests baixen a nivells energètics inferiors fins que són

transferits a l'oxigen molecular, l'acceptor final d'electrons (vegeu la figura 1.8). El flux d'electrons entre els elements que configuren la cadena respiratòria allibera energia en forma d'un gradient electroquímic de protons a través de la membrana. Aquest gradient s'utilitza per tal d'impulsar reaccions catalitzades per enzims situats a la membrana, com ho fa la  $\text{F}_1\text{-F}_0\text{-ATPasa}$  per tal de produir ATP a partir d'ADP (*adenosine diphosphate*; adenosina difosfat) i fosfat (Saraste, 1999).



**Figura 1.8 Cadena transportadora d'electrons i OXPHOS.** Esquema dels elements implicats i de la seqüència de processos que tenen lloc al llarg de la cadena respiratòria i la síntesi d'ATP.  $e^-$  simbolitza electrons i  $\text{H}^+$ , protons.

La cadena respiratòria consta de quatre grans complexos proteics formats per diverses subunitats, codificades tant al genoma nuclear com al mitocondrial. Tres d'aquests complexos són capaços de transportar electrons i bombar protons a l'espai intermembrana: l' $\text{NADH-Q-oxidoreductasa}$  (complex I), la  $\text{Q-citocrom c-oxidoreductasa}$  (complex III o  $\text{bc}_1$ ) i la  $\text{citocrom c-oxidasa}$  (complex IV). El quart complex anomenat  $\text{succinat-Q-reductasa}$  (complex II), que forma part del cicle de Krebs, és codificat al nucli i no té la capacitat d'impulsar protons. En el

transport entre complexos també hi intervenen transportadors electrònics, com ara el coenzim Q (ubiquinona) o el citocrom c.

En primer lloc, els dos electrons de l'NADH entren a la cadena a través del complex I. On, inicialment, passen pel grup prostètic FMN (*flavin mononucleotide*; mononucleòtid de flavina), que és reduït a FMNH<sub>2</sub> i, seguidament, flueixen a través de centres de ferro/sulfur fins a arribar al coenzim Q. Aquest procés permet bombar quatre protons a l'espai intermembrana. En segon lloc, la succinat deshidrogenasa del complex II oxida el succinat a fumarat tot produint FAD (*flavin adenine dinucleotide*; dinucleòtid de flavina-adenina) reduït (FADH<sub>2</sub>). Els electrons de l'FADH<sub>2</sub> es transmeten a través de centres de ferro/sulfur fins al coenzim Q, que es redueix formant ubiquinol, per a finalment entrar a la cadena de transport d'electrons. Aquest pas no produeix impuls de protons. En tercer lloc, el complex III catalitza la transferència d'electrons des de l'ubiquinol al citocrom c, que és una hemoproteïna hidrosoluble de l'espai intermembrana. Aquesta reacció està acoblada a la generació d'un gradient de protons a través de la membrana, mitjançant l'anomenat cicle Q. L'ubiquinol és un component mòbil dins la membrana, que està sotmès a reaccions organitzades de protonació i desprotonació que generen un transport de protons a través de la membrana (Mitchell, 1975). En quart lloc, el complex IV, que conté dos grups hemo i tres ions coure, transfereix electrons des de la forma reduïda del citocrom c fins a l'acceptor final, és a dir, l'oxigen molecular (O<sub>2</sub>), que és completament reduït formant aigua, mentre que alhora es bomben protons a l'espai intermembrana.

Recentment s'ha descrit que els complexos de la cadena respiratòria poden organitzar-se en estructures supramoleculares que afavoreixen la canalització dels substrats, l'estimulació catalítica, l'estabilitat dels complexos i el segrest d'intermediaris (Schagger i Pfeiffer, 2000).

La fosforilació oxidativa (OXPHOS) és el procés mitjançant el qual es forma ATP com a resultat del gradient electroquímic entre la MMI i l'espai intermembrana, fruit de la transferència d'electrons a través de la cadena respiratòria fins a l'O<sub>2</sub> i de l'impuls de protons a través de la MMI (consulteu la figura 1.8) (Mitchell, 1961). Es genera una força protomotriu que consisteix en un gradient de pH, bàsic a la cara de la matriu, i un potencial de membrana, negatiu a la cara de la matriu. El flux de protons que són retornats a la matriu mitocondrial mitjançant la F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPasa, també anomenada complex V, impulsa la síntesi d'ATP per part d'aquesta. La F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPasa consta de dos subcomplexos, F<sub>0</sub> i F<sub>1</sub>, i té la capacitat de formar dímers i oligòmers que influeixen en l'estructura de les crestes mitocondrials (Paumard et al., 2002). El subcomplex hidrofòbic F<sub>0</sub> es troba inserit a la MMI i canalitza de nou els protons a l'interior de la matriu mitocondrial. El subcomplex F<sub>1</sub>, orientat cap a la matriu mitocondrial, està format per les subunitats α<sub>3</sub>, β<sub>3</sub>, γ, δ i ε i catalitza la síntesi d'ATP a partir d'ADP i fosfat. L'enzim opera mitjançant catàlisi rotacional, de manera que l'entrada de protons subministra la força necessària per a la rotació de la subunitat γ, respecte a la subunitat β, que té com a finalitat la síntesi i l'alliberació de l'ATP.



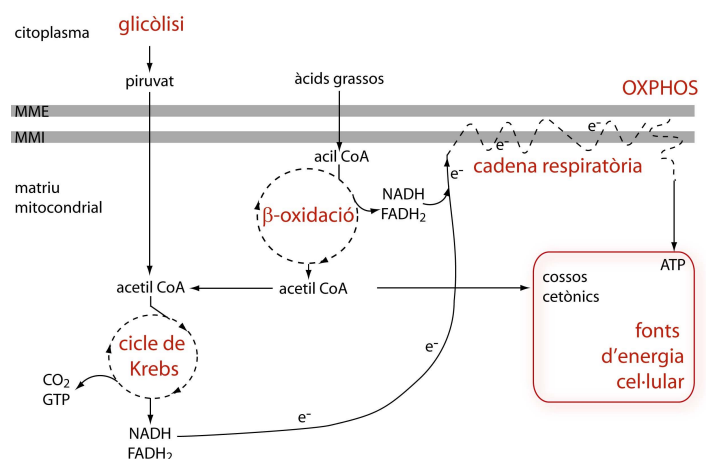
El mitocondri és una de les principals fonts de ROS (*reactive oxygen species*; espècies reactives d'oxigen o radicals lliures), com a conseqüència de la generació d'electrons desaparellats per part de la cadena respiratòria i l'OXPHOS. La interacció d'aquests electrons amb l'O<sub>2</sub> es tradueix en la producció d'ions superòxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), altament reactius, que poden ser convertits en altres espècies, com ara els ions hidroxil (OH<sup>-</sup>) o el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'acumulació de ROS provoca danys a les membranes cel·lulars i a l'ADN, molt especialment a l'ADNmt que no està proveït d'histones que el protegeixin, per això el mitocondri posseeix defenses antioxidants, com ara el glutatió, una variant de la superòxid dismutasa o la catalasa, que actuen per eliminar l'excés de ROS (Duchen, 2004).

A part de la cadena respiratòria i l'OXPHOS, el mitocondri acull el cicle de Krebs, també anomenat cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de l'àcid cítric, que subministra substrats reduïts a la cadena transportadora d'electrons (consulteu la figura 1.9). Aquesta via consta d'un seguit d'enzims, la majoria dels quals estan situats a la matriu mitocondrial, que converteixen l'acetil CoA, que procedeix d'hidrats de carboni i de lípids, en diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) i GTP. El cicle de Krebs, a més, proporciona precursors per a processos de biosíntesi de nucleòtids, proteïnes i grups hemo (Berg et al., 2007).

Per tal que el cicle s'iniciï són necessaris substrats que provenen de la β-oxidació mitocondrial d'àcids grassos o de la glicòlisi citoplasmàtica (vegeu la figura 1.9). Així doncs, la piruvat deshidrogenasa és l'enzim que enllaça la glicòlisi amb el cicle de Krebs, mitjançant la descarboxilació oxidativa del piruvat per formar acetil CoA. L'acetil CoA i l'oxalacetat són condensats donant lloc, així, al citrat, que isomeritza a isocitrat. Seguidament,

mitjançant dues descarboxilacions oxidatives es genera 2-oxoglutarat i, després, succinil CoA que, posteriorment, dona lloc al succinat. El succinat és oxidat a fumarat, i aquest és hidratat tot formant malat. Finalment, el malat s'oxida a oxalacetat. Les diferents reaccions d'oxidació i reducció del cicle de Krebs transfereixen electrons a molècules d'NAD<sup>+</sup> i d'FAD que, un cop reduïdes, entren a la cadena respiratòria tot proporcionant electrons.

La ruta de la β-oxidació dels àcids grassos també té lloc al mitocondri (Kennedy i Lehninger, 1949) (vegeu la figura 1.9). Els àcids grassos s'activen a la MME per unió al coenzim A i generen acil CoA, que travessa la MMI per conjugació amb la carnitina. A la matriu mitocondrial, l'acil CoA entra a la ruta de la β-oxidació, que consta de quatre etapes (Berg et al., 2007): oxidació



**Figura 1.9 Vies metabòliques mitocondrials.** Diagrama integrador de les principals rutes metabòliques del mitocondri: cicle de Krebs, β-oxidació dels àcids grassos, cadena respiratòria i fosforilació oxidativa (OXPHOS). e<sup>-</sup> simbolitza electrons.

per l'FAD, hidratació, oxidació per l' $\text{NAD}^+$  i tiòlisi pel coenzim A. L' $\text{FADH}_2$  i l' $\text{NADH}$  alliberats de les reaccions d'oxidació d'aquesta via transfereixen electrons a la cadena respiratòria, mentre que l'acetil CoA que es genera en l'etapa de tiòlisi s'incorpora normalment al cicle de Krebs. Tot i així, quan hi ha una acumulació d'acetil CoA a la matriu mitocondrial a causa d'una limitada disponibilitat d'oxalacetat, aquest acetil CoA es desvia per tal de formar cossos cetònics. Aquestes molècules són transportades a través de la sang fins al cervell o al cor, on són utilitzades com a font d'energia alternativa a la glucosa. La ruta de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos insaturats requereix la participació de dos enzims addicionals, una isomerasa i una reductasa, que manipulen els enllaços dobles que presenten aquest tipus d'àcids grassos. Els àcids grassos de cadena senar, en lloc de produir acetil CoA en la darrera etapa d'oxidació, generen propionil CoA.

A part de les principals vies metabòliques explicades fins ara, el mitocondri participa de manera parcial en altres vies, que tenen lloc en gran mesura al citoplasma (Modica-Napolitano i Singh, 2002). Per una banda, a la matriu mitocondrial es catalitza una de les reaccions del cicle de la urea: la síntesi de l'aminoàcid citrul·lina a partir d'ornitina. Per altra banda, l'oxalacetat que s'utilitza al citoplasma per a la gluconeogènesi es forma a la matriu mitocondrial per carboxilació del piruvat.

Per últim, cal mencionar que el mitocondri, a part de tenir un paper fonamental en el metabolisme cel·lular, està vinculat a processos addicionals, com ara la regulació del potencial de membrana, la mort cel·lular programada, la senyalització per calci o la regulació de la proliferació cel·lular.

### 1.3.4 Malalties hereditàries mitocondrials humanes

El paper essencial que desenvolupa el mitocondri dins la cèl·lula fa que el mal funcionament d'aquest orgànul doni lloc, des d'alteracions subtils que poden manifestar-se en forma de patologies lleus, fins a defectes severes que poden desembocar en greus malalties i en la mort. Algunes disfuncions mitocondrials estan relacionades amb casos d'isquèmia-reperfusió de cor, cervell i ronyó, malalties neurodegeneratives, com ara el Parkinson o l'Alzheimer, cardiomiopaties, diabetis o insuficiència multiorgànica i sèpsia. L'acumulació de defectes mitocondrials per la producció de ROS per part del mitocondri és considerat un fenomen clau en el dany cel·lular vinculat al procés d'envelliment. El funcionament inadequat de l'orgànul, per la seva implicació en la regulació de la mort cel·lular programada, a més, pot donar lloc a dany tissular o càncer (Duchen, 2004).

Les malalties hereditàries mitocondrials són un grup heterogeni de desordres causats per mutacions en gens de l'ADNmt o l'ADNn que codifiquen proteïnes, ARNt o ARNr relacionats amb la funció mitocondrial. Les característiques clíniques d'aquestes malalties són molt variables, fet

que dificulta el seu diagnòstic i tractament. Les primeres malalties mitocondrials humanes descrites, l'any 1988, van ser la KSS (*Kearns-Sayre syndrome*; síndrome de Kearns-Sayre), causada per extenses delecions d'ADNmt (Holt et al., 1988), i la LHON (*Leber hereditary optic neuropathy*; neuropatia òptica hereditària de Leber), fruit de mutacions puntuals en el genoma mitocondrial (Wallace et al., 1988). Des d'aleshores, s'han identificat centenars de mutacions relacionades amb patologies mitocondrials, tant a l'ADNmt com a l'ADNn (Ruiz-Pesini et al., 2007).

El desenvolupament d'aquest apartat se centrarà exclusivament en els trastorns relacionats amb la traducció genètica mitocondrial, per l'interès que suscita en la present tesi doctoral. En humans, les proteïnes que participen en la síntesi proteica mitocondrial provenen del genoma nuclear i són importades fins al mitocondri, en canvi, els ARNt i ARNr es codifiquen al genoma de l'orgànul.

Les patologies associades a mutacions en ARNt i ARNr mitocondrials es veuen influenciades per l'heteroplàsmia, és a dir, per la coexistència de poblacions d'ADNmt *wt* (*wild-type*; de tipus salvatge) i d'ADNmt mutant. Durant la divisió cel·lular els mitocondris es distribueixen a l'atzar entre les cèl·lules filles, de manera que la proporció d'ADNmt mutant pot variar entre teixits d'un mateix individu. Les mutacions somàtiques de l'ADNmt apareixen en molts casos per l'efecte dels ROS, i la manca de mecanismes eficients de reparació fa que aquestes s'acumulin amb l'edat. Durant l'oogènesi les molècules d'ADNmt són repartides en oòcits tot generant un ventall d'heteroplàsmia, fet que té implicacions importants en la transmissió de l'ADNmt mutant, així com en el grau d'expressió clínica de la malaltia en la descendència (Schapira, 2006). La manifestació de la patologia té lloc quan el nombre de còpies d'ADNmt mutant és el suficient per impedir el metabolisme energètic que permet el correcte funcionament d'un teixit, fenomen conegut com efecte llindar. Per això, tot i que els defectes de l'ADNmt poden afectar tot tipus de teixits, perjudiquen especialment aquells que tenen un alt requeriment energètic, com el múscul, el cor o el sistema nerviós. La connexió genotip-fenotip en les malalties de l'ADNmt és complexa, atès que una patologia pot ser deguda a diferents mutacions i una mutació pot correlacionar amb diverses malalties.

Els ARNt i ARNr mitocondrials tenen un paper clau en la traducció de les proteïnes mitocondrials que formen part de la cadena respiratòria, per això, en molts casos, mutacions en aquestes molècules estan connectades amb disfuncions metabòliques (vegeu la taula 1.1). Més del 50% de mutacions relacionades amb malalties humanes es concentren en gens d'ARNt, tot i que aquests gens només representen un 10% del genoma mitocondrial. Les mutacions més prevalents són l'A3243G en l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA), que provoca el 80% dels casos de MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*; miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidosi làctica i episodis similars a l'ictus) i l'A8344G en l'ARNt<sup>Lys</sup>, que és responsable del 80-90% de casos de MERRF (*myoclonic epilepsy and ragged red fibers*; epilèpsia mioclònica associada a fibres roges trencades).

La substitució A3243G en el gen de l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA) n'afecta l'estructura, l'estabilitat i l'eficiència d'aminoacilació (Park et al., 2003) i indueix la formació de complexos dimèrics que impedeixen l'adequada associació de l'ARNt a proteïnes. A part, la mutació inhibeix el correcte processament de l'intermediari ARN19, que conté els transcrits de l'ARNr 16S, l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA) i

gen	ARN	nombre de mutacions descrites	exemples de mutacions	patologies associades
MT-TA	ARNt <sup>Ala</sup>	5	G5591A i G5650A	MM
MT-TN	ARNt <sup>Asn</sup>	5	G5703A	CPEO i MM
MT-TR	ARNt <sup>Arg</sup>	3	G10406A; A10438G	MM; PEM
MT-TD	ARNt <sup>Asp</sup>	3	A7526G	MM
MT-TC	ARNt <sup>Cys</sup>	6	G5783A	sordesa
MT-TQ	ARNt <sup>Gln</sup>	6	G4332A	MELAS i encefalopatia
MT-TE	ARNt <sup>Glu</sup>	10	T14709C	DMDF+MM
MT-TG	ARNt <sup>Gly</sup>	5	GT10010C	PEM
MT-TH	ARNt <sup>His</sup>	3	G12147A	MELAS/MERRF
MT-TI	ARNt <sup>Ile</sup>	14	G4298A; A4300G	CPEO; MICM
MT-TK	ARNt <sup>Lys</sup>	17	A8344G i T8356C	MERRF
MT-TL1	ARNt <sup>Leu</sup> (UAA)	30	A3243G C3256T i T3271C A3260G i C3303T	MELAS, LS, CPEO, DMDF i MM MELAS MMC
MT-TL2	ARNt <sup>Leu</sup> (UAG)	10	G12315A	CPEO i KSS
MT-TM	ARNt <sup>Met</sup>	5	T4409C i G4450A	MM
MT-TF	ARNt <sup>Phe</sup>	9	G583A	MELAS i MM+EXIT
MT-TP	ARNt <sup>Pro</sup>	5	C15990T; A15965G	MM; susceptibilitat a PD
MT-TS1	ARNt <sup>Ser</sup> (UGA)	14	A7475G i 7472insC G7497A	SNHL MM i EXIT
MT-TS2	ARNt <sup>Ser</sup> (GCU)	6	C12258A G12207A C12246A	DMDF i SNHL MELAS/MERRF pseudoostrucció intestinal crònica amb miopatia i oftalmoplègia
MT-TT	ARNt <sup>Thr</sup>	9	G15950A	susceptibilitat a PD
MT-TW	ARNt <sup>Trp</sup>	11	5537insT i T5523G T5523G i G5521A	LS MM
MT-TY	ARNt <sup>Tyr</sup>	2	T5874G	EXIT
MT-TV	ARNt <sup>Val</sup>	5	G1606A	AMDF
MT-RNR1	ARNr 12S	39	A1555G i C1494T	DEAF
MT-RNR2	ARNr 16S	7	C3093G	MELAS

**Taula 1.1 Patologies causades per mutacions en gens d'ARNr i d'ARNt.** Informació recopilada de MITOMAP (Ruiz-Pesini et al., 2007). Abreviatures: AMDF (*ataxia, myoclonus and deafness*; atàxia, mioclonia i sordesa), CPEO (*chronic progressive external ophtalmoplegia*; oftalmoplègia externa progressiva crònica), DEAF (*maternally inherited deafness*; sordesa d'herència materna), DMDF (*diabetes mellitus+deafness*; diabetis+sordesa), EXIT (*exercise intolerance*; intolerància a l'exercici), ins (inserció), KSS (*Kearns-Sayre syndrome*; síndrome de Kearns-Sayre); LS (*Leigh syndrome*; síndrome de Leigh), MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*; miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidosi làctica i episodis similars a l'ictus), MERRF (*myoclonic epilepsy and ragged red fibers*; epilèpsia mioclònica associada a fibres roges trencades), MICM (*maternally inherited cardiomyopathy*; cardiomiopatia d'herència materna), MM (miopatia mitocondrial), MMC (*maternal myopathy and cardiomyopathy*; miopatia materna i cardiomiopatia), PD (*Parkinson's disease*; malaltia de Parkinson), PEM (*progressive encephalopathy*; encefalopatia progressiva) i SNHL (*sensorineural hearing loss*; pèrdua auditiva sensorineural).

l'ARNm del gen *ND1*. Es postula que l'intermediari de processament ARN19 mutant seria incorporat als mitoribosomes provocant-ne el blocatge. La simptomatologia de la malaltia associada a la mutació A3243G es pot explicar per l'ús de codons de l'ARNm *ND6*, que codifica una subunitat del complex I. El canvi A3243G impedeix la síntesi de la modificació taurina a la posició *wobble* de l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA), la qual cosa dificulta el reconeixement del codó UUG. L'ARNm *ND6* conté un 42,1% de codons leucina UUG, per consegüent, s'especula que la mutació impediria la correcta traducció de la subunitat *ND6* i, per tant, es veuria reduïda l'abundància de complex I a la cadena respiratòria, fet que concorda amb el fenotip associat a MELAS (Scheper et al., 2007b; Scaglia i Wong, 2008). En una soca de llevat amb mutacions a l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA) equivalents a les responsables de la malaltia MELAS en humans, els fenotips aberrants són complementats quan se sobreexpressa el factor

mtEF-Tu (Feuermann et al., 2003). A més, la mutació A3243G també és complementada per la LRS (leucil-ARNt sintetasa) mitocondrial humana sobreexpressada en híbrids transmitocondrials que contenen l'ADNmt mutant (Li i Guan, 2010). Aquests són dos exemples d'estudis que suposen un avenç en la recerca d'intervencions terapèutiques per a malalties mitocondrials.

La substitució A8344G en el gen de l'ARNt<sup>Lys</sup> afecta el seu nivell d'aminoacilació (Enríquez et al., 1995) i impedeix la formació de la modificació taurina del nucleòtid *wobble* de l'anticodó (Yasukawa et al., 2001), fet que es tradueix en una dèbil interacció codó-anticodó al ribosoma que desemboca en la terminació prematura de la traducció. Amb l'objectiu de desenvolupar possibles tractaments per a la malaltia, la mutació A8344G s'ha aconseguit complementar parcialment mitjançant el transport des del citoplasma de derivats de l'ARNt<sup>Lys</sup> citoplasmàtic de llevat. L'ARNt<sup>Lys</sup> exogen és aminoacilat, transportat, utilitzat en el procés de traducció mitocondrial i és capaç de restaurar parcialment les funcions mitocondrials afectades (Kolesnikova et al., 2004).

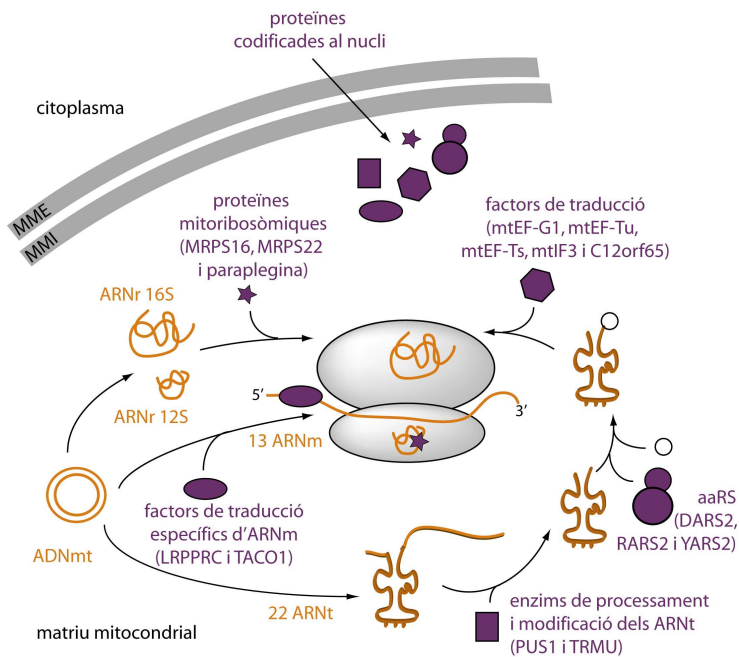
Pel que fa al sistema de serilació mitocondrial humana, nombroses mutacions en tots dos isoacceptors mitocondrials d'ARNt<sup>Ser</sup> s'han vinculat amb malalties, especialment les mutacions en el gen de l'ARNt<sup>Ser</sup> (UGA). La majoria de canvis puntuals en aquest gen desencadenen la malaltia SNHL (*sensorineural hearing loss*; pèrdua auditiva sensorineural), per exemple: les mutacions situades al límit entre el gen *CO1* i l'extrem 3' de l'ARNt<sup>Ser</sup> (UGA) comprometen l'estructura secundària del lloc 3' de processament de l'ARNt (Yan et al., 2006); o la inserció 7472insC trastorna la síntesi i l'aminoacilació de l'ARNt<sup>Ser</sup> (UGA) (Toompuu et al., 2002), la qual es pot manifestar en forma de SNHL, de fenotips similars a MERRF o de miopatia. La mutació G7497A en el mateix gen, no causa SNHL sinó MM (miopatia mitocondrial) i EXIT (*exercise intolerance*; intolerància a l'exercici) (Jaksch et al., 1998; Grafakou et al., 2003). En el gen de l'ARNt<sup>Ser</sup> (GCU) s'han determinat les substitucions: C12246A que genera pseudoobstrucció intestinal crònica amb miopatia i oftalmoplègia (Lauber et al., 1991), C12258A que, a part de produir SNHL, està relacionada amb el fenotip DMDF (*diabetes mellitus+deafness*; diabetis+sordesa) (Lynn et al., 1998) i G12207A que provoca fenotips similars a MELAS/MERRF (Wong et al., 2006).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el nucli codifica un ampli grup de proteïnes que funcionen al mitocondri, entre les quals hi ha: nombrosos components del metabolisme mitocondrial, les proteïnes de transport, els elements de manteniment, replicació i transcripció de l'ADNmt i totes les proteïnes implicades en la traducció a l'òrganul. Relacionades amb la traducció genètica mitocondrial, existeixen diverses mutacions associades a malalties en gens que donen lloc a factors de traducció d'ARNm específics, enzims de modificació dels ARNt mitocondrials, polipèptids dels mitoribosomes, factors de traducció generals i aaRS (vegeu la figura 1.10).

Entre els factors que participen en la traducció d'ARNm específics, hi ha l'LRPPRC, que està involucrat en la traducció i l'estabilització de l'ARNm *COX1*. La mutació A354V en la LRPPRC desencadena una variant de la síndrome de Leigh, fruit d'una expressió de proteïnes



mitocondrials limitada i d'uns nivells baixos dels ARNm de COXI i COXIII (Xu et al., 2004). Un altre exemple, és la inserció d'un nucleòtid en el gen *TACO1*, que codifica un factor activador de la síntesi de COXI, la qual provoca fenotips similars a la síndrome de Leigh i deficiència de l'activitat de la citocrom c-oxidasa (Weraarpachai et al., 2009).



**Figura 1.10** Procedència dels elements de traducció genètica mitocondrial associats a malalties humanes. S'exhibeixen de manera esquemàtica els components de síntesi proteica mitocondrial codificats a l'ADNmt (en groc) i de l'ADNn (en lila). Entre parèntesis s'indiquen exemples de proteïnes que presenten mutacions relacionades amb malalties mitocondrials. Adaptació actualitzada de (Jacobs i Turnbull, 2005).

Pel que fa a enzims de modificació dels ARNt, s'han descrit les mutacions R116W (Bykhovskaya et al., 2004) i E220X (Fernández-Vizarra et al., 2007) en la pseudouridina sintetasa humana (PUS1) que s'associen amb la malaltia MLASA (*mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia*; miopatia mitocondrial, acidosi làctica i anèmia sideroblàstica). La manca de pseudouridilació d'un o més ARNt mitocondrials sembla ser el mecanisme patogènic més plausible. Alguns individus amb insuficiència renal i acidosi làctica posseeixen diverses mutacions en el gen *TRMU*, que codifica un enzim que catalitza la 2-tiouridilació d'ARNt mitocondrials

(Zeharia et al., 2009).

En relació amb a formació dels mitoribosomes, s'ha detectat la mutació R111X en la proteïna MRPS16 (Miller et al., 2004), i la mutació letal R170H en la proteïna MRPS22 (Saada et al., 2007). Totes dues proteïnes, en condicions normals, s'associen amb l'ARNr 12S i formen part de la subunitat petita dels mitoribosomes. Les mutacions causen fenotips molt severos amb disfunció de la cadena respiratòria deguda a la inhibició de la traducció dels ARNm mitocondrials. Les MRP mutants provoquen una disminució de la quantitat d'ARNr 12S i un incorrecte acoblament de la subunitat petita del mitoribosoma (Haque et al., 2008). La paraplegina és una proteasa involucrada en l'escissió de la preseqüència de senyalització mitocondrial de la proteïna ribosòmica MRPL32. La paraplegia espàstica hereditària està provocada per mutacions en la paraplegina, que impliquen l'inadequat processament de la MRPL32 i l'incorrecte agrupament dels mitoribosomes (Casari et al., 1998).

Alguns individus que pateixen malalties severes molt variables simptomàticament i de mortalitat primerenca mostren mutacions en gens que codifiquen els factors d'elongació. La primera mutació identificada a l'mtEF-G1 (N174S) (Coenen et al., 2004) afecta un residu conservat i essencial per a la unió de GTP. Es prediu que la substitució té un efecte dràstic en la unió al nucleòtid i, en conseqüència, una pèrdua de la funció enzimàtica. Posteriorment, s'han

identificat altres mutacions en aquest factor, com ara la substitució S321P, una deleció de dos nucleòtids (Antonicka et al., 2006), el canvi R47X i la substitució M496R (Valente et al., 2007). El factor mtEF-Tu, encarregat d'acompanyar l'aa-ARNt fins al mitoribosoma durant la fase d'elongació, pot presentar la mutació R336Q (Valente et al., 2007) que inactiva completament la capacitat d'unir l'aa-ARNt per tal de formar el complex ternari (Valente et al., 2009). Se suggereix que la mutació R312W en el factor mtEF-Ts (Smeitink et al., 2006), que regenera l'mtEF-Tu-GDP a mtEF-Tu-GTP, podria produir una reducció en la capacitat d'unió a l'mtEF-Tu i generar defectes en l'intercanvi nucleotídic (Akama et al., 2010). Per altra banda, el polimorfisme C798T en el gen que codifica el factor d'iniciació mtIF3 presenta associació al·lèlica amb la malaltia de Parkinson, tot suggerint que es tracta d'un factor de vulnerabilitat a la malaltia (Abahuni et al., 2007). Recentment, en alguns subjectes afectats d'encefalopatia, s'han trobat delecions d'un nucleòtid en el gen *C12orf65* que codifica un possible membre de la família dels factors de terminació mitocondrials. Les delecions indueixen l'aparició d'un codó de terminació prematur (Antonicka et al., 2010).

L'any 2005 es va conèixer el primer cas en què mutacions en aaRS mitocondrials codificades al nucli es podien relacionar amb malalties humanes. El treball publicava una possible vinculació entre algunes variants del gen *LARS2*, que codifica la LRS mitocondrial humana (*LARS2*), amb la susceptibilitat a patir diabetis de tipus 2. Es van determinar vuit polimorfismes en individus malalts, dels quals un (H324Q) semblava potenciar el risc de patir la malaltia, tot i que l'estudi estadístic no assolia nivells de significació suficients (t Hart et al., 2005). Recentment, s'ha publicat un estudi més ampli, de poder estadístic major, que refuta l'associació entre les variants de la *LARS2* i la diabetis de tipus 2 (Reiling et al., 2010).

En els darrers tres anys, han sortit a la llum un seguit de publicacions que connecten directament mutacions en gens d'aaRS mitocondrials amb diverses patologies hereditàries:

- La malaltia humana autosòmica recessiva LBSL (*leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and elevated lactate*; leucoencefalopatia amb implicació del tronc cerebral i la medul·la espinal amb lactat elevat) es diagnostica per detecció d'un ventall d'anormalitats en imatges i espectroscòpia de ressonància magnètica, i es caracteritza per atàxia cerebel·losa, espasticitat, discapacitat cognitiva variable i nivells elevats de lactat en la matèria blanca (van der Knaap et al., 2003). Un primer estudi revela que la LBSL pot ser causada per nombroses mutacions en el gen *DARS2*, que codifica l'aspartil-ARNt sintetasa mitocondrial humana (*DARS2*). La mutació més freqüent (R76SfsX5) afecta el lloc de *splicing* de l'intró 2, que provoca la deleció de l'exó 3, un canvi de pauta de lectura i la terminació prematura de la proteïna. Les mutacions són letals en homozigosi i afecten l'activitat d'aminoacilació de la *DARS2*. Tanmateix, aquesta limitació no afecta la funció mitocondrial de fibroblasts, limfoblasts, ni teixit muscular. Aquesta observació planteja dues hipòtesis: que el desencadenament de la malaltia sigui conseqüència d'una activitat de la *DARS2* mutant per sota d'un llindar específic per a les cèl·lules neuronals, o bé que la malaltia sigui causada per defectes subtils en el

mitocondri (Scheper et al., 2007a). Posteriorment, s'ha conegut un nou cas de LBSL heterozigot compost per dues mutacions en el gen *DARS2*, una de les quals no s'havia caracteritzat anteriorment (Uluc et al., 2008).

- La PCH (*pontocerebellar hypoplasia*; hipoplàsia pontocerebel·losa) engloba un grup heterogeni d'afeccions caracteritzades per una reducció notable de la mida del cerebel i del tronc cerebral (Barth, 1993). Els individus malalts són homozigots per dues variants del gen *RARS2*, que dona lloc a l'arginil-ARNt sintetasa mitocondrial humana (*RARS2*): un canvi R291K i una substitució (L13RfsX3) en el lloc de *splicing* de l'intró 2, que produeix l'escissió de l'exó 2 i un canvi de pauta de lectura. Com a conseqüència de les mutacions, s'observa una davallada del nivell d'Arg-ARNt<sup>Arg</sup> en fibroblasts de pacients, tot i que presenten una activitat residual atribuïda a un romanent de transcrits processats correctament (Edvardson et al., 2007). En contrast amb el cas de la *DARS2*, el múscul i la pell de subjectes amb PCH mostren defectes evidents en la funció mitocondrial, encara que els símptomes clínics de la malaltia només es manifestin al cervell.

- Darrerament, s'ha identificat una nova mutació present en homozigosi en individus afectats per la malaltia MLASA en el gen *YARS2*, que codifica la tirosil-ARNt sintetasa mitocondrial humana (*YARS2*). La mutació F52L a la *YARS2* provoca un descens de l'eficiència d'aminoacilació de l'ARNt<sup>Tyr</sup> mitocondrial i, atès que el canvi està situat proper al centre catalític de l'enzim, se suggereix que pot afectar el reconeixement i/o l'estabilitat del braç acceptor de l'ARNt. Aquest fet explicaria perquè els pacients mostren una reducció de la taxa de síntesi proteica mitocondrial i, en conseqüència, la disfunció dels complexos I, III i IV de la cadena respiratòria en teixit muscular. Tanmateix, els fibroblasts no mostren cap afectació en la síntesi de proteïnes ni en el funcionament de la cadena respiratòria. Aquest cas és l'únic exemple, descrit fins ara, de malaltia relacionada amb mutacions en aaRS que no afecta el sistema nerviós central (Riley et al., 2010).

L'establiment, en els darrers anys, d'una relació entre mutacions en gens d'aaRS i diverses patologies, fa d'aquests gens nous candidats per a malalties humanes d'etiologia desconeguda. Pel que fa al gen *SARS2*, que codifica la seril-ARNt sintetasa mitocondrial humana (*SARS2*), d'especial interès per a la present tesi doctoral, s'han identificat alguns polimorfismes (H8R, T35A i S83L) que, potencialment, podrien ser la causa directa de determinades malalties, o bé actuar com a moduladors de fenotips causats per altres gens (Antonellis i Green, 2008). Fins ara, només s'ha realitzat l'anàlisi d'un grup de polimorfismes en el gen *SARS2* en pacients amb sordesa associada al *locus DFNA4*. En tots els casos analitzats, però, s'ha descartat la vinculació dels polimorfismes amb la malaltia (Shah et al., 2001).



## 1.4 MODELS DE MALALTIES HUMANES DE TRADUCCIÓ GENÈTICA MITOCONDRIAL

Les malalties mitocondrials humanes, com ja s'ha emfatitzat, estan associades a un ampli ventall de símptomes clínics, que n'entorpeixen el diagnòstic i el desenvolupament de tractaments curatius. La major limitació per al coneixement d'aquestes patologies és la disponibilitat de teixits humans, que fa necessari l'ús de models representatius que reproduïxin les característiques d'aquests desordres.

### 1.4.1 Models de malalties de traducció genètica mitocondrial

La impossibilitat de manipular genèticament el genoma mitocondrial ha suposat un greu inconvenient a l'hora d'estudiar les relacions entre mutacions en els ARNt i ARNr mitocondrials i els fenotips clínics en animals model.

Inicialment, molts processos bioquímics i cel·lulars conseqüència de mutacions en l'ADNmt s'han analitzat mitjançant cèl·lules cíbrides transmitocondrials, és a dir, línies cel·lulars humanes immortalitzades de les quals s'ha extret l'ADNmt ( $\rho^0$ ) repoblades amb mitocondris que procedeixen del pacient (King i Attardi, 1989). Aquesta eina ha permès confirmar la patogenicitat de mutacions en l'ADNmt, determinar els mecanismes que provoquen determinats desordres mitocondrials, demostrar l'efecte llindar causat per nivells concrets d'heteroplàsmia i avaluar la importància del fons genètic nuclear a l'hora de determinar la segregació de mutacions heteroplàsmiques. Les cèl·lules cíbrides, però, provenen de cultius derivats de tumors que presenten inestabilitat genètica a llarg termini, fet que impedeix la reproducció dels trets propis de cèl·lules diferenciades (Jacobs, 2001).

*Saccharomyces cerevisiae* és un dels sistemes model emprats per tal d'entendre la significació fisiològica de mutacions als ARNt mitocondrials. La similitud entre l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA) de llevat i d'humà i la disponibilitat de tècniques de transformació mitocondrial en aquest organisme han permès la construcció de soques que posseeixen algunes de les mutacions en l'ARNt<sup>Leu</sup> (UAA) associades amb la malaltia MELAS. Aquests llevats tenen problemes de creixement en substrats respiratoris, exhibeixen una morfologia mitocondrial aberrant i acumulen deleccions a l'ADNmt (Feuermann et al., 2003). Els inconvenients d'aquest organisme són, per una banda, les diferències estructurals d'alguns ARNt respecte als d'humans i, per altra banda, que moltes de les propietats de biogènesi i metabolisme mitocondrials i aspectes propis d'organismes multicel·lulars no són reproduïbles en llevats.

Tot i la manca de models apropiats amb mutacions en ARNt o ARNr mitocondrials, s'ha progressat notablement en el desenvolupament de ratolins amb deleccions o mutacions patogèniques en l'ADNmt. Després de diversos intents fallits, fa uns deu anys que es van aconseguir els primers models de ratolí transmitocondrial heteroplàsmic, amb signes evidents de disfunció a l'òrganul i capaços de transmetre l'ADNmt mutant a les següents generacions (Marchington et al., 1999; Sligh et al., 2000). Els ratolins transmitocondrials es van obtenir per fusió de cèl·lules mare embrionàries de femelles, amb cèl·lules anucleades amb un ADNmt que

confereix resistència a l'inhibidor de mitoribosomes cloramfenicol, a causa d'una mutació puntual propera a l'extrem 3' del gen de l'ARNr 16S (Blanc et al., 1981). Posteriorment, s'ha emprat aquest sistema per tal de generar ratolins model heteroplàsmics per mutacions en l'ADNmt que afecten gens de la cadena respiratòria, com ara l'*ND6*, o el *CO1*, que mostren alteracions en la respiració mitocondrial, dany tissular i anormalitats estructurals als mitocondris (Fan et al., 2008). Addicionalment, s'ha construït un ratolí model transmitocondrial amb una extensa deleció d'ADNmt que elimina sis ARNt i, en conseqüència, aboleix la síntesi proteica i desencadena trets similars als de la síndrome de Kearns-Sayre (Inoue et al., 2000).

La generació de models enfocats a l'estudi de gens nuclears de funció mitocondrial té l'avantatge que no ha d'afrontar les limitacions tècniques relacionades amb la manipulació genètica de l'ADNmt.

L'invertebrat *Caenorhabditis elegans* s'ha emprat com a model de desordres mitocondrials causats per la depleció de proteïnes de la cadena respiratòria codificades al nucli com, per exemple, la subunitat citocrom *b<sub>560</sub>* del complex II (Ishii et al., 1998), d'una proteïna fèrrica del complex I (Kayser et al., 1999) o la subunitat catalítica FMN del complex I (Grad i Lemire, 2004); i també s'ha utilitzat com a model de deficiència d'elements de replicació i manteniment de l'ADNmt, com l'ADN polimerasa  $\gamma$  o la SSBP1 (Addo et al., 2010).

Existeixen nombrosos ratolins model de malalties mitocondrials generats per manipulació de gens nuclears essencials per a la funció a l'òrganul (Chinnery i Turnbull, 2000). Entre d'altres, s'han generat ratolins *knockout* pel gens de: l'ANT1, que pateixen el bloqueig del transport d'ATP/ADP i una superproducció de ROS; la superòxid dismutasa mitocondrial, que presenten una acumulació de ROS i disfunció de la cadena respiratòria; la frataxina, que afecta la cadena respiratòria; o el citocrom *c*, que mostren mortalitat *in utero*. També, s'ha creat un model de la malaltia de LHON mitjançant l'expressió al·lotípica de la subunitat ND4 del complex I de la cadena transportadora d'electrons amb la mutació R340H (Qi et al., 2007). A més, s'ha generat un ratolí transgènic *knock-in* que posseeix una mutació puntual al gen *NDUFS4* que compromet específicament el funcionament del complex I de la cadena respiratòria (Ingraham et al., 2009).

Hi ha escassos models animals de malalties mitocondrials causades per mutacions en gens nuclears que codifiquen proteïnes de traducció genètica mitocondrial. Un d'ells, és el ratolí *knockout* pel factor de transcripció mitocondrial mtTFA, que exhibeix una reducció en el nombre de còpies d'ADNmt i, en conseqüència, una disfunció de la cadena respiratòria. El *knockout* específic de la línia germinal produeix: mortalitat embrionària, retard en el desenvolupament neuronal, absència de cor i disc òptic i apoptosi (Larsson et al., 1998). La manca de mtTFA específica de cor provoca: cardiomiopatia, bloqueig de la conducció atrioventricular i apoptosi (Wang et al., 1999; Li et al., 2000); en cèl·lules  $\beta$ : diabetis i deficiència a la insulina (Silva et al., 2000); i en neurones: estrès oxidatiu, neurodegeneració i mort cel·lular massiva (Sorensen et al., 2001).

Un altre model animal és el *technical knockout (tko)* de *Drosophila melanogaster*, que presenta una mutació puntual en el gen nuclear *MRPS12* que afecta un residu conservat de la proteïna ribosòmica mitocondrial S12 (L85H), la qual genera fenotips de sordesa i retard en el desenvolupament. La mutació provoca: la inhibició de la síntesi proteica mitocondrial, la reducció de l'activitat enzimàtica redox i la davallada dels nivells d'ARNr, que es tradueix en la inestabilitat de la subunitat petita del mitoribosoma (Toivonen et al., 2001).

#### 1.4.2 Models animals de malalties relacionades amb aaRS

Existeixen alguns models animals de malalties causades per mutacions en aaRS citoplasmàtiques. La neuropatia Charcot-Marie-Tooth 2D, provocada per mutacions puntuals en el gen *GARS* (consulteu l'apartat 1.1.4), s'ha estudiat mitjançant diversos models animals. En primer lloc, es va identificar un ratolí que posseeix una mutació dominant (P234KY) en el gen ortòleg al *GARS* humà que causa disfunció neuromuscular greu i mortalitat prematura en heterozigosi. L'anàlisi histològica mostra una pèrdua degenerativa d'axons de neurones motores i sensorials, i l'estudi electrofisiològic revela una reducció de la velocitat de conducció nerviosa, fenotips consistents amb els símptomes típics de la malaltia. Tot i que la mutació de l'animal afecta un residu conservat de l'enzim, aquesta no influeix en la capacitat d'aminoacilació. Mitjançant l'ús d'un altre ratolí, heterozigot per l'al·lel nul del gen *GARS*, es va observar un descens de l'activitat d'aminoacilació però, en canvi, no es van detectar característiques fenotípiques anormals. En conclusió, el fenotip de la CMT2D no és producte de la pèrdua de funció de l'activitat canònica de la *GARS*, sinó que ho és per un possible rol desconegut específic del sistema nerviós perifèric (Seburn et al., 2006).

Posteriorment, es va descobrir una mutació en el gen de *D. melanogaster* corresponent al *GARS* humà que, en homozigosi, produeix defectes en les terminacions dendrítiques i en l'arborització axonal, trets similars als del ratolí amb la mutació P234KY. Addicionalment, *D. melanogaster* es va emprar com a model, amb l'objectiu d'introduir-hi construccions per tal d'expressar dues *GARS* mutants (E71G o L129P) i la versió *wt*. Malauradament, no es van observar canvis morfològics en les projeccions neuronals (Chihara et al., 2007).

Recentment, s'ha generat un model en *D. melanogaster* de la neuropatia DI-CMT (*dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth*; Charcot-Marie-Tooth dominant intermèdia) (vegeu l'apartat 1.1.4), a través de l'expressió del transgèn humà *YARS* amb les tres mutacions dominants prèviament descrites en pacients (G41R, E196K i 153-156delVKQV). Totes tres mutacions desencadenen trets típics de la malaltia, com ara: deficiència motora, disfunció neuronal i signes de degeneració axonal. No obstant això, no totes les mutacions afecten l'activitat enzimàtica de la *YARS*, per tant, es postula que la pèrdua de funció no és necessària ni suficient per causar els fenotips associats a la DI-CMT, i se suggereix que podrien ser-ho un guany de

funció de les YARS mutants o la interferència amb alguna funció desconeguda de la proteïna wt (Storkebaum et al., 2009).

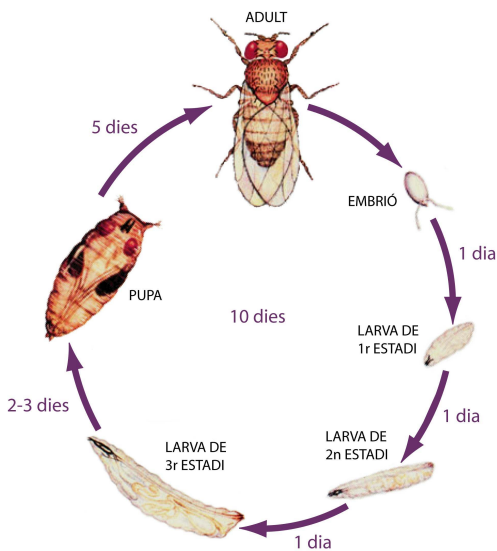
Per últim, tot i que, per ara, no es coneix cap malaltia vinculada a mutacions en el domini d'edició de l'alanil-ARNt sintetasa humana (AARS), existeix un model murí (ratolí *Sticky*) que exhibeix un fenotip d'atàxia i apoptosi de cèl·lules de Purkinge al cerebel, a causa de la mutació A734E en el domini d'edició de l'enzim de ratolí. La mutació no impedeix l'activitat d'aminoacilació, sinó que redueix notablement la capacitat de desacilació dels Ser-ARNt<sup>Ala</sup>, fet que condueix a una acumulació de proteïnes errònies mal plegades a les neurones, una regulació a l'alça de xaperones citoplasmàtiques i una activació de la via UPR (Lee et al., 2006).

La història recent de les malalties causades per mutacions en aaRS mitocondrials, fa que, ara per ara, no existeixin models animals per al seu estudi.

### 1.4.3 *Drosophila melanogaster* com a model de malalties humanes

Durant el segle passat, *Drosophila melanogaster* va exercir un paper important en l'origen i el desenvolupament de la biologia moderna, en especial en el camp de la genètica. La majoria de característiques que fan d'aquest organisme una eina útil com a animal model són encara vigents avui en dia.

Nombroses propietats fan de la *D. melanogaster* un animal atractiu com a model (Rubin i Lewis, 2000; Burdett i van den Heuvel, 2004; Jacobs et al., 2004; Sánchez-Martínez et al., 2006):



**Figura 1.11** Cicle vital de *D. melanogaster*. S'ensenyen els diferents estadis del cicle de vida i el temps de duració a 25°C.

1. El seu cicle de vida curt i l'elevat grau de fecunditat que permeten l'expansió ràpida de poblacions. El temps de generació de la drosòfila dura uns deu dies a 25°C i consta de diversos estadis (vegeu la figura 1.11).
2. La facilitat d'alimentar i mantenir els estocs sense infraestructures ni instrumentació específica.
3. El mapatge físic de gens en cromosomes politènics.
4. L'existència d'agents mutagènics per tal de generar col·leccions extenses d'estocs mutants.
5. El desenvolupament de tecnologies aplicades a la drosòfila de: localització de proteïnes i ARN en teixits i cèl·lules, transcriptòmica, proteòmica, etc. Així com la creació de centres de generació i manteniment d'estocs.
6. La biologia bàsica de l'organisme, que inclou els

principals tipus cel·lulars i els processos de desenvolupament que caracteritzen els metazous superiors. Molts d'aquests sistemes són relativament simples comparats amb els de mamífers,

però essencialment, duen a terme les mateixes funcions, tot utilitzant principis cel·lulars i fisiològics similars.

7. Les nombroses eines genètiques disponibles, com ara:

-Els balancejadors, que són cromosomes amb múltiples inversions que eviten la recombinació genètica entre cromosomes homòlegs (Greenspan, 2004), permeten que les mutacions o els transgens que es troben en heterozigosi es mantinguin al llarg de generacions. Els cromosomes balancejadors són eines molt útils ja que, a més, van associats a marcadors, que són mutacions que generen trets fenotípics fàcilment detectables, i que permeten analitzar la cosegregació de determinats genotips juntament amb ells.

-Les tècniques de transgènesi mitjançant elements P. Seqüències d'ADN forà, que inclouen l'element P transposable, poden ser inserides a l'ADN dels cromosomes de la línia germinal d'embrions de *Drosophila* (Rubin i Spradling, 1982).

-El sistema UAS-GAL4 de llevat que permet l'expressió controlada de transgens (Brand i Perrimon, 1993) per encreuament d'una soca que expressa el factor de transcripció de llevat GAL4, sota el control d'un promotor/estimulador determinat, amb una soca que conté el transgèn d'interès sota control de seqüències UAS (*upstream activating sequence*; seqüència activadora a 5') (vegeu la figura 1.12).

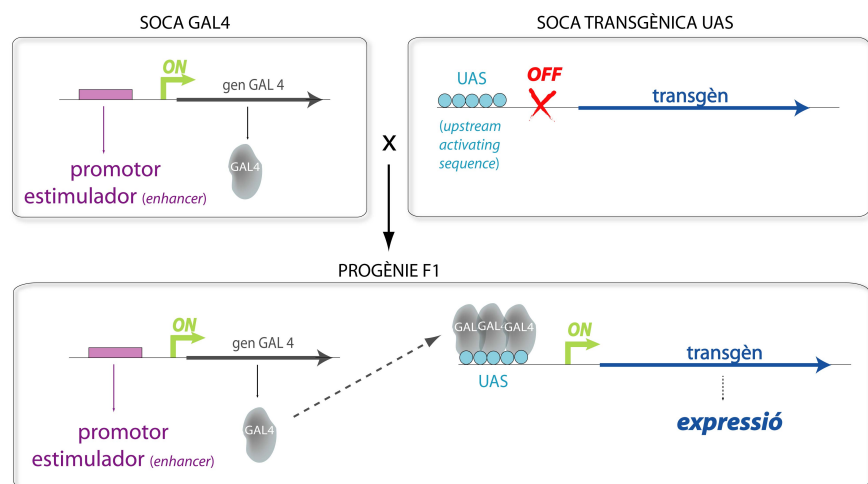


Figura 1.12 Sistema UAS-GAL4. Representació esquemàtica de l'encreuament entre una soca GAL4 i una soca transgènica UAS per tal d'induir l'expressió del transgèn a la descendència (F1).

-La tecnologia basada en la recombinació específica de lloc per tal de construir soques *knock-in* o *knockout* per a gens concrets. És a dir, qualsevol *locus* endogen pot ser substituït o eliminat per expressió d'una nucleasa i d'una recombinasa específiques de lloc, aprofitant el fet que els talls de cadena doble en l'ADN de *Drosophila* poden recombinar (Rong i Golic, 2000).

8. La disponibilitat de la seqüència genòmica completa que va posar de manifest, a partir de l'any 2000, l'elevat nombre d'ortòlegs humans i el nivell de conservació significatiu de les vies biològiques entre humans i mosques. S'estima que un 80% de gens causants de malalties humanes presenten ortòlegs en el genoma de la mosca.

Aquesta darrera característica és la que ha suscitat un interès creixent en *D. melanogaster* com a model, per tal d'entendre les bases moleculars de malalties humanes i desenvolupar noves estratègies terapèutiques.

L'ús de la mosca del vinagre com a model s'ha focalitzat en les malalties neurodegeneratives, el càncer, l'envelliment, les patologies cardíques i, més recentment, en les malalties mitocondrials.

Com ja s'ha emfatitzat (vegeu l'apartat 1.3.4), moltes de les malalties mitocondrials humanes es caracteritzen per fenotips al teixit nerviós i al muscular. El sistema nerviós de *Drosophila melanogaster* comprèn un cervell i un tronc nerviós axial segmentat, funcionalment equivalent al sistema nerviós central dels vertebrats (Reichert i Simeone, 2001). La funció sensorineural és duta a terme pels òrgans del sistema nerviós perifèric, que actuen en resposta a estímuls sonors, lumínics, mecànics i olfactoris, els quals són especificats de manera anàloga als vertebrats. Addicionalment, la diferenciació del teixit muscular de la mosca és molt similar a la dels animals superiors.

Pel que fa a la biogènesi i funció mitocondrials, *Drosophila* es considera un organisme proper als humans. L'ADNmt codifica els mateixos polipèptids i els ARNt i ARNr necessaris per a la síntesi proteica mitocondrial en els mitoribosomes, els quals tenen la mateixa composició i el mateix mecanisme d'acció. L'aparell de manteniment i expressió de l'ADNmt, l'acoblament dels enzims en els complexos de la cadena respiratòria i el transport mitocondrial estan conservats des dels insectes fins als humans. Malgrat algunes diferències a nivell molecular en les vies d'apoptosi, els mitocondris de la mosca també tenen un paper important en la regulació de la mort cel·lular programada.

En aquest capítol d'introducció s'han presentat i descrit els diferents protagonistes que tindran un paper important al llarg de la present tesi doctoral: la traducció genètica, les aaRS (en especial, la seril-ARNt sintetasa), el mitocondri i l'organisme model *Drosophila melanogaster*; tots ells, situats en el context de les malalties humanes, ens permeten establir els objectius del projecte de tesi, enumerats al capítol següent.