



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Departamento de Biotecnología



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
Laboratorio de Modificación del RNA y Enfermedades Mitocondriales

**CAENORHABDITIS ELEGANS COMO ORGANISMO MODELO PARA
ESTUDIAR ENFERMEDADES MITOCONDRIALES ASOCIADAS A
DEFECTOS EN LA MODIFICACIÓN DEL TRNA**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
María del Carmen Navarro González

Directora de la Tesis:

Dra. María Eugenia Armengod González

Tutora de la Tesis:

Dra. Lynne Paula Yenush

Valencia, septiembre 2015



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

La Dra. **MARÍA EUGENIA ARMENGOD GONZÁLEZ**, doctora en Ciencias Biológicas e investigadora principal del laboratorio de **MODIFICACIÓN DEL RNA Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES** del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF),

CERTIFICA QUE

Dña. **MARÍA DEL CARMEN NAVARRO GONZÁLEZ**, licenciada en Biotecnología, ha realizado bajo su dirección, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo titulado: **“*Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudiar enfermedades mitocondriales asociadas a defectos en la modificación del tRNA”**, y considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, septiembre de 2015

Fdo. Directora
M^a Eugenia Armengod González

Doctorando
María del Carmen Navarro González

La autora ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (Ref. BES-2011-047037) del Ministerio de Economía y Competitividad.

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha sido financiado por las ayudas a los proyectos “Rutas de modificación de tRNAs que decodifican codones de cajas mixtas acabados en purinas” (Ref. BFU2010-197379) del Ministerio de Educación y Ciencia, “Modificaciones de tRNAs bacterianos y mitocondriales: Funciones biológicas e implicaciones patológicas” (Ref. BFU2014-58673-P) del Ministerio de Economía y Competitividad y por la ayuda complementaria (ACOMP/2012/065), de la Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana.

RESUMEN: “*Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudiar enfermedades mitocondriales asociadas a defectos en la modificación del tRNA”

La modificación post-transcripcional de la uridina situada en la posición de tambaleo (U_{34}) de ciertos tRNAs es un proceso conservado evolutivamente, realizado por proteínas homólogas pertenecientes a las familias MnmA/MTU1, MnmE/GTPBP3 y MnmG/MTO1. Este carácter universal sustenta la idea del importante papel que debe tener dicha modificación para la biología de células y organismos. De hecho, mutaciones en los genes humanos *MTU1* y *GTPBP3* o *MTO1* causan fallo hepático infantil agudo y cardiomiopatía hipertrófica infantil, respectivamente, que producen letalidad durante los primeros meses de vida. Se asume que la causa primaria de estas enfermedades es la ausencia de las modificaciones introducidas por la proteína MTU1 en la posición 2 (un grupo tiol) y las proteínas GTPBP3 y MTO1 (un grupo taurinometil) en la posición 5 de la U_{34} en un grupo de tRNAs mitocondriales (mt-tRNAs). Sin embargo, los mecanismos subyacentes en estas enfermedades (y en otras asociadas también a la ausencia de tales modificaciones) no están claros, desconociéndose las razones por las cuales el déficit de la fosforilación oxidativa resultante en todos los casos (atribuido a alteraciones de la traducción mitocondrial de proteínas) produce fenotipos tan diversos. Nuestra hipótesis es que la señalización retrógrada mitocondria-núcleo promovida por la hipomodificación de los mt-tRNAs en posición 2 ó 5 de la U_{34} es diferente y la respuesta nuclear en cada caso viene modulada por el programa genético y epigenético de células y organismos.

En este trabajo, hemos utilizado el nematodo *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudiar los efectos producidos por la inactivación de las proteínas homólogas de MTU1, GTPBP3 y MTO1 a las que hemos denominado MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2, respectivamente. Hemos comprobado que estas proteínas, codificadas por el núcleo, son de localización mitocondrial y están implicadas en la modificación de la U_{34} de los mt-tRNAs. Los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* presentan una reducción en su fertilidad y, en el caso del mutante simple *mttu-1*, fenotipos asociados a termosensibilidad (alargamiento de su ciclo reproductivo y reducción de su fertilidad). Los fenotipos exhibidos por los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* sustentan la hipótesis de que la mutación *mttu-1*, por un lado, y las mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2*, por otro, promueven señales retrógradas diferentes que producen patrones de expresión nuclear específicos. Así, un rasgo fenotípico dependiente de genes nucleares (como lo es la transcripción y/o estabilidad de los mt-tRNAs) y la expresión de genes nucleares como *ucp-4*,

hsp-6, *hsp-60* y otros implicados en el metabolismo mitocondrial muestran un patrón diferente en los dos grupos de mutantes. Los genes *hsp-6* y *hsp-60*, usados como marcadores de la respuesta a estrés mitocondrial (UPR^{mt} o “mitochondrial unfolded protein response”), están regulados a la baja en el mutante *mttu-1*, lo que podría relacionarse con la termosensibilidad de este mutante en relación a su fertilidad y ciclo reproductivo. Los tres mutantes simples exhiben una reducción en la expresión de genes de la glicólisis y de la β -oxidación de los ácidos grasos (más severa en el mutante *mttu-1*), una inducción en un marcador de glutaminólisis y una inducción en el gen *ucp-4* (más acusada en el mutante *mttu-1*) implicado en el transporte de succinato (un intermediario del ciclo del ácido tricarbóxico, TCA) a la mitocondria. Dado que los tres mutantes simples presentan una disfunción OXPHOS relativamente suave, proponemos que los cambios de expresión en genes que modulan el metabolismo mitocondrial revelan una reprogramación del ciclo del TCA que compensa la disminución en el aporte de acetil-CoA procedente de glicólisis y oxidación de ácidos grasos con la activación de rutas anapleróticas del ciclo del TCA basadas en la importación de succinato a la mitocondria por UCP-4 y en el aporte de α -cetoglutarato procedente de la glutaminólisis. Esta reprogramación podría asociarse a la entrada de equivalentes reducidos (en la forma de FADH₂) en el sistema OXPHOS a través del complejo II que compensaría, en parte, la posible disfunción del complejo I. En la Tesis también se analizan los efectos de la anulación simultánea de las modificaciones en las posiciones 2 y 5 de la U₃₄. El doble mutante *mtcu-2;mttu-1* presenta una disfunción OXPHOS severa, con una ratio AMP/ATP 5 veces superior al control, que resulta en letalidad embrionaria, detención del desarrollo en estadios larvarios tempranos y esterilidad completa en los adultos que presentan, por otra parte, una longevidad unas dos veces superior a la cepa control. Este incremento de la longevidad está modulado por rutas de señalización que dependen de AMPK, fundamentalmente de la subunidad catalítica AAK-1, y de hormonas esteroideas, a través de las proteínas DAF-9 y DAF-12.

En resumen, este trabajo muestra, por primera vez a nivel de un organismo modelo animal, la importante reprogramación de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial en respuesta a la hipomodificación de la U₃₄ de los mt-tRNAs y revela nuevas conexiones entre rutas de señalización que incrementan la longevidad.

RESUM: “*Caenorhabditis elegans* com a organisme model per estudiar malalties mitocondrials associades a defectes en la modificació dels tRNAs”

La modificació post-transcripcional de la uridina situada en la posició de balanceig (U_{34}) de certs tRNAs és un procés conservat evolutivament realitzat per proteïnes homòlogues a les de les famílies MnmA/MTU1, MnmE/GTPBP3 i MnmG/MTO1. Aquest caràcter universal sustenta la importància de les dites modificacions per a la biologia de cèl·lules i organismes. De fet, mutacions en els gens humans *MTU1* i *GTPBP3* o *MTO1* causen fallada hepàtica infantil aguda i cardiomiopatia hipertròfica infantil amb acidosis làctica, respectivament, que habitualment produeixen letalitat durant els primers mesos de vida. S'assumeix que la causa primària d'aquestes malalties és l'absència de les modificacions introduïdes per la proteïna MTU1 a la posició 2 (un grup tiol) i per les proteïnes GTPBP3 i MTO1 (un grup taurinometil) a la posició 5 de la U_{34} en un grup de tRNAs mitocondrials (mt-tRNAs). No obstant això, els mecanismes subjacents en estes malalties (i en altres associades també a l'absència de tals modificacions) no estan clars, desconeixent-se les raons per les quals el dèficit de la fosforilació oxidativa resultant en tots els casos (atribuït a alteracions de la traducció mitocondrial de proteïnes) produeix fenotips tan diversos. La nostra hipòtesi és que la senyalització retrògrada mitocòndria-nucli promoguda per la hipomodificació dels mt-tRNAs en posició 2 o 5 de la U_{34} és diferent i la resposta nuclear en cada cas es dependent del programa genètic i epigenètic de cèl·lules i organismes.

En aquest treball, hem utilitzat el nematode *Caenorhabditis elegans* com a organisme model per a estudiar els efectes produïts per la inactivació de les proteïnes homòlogues de MTU1, GTPBP3 i MTO1 a les que hem denominades MTTU-1, MTCU-1 i MTCU-2, respectivament. Hem comprovat que aquestes proteïnes, codificades pel nucli, són de localització mitocondrial i estan implicades en la modificació de la U_{34} dels mt-tRNAs. Els mutants simples *mtcu-1* i *mtcu-2* presenten una reducció en la seua fertilitat i, en el cas del mutant simple *mttu-1*, fenotipus associats a termosensibilitat (allargament del seu cicle reproductiu i reducció de la seua fertilitat). Els fenotipus exhibits pels mutants simples *mttu-1*, *mtcu-1* i *mtcu-2* sustenten la hipòtesi que la mutació *mttu-1*, d'una banda, i les mutacions *mtcu-1* i *mtcu-2*, d'una altra, promouen senyals retrògrads diferents que produeixen patrons d'expressió nuclears específics. Així, un tret fenotípic dependent de gens nuclears (com ho és la transcripció i/o l'estabilitat dels mt-tRNAs) i l'expressió de gens nuclears com *ucp-4*, *hsp-6*, *hsp-60* i altres implicats en el metabolisme mitocondrial mostren un patró diferent en els dos grups de mutants. Els gens *hsp-6* i *hsp-60*, usats com a

marcadors de la resposta a estrès mitocondrial (UPR^{mt} o "mitochondrial unfolded protein response"), estan regulats a la baixa en el mutant *mttu-1*, la qual cosa podria relacionar-se amb la termosensibilitat d'aquest mutant en relació a la seua fertilitat i cicle reproductiu. Els tres mutants simples exhibeixen una reducció en l'expressió de gens de la glicòlisi i de la β -oxidació dels àcids grassos (més severa en el mutant *mttu-1*), una inducció en un marcador de glutaminolisi i una inducció en el gen *ucp-4* (més acusada en el mutant *mttu-1*) implicat en el transport de succinat (un intermediari del cicle de l'àcid tricarboxílic, TCA) a la mitocòndria. Atès que els tres mutants simples presenten una disfunció OXPHOS relativament suau, proposem que els canvis d'expressió en gens que modulen el metabolisme mitocondrial revelen una reprogramació del cicle del TCA que compensa la disminució en l'aportació d'acetil-CoA procedent de la glicòlisi i de l'oxidació d'àcids grassos amb l'activació de rutes anapleròtiques del cicle del TCA basades en la importació de succinat a la mitocòndria per UCP-4 i en l'aportació de α -cetoglutarat procedent de la glutaminolisi. Esta reprogramació podria associar-se amb l'entrada d'equivalents reduïts (en la forma de FADH₂) al sistema OXPHOS a través del complex II que compensaria en part la possible disfunció del complex I. En la Tesi també s'analitzen els efectes de l'anul·lació simultània de les modificacions en les posicions 2 i 5 de la U₃₄. El doble mutant *mtcu-2;mttu-1* presenta una disfunció OXPHOS severa, amb una ràtio AMP/ATP 5 vegades superior al control, que resulta en letalitat embrionària, detenció del desenvolupament en estadis larvaris primerencs, esterilitat completa en els adults i una longevitat unes 2 vegades superior al control. Aquest increment de la longevitat està modulada per rutes de senyalització que depenen d'AMPK, fonamentalment de la subunitat catalítica AAK-1, i d'hormones esteroidees, a través de les proteïnes DAF-9 i DAF-12.

En resum, aquest treball mostra per primera vegada a nivell d'un animal model la important reprogramació de gens relacionats amb el metabolisme mitocondrial en resposta a la hipomodificació de la U₃₄ dels mt-tRNAs i revela noves connexions entre rutes de senyalització que incrementen la longevitat.

SUMMARY: “*Caenorhabditis elegans* as a model organism to study mitochondrial diseases associated with defects in tRNA modification”

Post-transcriptional modification of the wobble uridine (U₃₄) of a tRNA set is an evolutionary conserved process, produced by homologous proteins from the MnmA/MTU1, MnmE/GTPBP3 and MnmG/MTO1 families. Their universal character suggests that these modifications play a crucial role in the biology of cells and organisms. In fact, mutations in the human genes *MTU1* and *GTPBP3* or *MTO1* produce acute infantile liver failure, and hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis, respectively, which usually cause lethality in the first months of life. It is assumed that the primary cause of these diseases is the lack of the modifications introduced by the MTU1 protein in position 2 (a thiol group) and GTPBP3 and MTO1 proteins (a taurinomethylation group) in position 5 at U₃₄ in a subgroup of mitochondrial tRNAs (mt-tRNAs). Nevertheless, the molecular mechanisms underlying these diseases (and other diseases associated with such modifications) are not clear. The reason why the typical defects of oxidative phosphorylation (due to impaired mitochondrial translation) produce such wide range of phenotypes is still unknown. Our hypothesis sustains that the mitochondria-nucleus retrograde signaling pathways triggered by the hypomodification at position 2 and 5 of U₃₄ are different, and that each nuclear response is modulated by the genetic and epigenetic programs of cells and organisms.

In this work, we have used the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism to study the effects of inactivating the homologue proteins to MTU1, GTPBP3 and MTO1, which we have named as MTTU-1, MTCU-1 and MTCU-2, respectively. We have proved that these nuclear encoded proteins are located in mitochondria and are involved in U₃₄ modification of mt-tRNAs. The *mtcu-1* and *mtcu-2* single mutants show a reduction in fertility, while the *mttu-1* single mutant shows a reduction in fertility and a lengthening of the reproductive cycle (both phenotypes are thermosensitive). The phenotypes exhibited by the *mttu-1*, *mtcu-1* and *mtcu-2* single mutants support our hypothesis, in which the *mttu-1* single mutation, on the one hand, and the *mtcu-1* and *mtcu-2* single mutations, on the other hand, trigger different retrograde signaling pathways which produce specific nuclear expression. Thus, a nuclear dependent phenotypic trait (as transcription or mt-tRNAs stability) and the expression of nuclear genes as *ucp-4*, *hsp-6*, *hsp-60* and other genes involved in mitochondrial metabolism show a differential pattern in both group of mutants. *hsp-6* and *hsp-60* genes, which are used as mitochondrial stress response markers (UPR^{mt} or

“mitochondrial unfolded protein response”) are downregulated in *mttu-1* single mutant, which could be related to fertility and reproductive cycle thermosensitivity. The three single mutants exhibit reduced expression of glycolysis and β -oxidation genes (usually more drastic in the *mttu-1* mutant), an induction of a glutaminolysis marker, and an induction of the *ucp-4* gene, which encodes a transporter of the succinate (an intermediate of the tricarboxylic acid cycle, TCA) to the mitochondria. Due to all three single mutants display a mild OXPHOS dysfunction, we propose that the observed changes in the expression of genes involved in the mitochondrial metabolism reveal a TCA cycle reprogramming aimed to compensate the reduction of acetyl-CoA (coming from glycolysis and fatty acid oxidation) through the activation of anaplerotic pathways characterized by the succinate import to mitochondria by UCP-4 and the incorporation of 2-oxoglutarate from glutaminolysis. This reprogramming could be associated with the input of reduced equivalents (as FADH_2) to the OXPHOS system through complex II, which would compensate the putative dysfunction of complex I. In this Thesis, we also analyze the effects of the simultaneous suppression of modifications at positions 2 and 5 of U_{34} in *C. elegans*. The double mutant *mtcu-2;mttu-1* displayed a severe OXPHOS dysfunction and a 5-fold higher AMP/ATP ratio, which was associated with embryonic lethality, developmental arrest in primary larval stages, penetrant sterility in adults and extended lifespan. This lifespan extension is modulated by signaling pathways which depend on AMPK (specifically on AAK-1 catalytic subunit) and steroid hormones, through DAF-9 and DAF-12 proteins.

In brief, this work shows for the first time in an animal model the important gene reprogramming related to mitochondrial metabolism in response to U_{34} hypomodification of mt-tRNAs, and shows new connexions between signaling pathways that extend lifespan.

A mi familia.

Reflexiones

*“Los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queramos toda la vida”*

Lee Smolin

Como autora de este trabajo, me he permitido tomar prestadas estas páginas para compartir unas reflexiones. Ninguno de estos pensamientos os ayudará a comprender el trabajo que se describe en estas páginas, pero tal vez os transmitan el **cariño** con el que he escrito esta **Tesis**; aunque haya supuesto un gran **esfuerzo** y aunque al hacerlo haya revivido todas las pequeñas **decepciones** que acompañan a esos resultados que se resisten, esas “espinitas” que tardas en sacar más de lo esperado. Siendo sincera, durante la escritura también se recuerdan las grandes **alegrías** que te dan esos experimentos que después de tanto tiempo y esfuerzo dan sus frutos, que te devuelven la **curiosidad** y te dan **ilusión** y energía para seguir investigando.

No recuerdo el momento en el que decidí que la **ciencia** era mi camino, simplemente fui dirigiendo a mis pasos poco a poco y tomando pequeñas decisiones en determinados momentos que, a la postre, me han traído hasta aquí, hasta compartir en estas páginas el trabajo de estos 4 años. Tal vez me guiaron los **dibujos** de “érase una vez la vida” que veía de pequeña, o el **amor** por la **lectura** que me transmitieron mis **padres** y que me abrió (y todavía me sigue abriendo) **puertas** a un sinfín de historias y conocimientos, o el espíritu **investigador** de mi **hermano** que siempre descubría cosas nuevas que contarme y tenía experimentos en la manga que probar. Tal vez me gusta la ciencia porque está en sintonía con mis dos otras pasiones, **viajar** y **leer**. Y, aunque hay unos cuantos viajes y aventuras que debo agradecer directamente a la ciencia, la clave de por qué he llegado hasta aquí, la descubrí leyendo. Hace un tiempo leí una frase, de la que no recuerdo las palabras exactas, pero sí su esencia: “todas las **historias** que conocemos, con las que nos emocionamos, disfrutamos e imaginamos; todas ellas, surgen de la combinación de **27 letras**”. No sé a vosotros, pero a mí me pareció asombroso. Inmediatamente después de leerla, pensé algo todavía más **fascinante** y cautivador. Toda la **vida** que conocemos, desde la bacteria más diminuta pasando por todas las plantas, hongos y animales (a cual más peculiar), hasta nosotros mismos, está “escrita” con, tan sólo, **4 letras** (o en palabras científicas, almacenada en 4 bases nitrogenadas que conforman el ADN): A (adenina), G (guanina), C (citosina) y T (timina). ¿Cómo es posible?

¿Cuántísimas combinaciones deben poder formarse para crear tanta variedad? Este pensamiento sí me pareció alucinante, y así entendí que me gusta la ciencia porque quiero saber cómo es posible que sólo 4 letras hayan sido capaces de dar lugar a todos los seres vivos que existen y cómo es posible que hayan escrito un **libro** tan completo y bello. Así descubrí, que me gusta la ciencia porque quiero **aprender a leerlo**.

Agradecimientos

Me gustaría dedicar estas páginas a agradecer la participación de cada una de las personas que han contribuido en el desarrollo de esta Tesis.

Hay una persona clave en toda esta historia, mi directora, la Dr. M^a Eugenia Armengod. En primer lugar, me gustaría agradecerle que me diera la oportunidad de formar parte de su laboratorio y de participar en este proyecto tan enriquecedor para mí (sin duda, en estos 4 años, he aprendido un poco cómo leer el libro de la vida del que hablaba). Agradecer también los conocimientos que me ha transmitido, los ánimos para participar y presentar este proyecto en todos los congresos a los que he podido asistir y los permisos para visitar otros laboratorios en las dos estancias que he podido disfrutar. Además, me gustaría darle las gracias por la capacidad de comprensión, amabilidad y humanidad que ha demostrado tener para conmigo en el desarrollo de este trabajo. Y, finalmente, gracias por desvivirse para que esta Tesis doctoral pudiera ser depositada y presentada de la mejor forma posible.

También me gustaría agradecer al Prof. Peter Dedon y al Prof. Simon Tuck el abrimme las puertas de sus respectivos laboratorios, por acogerme como a una investigadora más del grupo y por transmitirme sus conocimientos sobre la espectrometría de masas y la fisiología de *C. elegans*, respectivamente. Gracias a ellos, he podido reflejar todo lo aprendido en este trabajo. También debo agradecer a todos los que fueron mis compañeros de laboratorio durante las estancias su paciencia y diligencia para mostrarme el funcionamiento de cada laboratorio; su compañía ayudó a que me sintiera como en casa, a pesar de estar en lugares tan dispares como son Singapur y Umeå (Suecia).

A todos mis compañeros del laboratorio de Modificación del RNA y Enfermedades Mitocondriales, gracias por estos años de aprendizaje y compañerismo. A Ismaïl Moukadiri por permitirme conocer a *C. elegans* y aprender de este organismo modelo. A Silvia y Rafa por recibirme en los primeros meses que estuve en el laboratorio, por enseñarme todo lo que sé sobre las proteínas, por explicarme con mucha paciencia los experimentos, además de cómo funciona el centro, y por hacerme pasar muy buenos momentos. No pude tener mejor recibimiento. A Salva y Ana por los buenos ratos a la hora de comer en el “cuartito”, por sus buenos consejos y por toda la ayuda prestada durante estos años, que no ha sido poca. A Magda por su ayuda incondicional, por sus consejos y por “estar en todo”, haces que el trabajo parezca más fácil de lo que en realidad es.

A Majo por su compañerismo durante el tiempo que convivimos y sus recomendaciones en los experimentos. A Elvira por transmitirnos su buen humor en el ratito del café y no dudar en echar una mano cuando hacía falta. A Rachid por sonreír siempre, hasta cuando los experimentos no se portan tan bien con nosotros como nos gustaría, y por obligarnos a hablar un poquito más de inglés aunque esté siendo un buen alumno de castellano.

A los compañeros del laboratorio de Degradación Intracelular de Proteínas y Enfermedades Raras por prestar su ayuda siempre que la he necesitado, por los consejos científicos y de escritura de Tesis y por el “buen rollo” que hemos tenido. Ha sido muy agradable teneros de vecinos.

A mis amigos del máster porque, aunque nos vemos poco, sé que estáis ahí. Gracias por los ánimos que me disteis cuando comencé a escribir esta Tesis. En poco tiempo os los estaré dando yo a vosotros.

A mis amigos (los del “insti” y compañía), por estar ahí siempre. Sin saberlo, habéis contribuido al desarrollo de este trabajo y habéis sido un apoyo muy importante para mí. Aun dedicándonos a cosas tan diferentes, habéis sabido compartir mis alegrías y recordarme las cosas buenas que hay en mi vida.

A mis iaios por interesarse por mi trabajo y por la salud de mis gusanitos (a los que incluso conocieron “personalmente”) y por alegrarse por mí en cada una de mis estancias, aun sabiendo que nos íbamos a echar mucho de menos.

A Javi por estar a mi lado desde siempre, por compartir conmigo tu pasión por saber y por ser mi modelo a seguir. No se puede ser mejor persona. No podría tener mejor hermano.

A Jesús, quien llegó a mi vida a la vez que empecé este periodo predoctoral y de quien se podría decir que ha hecho la Tesis conmigo. Gracias por la comprensión, por esa pizca de “locura” que te hizo acompañarme en las estancias sin dudarlo, aunque eso supusiera cruzarse medio mundo, y por todos los abrazos y mimos cuando los ánimos decaían.

A mis padres que me han apoyado y han respetado todas mis decisiones (incluso las que suponían pasar unos meses lejos de casa). Gracias por “regalarme tiempo” estos últimos meses de escritura de Tesis, pues eso mismo es lo que más necesitaba. Gracias por tener siempre un oído para escucharme y aconsejarme, por las palabras de aliento y los abrazos cuando la presión del trabajo me superaba y por enseñarme a creer en mí. GRACIAS.

GRACIAS A TODOS

Índice

Introducción

1. Mitocondria	3
1.1. Historia, evolución y estructura de la mitocondria	4
1.2. El genoma mitocondrial	5
1.3. El código genético y las modificaciones del tRNA	7
1.4. Sistema OXPHOS	9
1.5. Metabolismo mitocondrial	11
1.6. Enfermedades mitocondriales, enfermedades OXPHOS	14
1.6.1. Mutaciones en genes mitocondriales	14
1.6.2. Mutaciones en genes nucleares	15
2. Modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs	16
2.1. Los tRNAs y sus modificaciones post-transcripcionales	16
2.2. Enzimas modificadoras de la U ₃₄ de tRNAs que leen codones de cajas mixtas acabados en purinas (NNA/NNG)	18
2.3. Fenotipos producidos por la ausencia de modificación en la U ₃₄	21
2.3.1. En <i>Escherichia coli</i>	21
2.3.2. En <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3.3. En humanos	22
3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
3.1. Sistema reproductor de <i>C. elegans</i> (tejido somático y germinal)	27
3.2. Mitocondria y genoma mitocondrial de <i>C. elegans</i>	31
3.3. Características especiales de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i>	36
3.4. Rutas de señalización de longevidad en <i>C. elegans</i>	37
3.4.1. Señalización por insulina/IGF-1 (IIS)	38
3.4.2. Señalización a través de TOR (target-of-rapamycin) o restricción calórica ..	40
3.4.3. Señalización por línea germinal	41
3.4.4. Señalización por hormonas o esteroides	42

3.4.5. Señalización por mitocondria	44
---	----

Justificación y objetivos

Justificación y objetivos	49
---------------------------------	----

Materiales y métodos

1. Materiales	53
1.1. Material biológico	53
1.1.1. Cepas bacterianas	53
1.1.2. Cepa de levadura	54
1.1.3. Cepas de <i>C. elegans</i>	54
1.1.4. Plásmidos	56
1.1.5. Oligonucleótidos	59
1.2. Material químico y bioquímico	60
1.2.1. Medios de cultivo y tampones	60
1.2.2. Reactivos	62
1.3. Equipos	63
1.4. Programas informáticos	63
2. Métodos	64
2.1. Mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos y de nematodos	64
2.1.1. Cultivos bacterianos	64
2.1.2. Cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	64
2.1.3. Cultivo de <i>C. elegans</i>	64
2.1.3.1. Cultivo sólido	64
2.1.3.2. Cultivo líquido	65
2.2. Genotipado (PCR a partir de un único gusano)	65
2.3. Obtención de machos	66
2.4. Cruces (“retrocruces” y obtención de dobles mutantes)	67
2.5. Sincronización de <i>C. elegans</i>	71

2.6. Construcción y expresión de proteínas de fusión fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	71
2.7. Purificación de mitocondrias crudas	73
2.8. Purificación de RNA	73
2.8.1. Purificación de RNA total pequeño a partir de un extracto de mitocondrias crudas de <i>C. elegans</i>	73
2.8.2. Purificación de RNA total de <i>C. elegans</i>	74
2.8.3. Purificación de RNA total pequeño a partir de <i>C. elegans</i>	74
2.9. Análisis de las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	75
2.10. Electroforesis en gel desnaturizante con APM y análisis por transferencia Northern	77
2.11. Ensayo de sensibilidad a la actividad endonucleasa de la angiogenina	78
2.12. Cuantificación de la sobreexpresión de los mt-tRNAs	79
2.13. Tinción con TMRE y MitoTracker Red	79
2.14. Medidas de la ratio AMP/ATP en <i>C. elegans</i> utilizando HPLC	80
2.15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA	81
2.16. Transferencia Western y cuantificación de las subunidades de los complejos OXPHOS	81
2.17. Cuantificación de los niveles de mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real	82
2.18. Ensayos de fertilidad y cuantificación de la longitud del ciclo reproductivo	83
2.19. Ensayo de silenciamiento por alimentación con RNA de interferencia (RNAi)	83
2.20. Disección de las gónadas y tinción con DAPI	85
2.21. Ensayos de longevidad	85

Resultados

1. Identificación de los genes y proteínas homólogos a los bacterianos <i>mnmA</i>, <i>mnmE</i> y <i>mnmG</i> en <i>C. elegans</i>	89
1.1. Gen <i>mttu-1</i> (B0035.16) y proteína MTTU-1	89
1.2. Gen <i>mtcu-1</i> (F39B2.7) y proteína MTCU-1	90
1.3. Gen <i>mtcu-2</i> (F52H3.2) y proteína MTCU-2	92
2. Localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2	94

3. Descripción de las cepas mutantes simples <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y mutantes dobles <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	96
3.1. Mutante <i>mttu-1</i>	97
3.2. Mutante <i>mtcu-1</i>	97
3.3. Mutante <i>mtcu-2</i>	98
3.4. Mutante <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	99
3.5. Mutantes <i>mtcu-2;mttu-1</i> y <i>mtcu-1;mttu-1</i>	100
4. Las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 modifican los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i>	101
4.1. Análisis del estado de modificación de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	103
4.2. Análisis del estado de tiolación de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i> mediante hibridación Northern en geles APM	104
4.3. Análisis de la modificación en posición 5 de la U ₃₄ de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i> por digestión con angiogenina	106
4.4. Alteración de los niveles constitutivos de los mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} en los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	109
5. La inactivación de <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> provoca disfunción mitocondrial en <i>C. elegans</i>	111
6. Estudio de la expresión de genes implicados en diferentes rutas metabólicas en los mutantes <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	118
7. Estudio fenotípico de los mutantes simples <i>mttu-1</i>, <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y de los dobles mutantes <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	121
7.1. Estudio de la fertilidad en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	122
7.2. Estudio de la longitud del ciclo reproductivo en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	123
8. La ausencia simultánea de MTTU-1 y MTCU-1 o MTCU-2 produce esterilidad y problemas en el desarrollo de <i>C. elegans</i>	124
9. La inactivación simultánea de <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> alarga la vida media en <i>C. elegans</i>	129
10. La inactivación simultánea de <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> en la línea somática o germinal causa defectos en el desarrollo o esterilidad, respectivamente	131

11. Estudio de las rutas de señalización implicadas en la longevidad del doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1</i>	133
11.1. Señalización por insulina	133
11.2. Ruta mediada por TOR (o restricción calórica)	134
11.3. Señalización por línea germinal mediada por una respuesta hormonal	135
11.4. Señalización mitocondrial	140
<u>Discusión</u>	
Discusión	147
<u>Conclusiones</u>	
Conclusiones	167
<u>Bibliografía</u>	
Bibliografía	173
<u>Anexos</u>	
Anexo I. Listado de reactivos utilizados en este trabajo	187
Anexo II. Listado de equipos utilizados en este trabajo	189
Anexo III. BLAST (NCBI) de las proteínas homólogas en <i>C. elegans</i> utilizando MnmA, MnmE y MnmG de <i>E. coli</i> , MTU1, MSS1 y MTO1 de <i>S. cerevisiae</i> y MTU1, GTPBP3 y MTO1 de <i>H. sapiens</i> como “query”	191
Anexo IV. Predicción de la localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por MitoProt II	200
Anexo V. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas homólogas en los diferentes organismos (<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i> y <i>H. sapiens</i>) con el software CLUSTAL OMEGA	202

Índice de figuras

Figura I1. Sección de una mitocondria en el microscopio electrónico	5
Figura I2. Genoma mitocondrial humano	6
Figura I3. Código genético universal	7
Figura I4. Representación de la ETC y el sistema OXPHOS	10
Figura I5. Esquema de la relación entre las rutas metabólicas de la glucosa, los ácidos grasos y el ciclo del TCA en la mitocondria	13
Figura I6. Representación de la estructura secundaria del tRNA y las posibles modificaciones presentes en cada una de las posiciones	17
Figura I7. Rutas de modificación de la U ₃₄ controladas por las proteínas MnmE-MnmG y MnmA en <i>E. coli</i>	19
Figura I8. Ruta de modificación de la U ₃₄ de mt-tRNAs en eucariotas	20
Figura I9. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 22°C	26
Figura I10. Sistema reproductor de un hermafrodita adulto	28
Figura I11. Ilustración del desarrollo de la gónada (tejido somático y germinal)	29
Figura I12. Imagen de la gónada anterior de un adulto hermafrodita y de sus células germinales... ..	30
Figura I13. Representación de las vías metabólicas conservadas en la mitocondria de <i>C. elegans</i> ..	32
Figura I14. Representación del genoma mitocondrial de <i>C. elegans</i>	34
Figura I15. Estructura secundaria de los mt-tRNAs de <i>C. elegans</i>	37
Figura I16. Diagrama de la cascada de señalización por insulina en <i>C. elegans</i> que resulta en la modulación de la actividad del factor de transcripción DAF-16 por fosforilación	39
Figura I17. Esquema de la ruta de señalización de longevidad mediada por TOR en <i>C. elegans</i>	41
Figura I18. Modelo de la regulación de la longevidad por el sistema reproductor en <i>C. elegans</i>	43
Figura I19. Ilustración de un modelo de la UPR ^{mt}	45

Figura M1. Plásmido L4440	57
Figura M2. Plásmido pME18S-FL3	58
Figura M3. Plásmido pGREG600	58
Figura M4. Representación de un “retrocruce”	68
Figura M5. Representación de los cruces a realizar para obtener un doble mutante	70
Figura M6. Ilustración de la construcción y expresión de las proteínas de fusión fluorescentes en <i>S. cerevisiae</i>	72
Figura M7. Diagrama de flujo del procedimiento para analizar las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de <i>C. elegans</i> por espectrometría de masas	77
Figura M8. Representación del ensayo de digestión del RNA total pequeño de <i>C. elegans</i> con la nucleasa angiogenina	78
Figura R1. Esquema del operón CEOP4428 y del gen <i>mttu-1</i>	90
Figura R2. Esquema del operón CEOP1760 y del gen <i>mtcu-1</i>	91
Figura R3. Esquema del operón CEOP2696 y del gen <i>mtcu-2</i>	92
Figura R4. Alineamiento múltiple de secuencia de los primeros aminoácidos de los homólogos en <i>E. coli</i> , <i>T. marítima</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i>	95
Figura R5. Localización mitocondrial de las proteínas de <i>C. elegans</i> MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i>	96
Figura R6. Comprobación del genotipo de los mutantes de <i>C. elegans</i> por PCR	99
Figura R7. Matriz de un doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1/nT1g</i> balanceado	101
Figura R8. Hipótesis de la ruta de modificación de la uridina de tambaleo de los tRNAs mitocondriales de <i>C. elegans</i>	102
Figura R9. Análisis del estado de tiolación del mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} de <i>C. elegans</i>	106
Figura R10. Digestión con angiogenina del mt-tRNA ^{Leu} procedente de los mutantes simples <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y de la cepa salvaje de <i>C. elegans</i>	108
Figura R11. Cuantificación de los niveles estacionarios de los mt-tRNA ^{Leu} y mt-tRNA ^{Gln} en las cepas salvaje y simples mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	110
Figura R12. Niveles estacionarios de las subunidades NUO-2, CTC-1 y ATP-2 de los complejos I, IV y V, respectivamente, de la fosforilación oxidativa	112

Figura R13. Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y el mutante doble <i>mtcu-2;mttu-1</i> mediante la tinción in vivo con (A) TMRE y (B) MitoTracker Red	113
Figura R14. Determinación de la relación AMP/ATP en extractos de la cepa salvaje (N2), los simples mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y los dobles mutantes <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i> por HPLC	114
Figura R15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA por PCR cuantitativa en la cepa N2 y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y los mutantes dobles <i>mtcu-1;mtcu-2</i> y <i>mtcu-2;mttu-1</i>	115
Figura R16. Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>ucp-4</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> , por PCR cuantitativa a partir de un extracto de RNA total	116
Figura R17. Cuantificación de los niveles de mensajero de <i>hsp-6</i> y <i>hsp-60</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	118
Figura R18. Cuantificación de los niveles de mensajero de <i>pfk-1.1</i> , <i>fgt-1</i> y <i>ldh-1</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	119
Figura R19. Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>acs-17</i> y <i>acd-12</i> , que transcriben proteínas directamente implicadas en la vía de la oxidación de ácidos grasos, en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	120
Figura R20. Expresión de <i>glna-1</i> en la cepa salvaje y los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i>	121
Figura R21. Fertilidad de los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	123
Figura R22. Duración del ciclo reproductivo en los mutantes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> , <i>mtcu-2</i> y <i>mtcu-1;mtcu-2</i>	124
Figura R23. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce esterilidad, letalidad embrionaria y defectos en el desarrollo de <i>C. elegans</i>	126
Figura R24. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce defectos en las gónadas de <i>C. elegans</i>	128
Figura R25. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 promueve longevidad en <i>C. elegans</i>	129
Figura R26. El silenciamiento específico de <i>mtcu-2</i> en la línea germinal del mutante <i>mttu-1</i> promueve longevidad a 25°C	131

Figura R27. El silenciamiento de <i>mtcu-2</i> en el tejido somático de un mutante <i>mttu-1</i> induce defectos en el desarrollo de <i>C. elegans</i> , mientras que su inactivación en tejido germinal provoca esterilidad a 25°C	132
Figura R28. Efecto del silenciamiento de <i>daf-2</i> sobre la longevidad de las cepas N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	134
Figura R29. Efecto del silenciamiento de <i>daf-15</i> o <i>rict-1</i> sobre la supervivencia de las cepas N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	135
Figura R30. Efecto del silenciamiento independiente de <i>kri-1</i> , <i>daf-9</i> y <i>daf-12</i> en la supervivencia de la cepa <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	139
Figura R31. Efecto del silenciamiento independiente de <i>aak-1</i> y <i>aak-2</i> en la supervivencia de la cepa <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	142
Figura R32. Efecto del silenciamiento de <i>hsp-6</i> en la supervivencia de N2 y <i>mtcu-2;mttu-1</i> a 25°C	143
Figura D1. Metabolismo mitocondrial en los mutantes simples <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> de <i>C. elegans</i>	158
Figura D2. Hipotéticas rutas de señalización de longevidad en el doble mutante <i>mtcu-2;mttu-1</i>	163

Índice de tablas

Tabla I1. Desviaciones del código genético universal en la mitocondria	8
Tabla I2. Hipótesis de tambaleo y sus posteriores variaciones por las modificaciones post-transcripcionales en el lazo anticodón	9
Tabla I3. Cadena de reacciones del ciclo del TCA	12
Tabla I4. Destino metabólico de los aminoácidos en el ciclo del TCA	13
Tabla I5. Tiempo de desarrollo de <i>C. elegans</i> a diferentes temperaturas de crecimiento	27
Tabla M1. Relación de cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	53
Tabla M2. Listado de cepas de <i>C. elegans</i> utilizadas en este estudio	55
Tabla M3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo	59
Tabla M4. Condiciones cromatográficas para resolver los nucleósidos previamente a ser analizados por un espectrómetro de masas	75
Tabla M5. Datos de fragmentación de los nucleósidos en el espectrómetro de masas.....	76
Tabla M6. Condiciones de separación cromatográfica para detectar ATP y AMP	81
Tabla M7. Ejemplo de una mezcla de reactivos y muestra para amplificar mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real	82
Tabla R1. Información sobre los genes <i>mttu-1</i> , <i>mtcu-1</i> y <i>mtcu-2</i> y sobre las proteínas que codifican, MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-1	93
Tabla R2. Porcentaje de identidad de secuencia y similitud de las proteínas de <i>C. elegans</i> con sus homólogas en <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i> calculado a partir del alineamiento de secuencia realizado utilizando el programa BLAST (NCBI)	93
Tabla R3. Datos estadísticos de los ensayos de silenciamiento y longevidad	144

Abreviaturas

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

Arg: Arginina

cDNA: DNA complementario

CGC: Caenorhabditis Genetics Center

CI-CV: Complejo I – Complejo V del sistema OXPHOS

cmnm: Carboximetilaminometil

DIC: Differential Interference Contrast (Contraste de interferencia diferencial)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: RNA de doble cadena

DTC: Distal tip cell (célula del extremo distal)

ETC: Cadena de transporte de electrones

FAD: Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)

GDP: Guanosín difosfato

GFP: Proteína verde fluorescente

Gln: Glutamina

Glu: Glutámico

GTP: Guanosín trifosfato

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)

L1-L4: Estadios larvarios de *C. elegans*, siendo L1 el más joven y L4 el más mayor

Leu: Leucina

Lys: Lisina

MCS: Sitio de clonación múltiple

MELAS: Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular

MERRF: Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas

MEM: Membrana externa mitocondrial

MIM: Membrana interna mitocondrial

mm: metilaminometil

mRNA: RNA mensajero

mtDNA: DNA mitocondrial

mTHF: metilen tetrahidrofolato
mt-tRNA: tRNA mitocondrial
NAD: Nicotinamida adenín dinucleósido (forma oxidada)
NADH: Nicotinamida adenín dinucleósido (forma reducida)
nDNA: DNA nuclear
ORF: Pauta abierta de lectura
OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RNA: Ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rRNA: RNA ribosómico
rpm: revoluciones por minuto
s: tiol
Ser: Serina
snoRNA: RNA pequeño nucleolar
snRNA: RNA pequeño nuclear
Sp: Espermateca
TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico
THF: Tetrahidrofolato
tmRNA: RNA mensajero de transferencia
TOR: Target-of-rapamycin
TMRE: Tetrametilrodamina etil éster
tRNA: RNA de transferencia
Trp: Triptófano
U₃₄: Uridina de la posición de tambaleo
UCP: Proteína desacopladora
UPRcit: Cytosol Unfolded Protein Response
UPRer: Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response
UPRmt: Mitochondrial Unfolded Protein Response
l, ml, µl: litro, mililitro, microlitro
h, min, s: hora, minuto, segundo

Introducción

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto
y pensar lo que nadie más ha pensado”*

Albert Szent-Györgi

1. Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos presentes en la mayoría de las células eucariotas donde desempeñan funciones cruciales. Además de ser las responsables de la producción de la mayoría del ATP celular a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, abreviatura de su denominación inglesa), las mitocondrias participan en importantes rutas metabólicas, homeostasis de iones, control del estado redox, muerte celular y señalización intracelular, entre otras funciones.

En los últimos años, ha ganado importancia el papel de la mitocondria como orgánulo señalizador. La integración del funcionamiento mitocondrial dentro de la célula depende de rutas de señalización anterógradas y retrógradas. La regulación anterógrada integra señales provocadas por estímulos externos e internos para activar programas genéticos nucleares que ajusten la función mitocondrial a las necesidades de la célula. La señalización retrógrada incluye diversas rutas desde la mitocondria al núcleo que influyen las actividades celulares y del organismo en respuesta a estados funcionales de la mitocondria. Elementos claves para esta señalización retrógrada son los ratios AMP/ATP y NAD⁺/NADH, niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), niveles de Ca²⁺ intracelular y péptidos generados a partir de proteínas intramitocondriales, entre otros (Reinecke et al. 2009; Haynes and Ron 2010; Whelan and Zuckerbraun 2013; Chandel 2014). Así pues, la mitocondria, mediante la señalización retrógrada, puede tener un papel crítico en diversos procesos celulares como progresión de ciclo celular, diferenciación, desarrollo, respuestas inmunes y muerte celular por apoptosis (Nunnari and Suomalainen 2012). Actualmente, la información sobre las rutas activadas por las señales mencionadas es escasa, constituyendo, por ello, un campo de investigación muy activo. A este respecto, es importante resaltar que la señalización retrógrada representa una respuesta adaptativa de la célula pero que, cuando los sistemas de adaptación son sobrepasados, se produce una desregulación persistente con graves consecuencias para el organismo. Esto es lo que ocurre en determinadas patologías humanas que se examinarán más adelante.

1.1. Historia, evolución y estructura de la mitocondria

Las primeras observaciones de las mitocondrias como estructuras intracelulares datan de la mitad del siglo XIX. Altmann en 1890 (Altmann 1890) las describió como unos “organismos elementales” que viven dentro de las células y llevan a cabo funciones vitales. Sin embargo, no fue hasta 8 años más tarde, cuando Benda denominó a este orgánulo con el nombre con el que ahora se conoce, “mitocondria” según su apariencia durante la espermatogénesis, “mitos” (hilo) y “chondros” (gránulo) (Benda 1898). La primera descripción de Altmann fue bastante acertada ya que, en la actualidad, se acepta que las mitocondrias han evolucionado de una eubacteria endosimbionte ancestral que finalmente se estableció como huésped en una célula eucariota. Su estructura recuerda a la de un procarionta, ya que cada mitocondria está recubierta de dos membranas altamente especializadas con funciones muy diferentes entre sí. Ambas membranas crean dos compartimentos mitocondriales diferenciados, la matriz mitocondrial y un estrecho espacio intermembrana (figura I1). La membrana externa es permeable, por lo que el espacio intermembrana es similar al citoplasma en cuanto a la cantidad de moléculas de pequeño tamaño. Sin embargo, la membrana interna está muy especializada y es impermeable, de manera que la matriz mitocondrial está químicamente compuesta por una selección de moléculas y por numerosos enzimas que participan en las rutas biosintéticas y que han sido activamente transportados por numerosos transportadores. Esta membrana interna suele presentar intrincadas dobleces denominadas crestas que se proyectan hacia la matriz para aumentar su superficie. Aunque su morfología se define típicamente como cilíndrica, son orgánulos muy plásticos de gran dinamismo, pues son capaces de fusionarse y fisiónarse en respuesta a diferentes condiciones y estímulos.

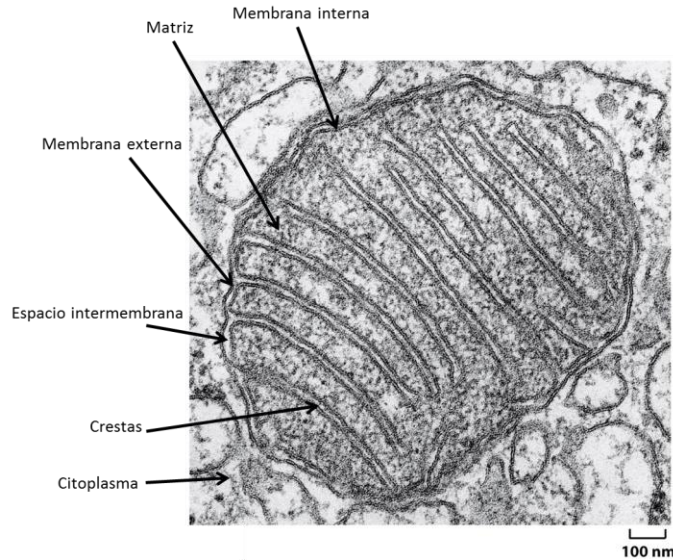


Figura I1. Sección de una mitocondria en el microscopio electrónico (adaptado de (Alberts et al. 2008)). Se identifican los componentes mitocondriales: membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna, crestas y matriz.

1.2. El genoma mitocondrial

La mitocondria contiene su propio genoma (mtDNA), reminiscencia del cromosoma de la bacteria ancestral originaria. La relación simbiótica establecida permitió la transferencia de un gran número de genes desde el genoma mitocondrial al nuclear, aunque ciertos genes se perdieron debido a que el genoma de la célula huésped contenía genes capaces de substituir sus funciones o porque ya no eran necesarias (Gray et al. 2001).

Las 16.569 pb que componen el genoma mitocondrial (mtDNA) humano se encuentran compactadas en un genoma circular de doble hebra que fue completamente secuenciado en 1981 (Anderson et al. 1981) y revisado en 1999 (Andrews et al. 1999). Éste genoma, que se muestra en la figura I2, contiene únicamente 37 genes que codifican para 13 proteínas, todas ellas pertenecientes a los complejos del sistema OXPHOS, dos RNAs ribosomales (rRNAs) (12S y 16S) y 22 RNAs de transferencia (tRNAs) necesarios para la traducción de las proteínas (Anderson et al. 1981). De las 13 proteínas codificadas 7 son subunidades del complejo I, 1 subunidad pertenece al complejo III, 3 son subunidades del complejo IV y 2 son subunidades del complejo V. Sin embargo, éstas son sólo un número minoritario de proteínas del total mitocondrial (aproximadamente 1500 proteínas que varían según el tipo celular y las condiciones), por lo que el resto de ellas están

codificadas por el genoma nuclear y son importadas a la mitocondria por mecanismos especializados (Mokranjac and Neupert 2005; Neupert and Herrmann 2007; Schmidt et al. 2010).

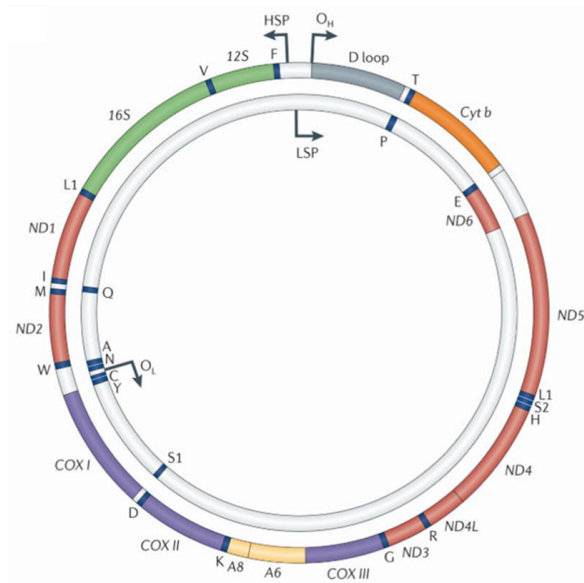


Figura 12. Genoma mitocondrial humano. Se representan ambas cadenas del mtDNA. El genoma codifica para dos rRNAs (16S y 12S, verde), 22 mt-tRNAs (azul oscuro) que se identifican según el sistema de abreviación de una letra (ejemplos, L=leucina y K=Lisina) y 13 genes que codifican para proteínas del sistema OXPHOS: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 del complejo I (rojo); Cyt b del complejo III (naranja); COXI, COXII y COXIII del complejo IV (morado); y A6 y A8 del complejo V (amarillo).

La genética mitocondrial difiere considerablemente de la genética Mendeliana y algunas de sus peculiaridades son las siguientes: herencia exclusivamente materna (Giles et al. 1980), poliploidía y una desviación del código genético estándar. Cada célula contiene cientos o miles de copias del genoma mitocondrial; cuando todas las copias son idénticas se conoce como homoplasmia; el caso contrario, en el que se mezclan dos poblaciones de mtDNA en la misma célula, se denomina heteroplasmia. Cada mitocondria tiene entre 6 y 10 copias de mtDNA en la matriz que se organizan en macrocomplejos junto a proteínas clave para su replicación, mantenimiento, reparación y recombinación; estos macrocomplejos se asocian a la membrana interna mitocondrial (Wang and Bogenhagen 2006; Holt et al. 2007). El mtDNA está continuamente renovándose y su replicación es independiente de la del genoma nuclear y del ciclo celular (Bogenhagen and Clayton 1977). La replicación del mtDNA es un mecanismo complejo que,

al igual que su transcripción y traducción, requiere de factores codificados por el núcleo (Clayton 1991; Fish et al. 2004).

La transcripción del mtDNA se inicia desde tres posiciones distintas y suele producir transcritos policistrónicos que necesitan ser procesados para producir rRNAs, mRNAs y tRNAs individuales (Ojala et al. 1981; Clayton 1991).

La traducción mitocondrial cuenta con mecanismos que, debido al origen evolutivo de la mitocondria, están más relacionados con los procesos de traducción bacteriana que con los que ocurren en el citoplasma de las células eucariotas. Mientras el mtDNA aporta los rRNAs y tRNAs necesarios para el funcionamiento de la maquinaria de traducción, todos los componentes proteicos de esta maquinaria, tales como las proteínas ribosomales, las aminoacil-tRNA sintetasas, las proteínas modificadoras de los mt-tRNA (tRNAs mitocondriales) y los factores de iniciación y factores de finalización de la traducción, son codificados por el núcleo.

1.3. El código genético y las modificaciones del tRNA

El proceso de traducción mitocondrial sigue unas reglas de “traducción” denominadas código genético y que fueron descubiertas en la década de los 60. El código genético mitocondrial difiere ligeramente del código universal (figura 13), específicamente en el significado de un pequeño grupo de codones (tabla 11).

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

Figura 13. Código genético universal. El código genético se organiza en 16 cajas de codones. En ellas, la primera y segunda letras de cada codón están fijadas, dejando la tercera letra variable en cada una de ellas. Las cajas familiares son aquellas en las que cuatro codones (sólo diferentes en la tercera letra) codifican para un mismo aminoácido (moradas). Las cajas mixtas son aquellas en las que los cuatro codones codifican para más de un aminoácido en función

de la tercera base (amarillas). Las cajas verdes contienen aminoácidos que únicamente están codificados por un codón (como es el caso Met o Trp). Finalmente, existen tres codones que señalizan la terminación de la traducción, ya que no son reconocidos por ningún tRNA, y se denominan codones de parada (rojo).

Tabla I1. Desviaciones del código genético universal en la mitocondria.

CODON	"UNIVERSAL" CODE	MITOCHONDRIAL CODES			
		MAMMALS	INVERTEBRATES	YEASTS	PLANTS
UGA	STOP	<i>Trp</i>	<i>Trp</i>	<i>Trp</i>	STOP
AUA	Ile	<i>Met</i>	<i>Met</i>	<i>Met</i>	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	<i>Thr</i>	Leu
AGA } AGG }	Arg	<i>STOP</i>	<i>Ser</i>	Arg	Arg

Desviaciones del código genético universal en la mitocondria de diversos grupos de eucariotas (mamíferos, invertebrados, levaduras y plantas). Las cursivas en rojo indican que son desviaciones del código universal. (Alberts et al. 2008)

En 1966, Crick postuló la hipótesis del tambaleo, en la que propuso que la interacción entre los dos primeros ribonucleósidos del triplete y el tRNA era mayor que la de la tercera posición, cuyo puente de hidrógeno resulta más débil. La relajación en el emparejamiento de las bases (tambaleo) permite que el anti-codón de un único tipo de tRNA se empareje con más de un triplete de mRNA (tabla I2). Posteriormente, se descubrió que la presencia de modificaciones en ciertas bases del lazo anticodón, fundamentalmente las situadas en la posición 34 (primera base del anticodón y que aparee con la tercera del codón o posición de tambaleo) y 37 (base adyacente a la que aparee con la primera base del codón), modulan su capacidad de apareamiento y, por tanto, de descodificación, dando lugar al denominado código genético ampliado (tabla I2). Las modificaciones son grupos químicos de diferente naturaleza que son introducidos post-transcripcionalmente en determinadas posiciones de los tRNAs por enzimas específicas (El Yacoubi et al. 2012). Hay modificaciones en la uridina situada en la posición 34 de los tRNAs (U_{34}) que descodifican codones de cajas mixtas cuya función es restringir el tambaleo de esta uridina, facilitando el apareamiento con los codones terminados en purinas (NNA/NNG) e impidiendo el apareamiento con los codones terminados en pirimidinas (NNC/NNU). Sin embargo, hay otras modificaciones que afectan a la U_{34} de los tRNAs que descodifican codones de cajas familiares que tienen la función contraria, es decir, ampliar la capacidad de tambaleo de la U_{34} permitiéndole aparearse con codones terminados en pirimidinas. Las modificaciones en la purina universal situada

en la posición 37 son cruciales para estabilizar apareamientos con codones que tienen pirimidinas en la primera posición.

Tabla 12. Hipótesis de tambaleo y sus posteriores variaciones por las modificaciones post-transcripcionales en el lazo anticodón (Agris et al. 2007).

Hipótesis de tambaleo		Hipótesis de tambaleo con nucleósidos modificados		Hipótesis de tambaleo extendida	
Anticodón N ₃₄	Codón N ₃	Anticodón N ₃₄	Codón N ₃	3'-adyacente-37	32·38,39
G	C, U	G	C, U	t ⁶ A	C32·A38
C	G	C	G	m ⁶ A	Ψ39
I	U, C, A	I	U, C, A	m ¹ G	
U	A, G	xm ⁵ U *	G	wye	
		s ² U **	A, G		
		xo ⁵ U ***	A, G, U (C)		

* Todos los derivados de la 5'-metilen uridina, excepto los 2'-tiolados
 ** Todos los derivados de la 2'-tiouridina
 *** Todos los derivados de la 5'-oxiuridina

El uso de codones de la mitocondria es más relajado, ya que, mientras en bacterias o citoplasma hay 30 o más especies de tRNA, en mitocondrias hay solo 22 mt-tRNAs para traducir el código. Merece destacarse que los mt-tRNAs tienen menos modificaciones que los bacterianos o los citosólicos. Sin embargo, conservan modificaciones cruciales en el lazo anticodón que describiremos más adelante.

1.4. Sistema OXPHOS

La mitocondria se ha considerado como el orgánulo bioenergético de la célula gracias a la actividad de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), residente en la membrana interna, que acopla la fosforilación de ADP para producir ATP con la transferencia de electrones a través de una cadena de reacciones de oxidación-reducción. Este proceso lo realiza una cadena de complejos denominada cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (ETC, abreviatura de su denominación inglesa), que está formada por cinco complejos multiproteicos (CI o

NADH:ubiquinone oxidoreductase, CII o succinate:ubiquinone reductase, CIII o ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase, CIV o cytochrome c oxidase y CV o ATP syntase) y dos transportadores de electrones móviles (ubiquinona o coencima Q y citocromo c) embebidos en la membrana mitocondrial interna. Aproximadamente 85 proteínas componen estos complejos OXPPOS pero únicamente 13 de ellas están codificadas por el genoma mitocondrial humano (tal como se ha comentado en el apartado 1.2). Cabe destacar que el CII es el único complejo cuyas subunidades están todas codificadas por el nDNA.

La figura I4 muestra un esquema de la ETC y su función. La entrada de equivalentes de reducción, en forma de NADH y FADH₂, en la cadena respiratoria se realiza a través de CI o CII. El CI oxida NADH y genera dos electrones que son transferidos a la ubiquinona, el primer aceptor de electrones de la cadena. Por su parte, el CII transfiere los electrones desprendidos de la oxidación del FADH₂ por la succinato deshidrogenasa a la ubiquinona. Los electrones de la ubiquinona son consecutivamente transferidos al complejo III, posteriormente al citocromo c, que es el segundo aceptor de electrones móvil, y finalmente al complejo IV. Este último reduce el O₂ a H₂O gracias a los electrones transferidos, de ahí que este proceso también se conozca por el nombre de respiración mitocondrial.

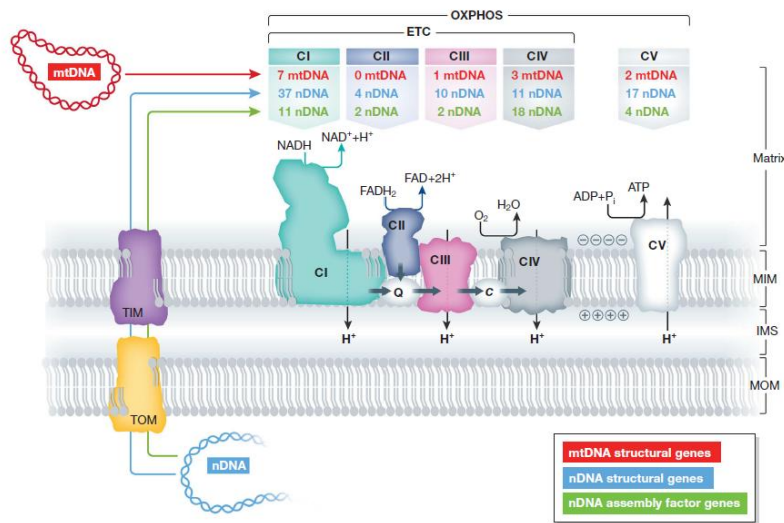


Figura I4. Representación de la ETC y el sistema OXPPOS. En rojo se indican el número de subunidades codificadas por el mtDNA que forman parte de cada uno de los complejos. En azul, aquellas que están codificadas por el nDNA y en verde los factores de ensamblaje codificados por el nDNA que son necesarios para ensamblar correctamente cada uno de los complejos de la ETC. También se muestra la entrada de equivalentes reducidos a través de CI y CII, los aceptores de electrones y las reacciones de transferencia de electrones (flechas azules entre los complejos). Finalmente, las flechas negras a través de la MIM

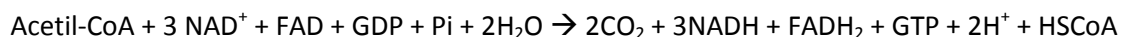
(membrana interna mitocondrial) representan el bombeo de protones que crea el potencial de membrana mitocondrial necesario para sintetizar ATP. Imagen extraída de (Koopman et al. 2013).

Los complejos I, III y IV acoplan la transferencia de electrones con el bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana para crear y mantener el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Esta diferencia de potencial electroquímico se utiliza para promover el cambio conformacional del CV que resulta en la producción de ATP por fosforilación de ADP (Schultz and Chan 2001; Rees et al. 2009). El correcto acoplamiento y sincronización de todos los complejos OXPHOS asegura la elevada eficiencia en el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa.

1.5. Metabolismo mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo muy activo cuya función no es únicamente la producción de energía, sino que en su matriz ocurren numerosos procesos metabólicos centrales y el transporte de estos metabolitos regula múltiples rutas anabólicas y catabólicas en la célula.

La oxidación del piruvato en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), o también llamado ciclo de Krebs, produce la mayor parte del ATP utilizado por las células, ya que los equivalentes de reducción productos del ciclo del TCA (NADH y FADH_2) son utilizados por el sistema OXPHOS para la producción de ATP. El piruvato es transportado a la matriz mitocondrial después de haber sido obtenido a partir de glucosa en el citoplasma por la ruta metabólica denominada glicólisis, ejemplificada en la figura I5. Una vez en la matriz mitocondrial, la enzima piruvato deshidrogenasa utiliza el piruvato para producir CO_2 , acetil-CoA y NADH. NADH es utilizado por el sistema OXPHOS y el acetil-CoA inicia el ciclo del TCA, ya que la enzima citrato sintasa condensa el acetil-CoA con el oxalacetato para producir citrato. En el ciclo del TCA participan diversos enzimas que provocan una cadena de reacciones metabólicas, resumidas en la tabla I3, que transforman sucesivamente los productos de la reacción anterior, con la finalidad de liberar 2 moléculas de CO_2 , 3 de NADH y una de FADH_2 al finalizar el ciclo. Por tanto, la estequiometría de la reacción es la siguiente:



Tras la cadena de reacciones, se vuelve a obtener una molécula de oxalacetato que puede ser condensado con el acetil-CoA libre para iniciar el ciclo de nuevo.

Tabla I3. Cadena de reacciones del ciclo del TCA.

SUSTRATO	ENZIMA	PRODUCTO
Acetil-CoA + 2-oxalacetato	Citrato sintasa	Citrato
Citrato	Aconitasa	Isocitrato
Isocitrato	Isocitrato deshidrogenasa	α -cetoglutarato* + CO ₂ + NADH + H ⁺
α -cetoglutarato*	Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa	Succinil-CoA + CO ₂ + NADH + H ⁺
Succinil-CoA	Succinil-CoA sintetasa	Succinato + GTP
Succinato	Succinato deshidrogenasa (subunidad del CII de la ETC)	Fumarato + FADH ₂
Fumarato	Fumarasa	Malato
Malato	Malato deshidrogenasa	2-Oxalacetato

La tabla muestra las reacciones metabólicas del ciclo del TCA, los sustratos, productos y enzimas que los metabolizan.*también conocido como 2-oxoglutarato.

No siempre el acetil-CoA es obtenido a partir del piruvato (que proviene de la glicólisis), sino que también se produce gracias a la ruta catabólica de la β -oxidación de los ácidos grasos como ejemplifica la figura I5. En el citoplasma, las moléculas de ácidos grasos de cadena larga son procesadas por diversos enzimas para producir acil-CoA graso (“fatty acyl-CoA”) y, posteriormente, acil-CoA que puede ser transportado a la matriz mitocondrial. El acil-CoA de cadena par puede, entonces, ser oxidado por esta ruta (β -oxidación) que consiste en 4 pasos enzimáticos principales (deshidrogenación, hidratación, oxidación y tiolisis) y que resulta en la liberación de dos carbonos (que forman el acetil-CoA utilizado por el ciclo del TCA) y de una molécula de NADH y otra de FADH₂. Se realizan tantos ciclos de β -oxidación como sean necesarios para romper todo el ácido graso. Por otra parte, la oxidación de los ácidos grasos de cadena impar resulta en acetil-CoA y propionil-CoA. Éste último puede ser posteriormente convertido a succinil-CoA, un intermediario del ciclo del TCA (revisado en (Koopman et al. 2013)).

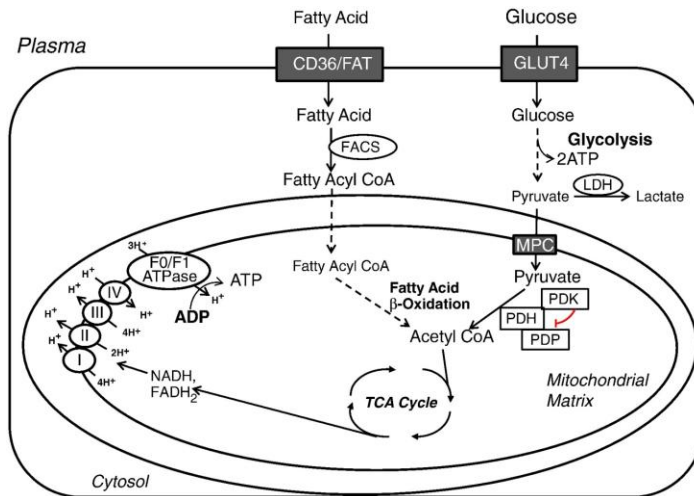


Figura 15. Esquema de la relación entre las rutas metabólicas de la glucosa, los ácidos grasos y el ciclo del TCA en la mitocondria. La oxidación de los ácidos grasos y el catabolismo de la glucosa convergen en la producción de acetil-CoA que se integra en el ciclo del TCA para producir equivalentes reducidos que son utilizados por el sistema OXPHOS. Ilustración extraída de (Fillmore and Lopaschuk 2013).

Asimismo, el catabolismo de los aminoácidos también es una de las mayores rutas de obtención de energía celular, ya que estas moléculas no se almacenan y su procesamiento libera intermediarios del ciclo del TCA. Para este fin, los aminoácidos deben ser desaminados y, posteriormente, en función de la naturaleza de cada uno de ellos, ser procesados para dar piruvato, acetil-CoA o intermediarios del ciclo del TCA (α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y oxalacetato) (tabla I4).

Tabla I4. Destino metabólico de los aminoácidos en el ciclo del TCA. Tabla obtenida del trabajo de (Owen et al. 2002).

Pyruvate can enter the TCA cycle after being carboxylated to oxaloacetate via pyruvate carboxylase (anaplerosis). Malate synthesized from the oxaloacetate exits the TCA cycle for gluconeogenesis. Pyruvate may also be decarboxylated to acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase complex and the acetyl-CoA then fully oxidized to CO_2 in the TCA cycle.

1. Amino acids converted to pyruvate
Alanine, serine, glycine, threonine, cysteine, tryptophan
2. Amino acids converted to oxaloacetate
Aspartate, asparagine
3. Amino acids converted to α -ketoglutarate
Glutamate, glutamine, proline, histidine, arginine
4. Amino acids converted to fumarate
Phenylalanine, tyrosine
5. Amino acids converted to succinyl-CoA
Methionine, isoleucine, valine
6. Amino acids converted to acetyl-CoA
Leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, threonine

Un ejemplo de este proceso es la producción de α -cetoglutarato a partir de glutamina gracias a la acción de la enzima glutaminasa. A este proceso por el cual los intermediarios del ciclo del TCA son repuestos y permiten la continuación del ciclo se denomina anaplerosis. El proceso inverso por el cual los intermediarios del ciclo del TCA deben ser eliminados de este ciclo se denomina cataplerosis (revisado en (Owen et al. 2002)).

1.6. Enfermedades mitocondriales, enfermedades OXPHOS

Las enfermedades mitocondriales son un grupo genéticamente heterogéneo de enfermedades que afectan al menos a 1 de cada 5000 personas en la población y producen manifestaciones clínicas diversas y dependientes de tejido (Reinecke et al. 2009; Tuppen et al. 2010; Ylikallio and Suomalainen 2012). Tradicionalmente, se han considerado enfermedades mitocondriales aquéllas relacionadas con la disfunción de la fosforilación oxidativa; sin embargo, una designación más específica y ampliamente aceptada en la actualidad es el de enfermedades OXPHOS para diferenciarlas de otras enfermedades asociadas con la alteración de otras funciones mitocondriales. Las células de pacientes OXPHOS se caracterizan por exhibir tasas reducidas de consumo de oxígeno, producción de ATP y potencial de membrana mitocondrial mientras que, con frecuencia, muestran mayores niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Reinecke et al. 2009; Smits et al. 2010; Boczonadi and Horvath 2014). Debido a que las proteínas del sistema OXPHOS están codificadas tanto por el mtDNA como nDNA, mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de los complejos de la ETC en estos genomas pueden producir un gran número de enfermedades OXPHOS (Finsterer et al. 2009; Kemp et al. 2011; DiMauro et al. 2013; Koopman et al. 2013; Nicholls et al. 2013; Boczonadi and Horvath 2014).

1.6.1. Mutaciones en genes mitocondriales

A causa de la complejidad de la genética mitocondrial, la expresión fenotípica de las enfermedades OXPHOS debidas a mutaciones en el mtDNA puede ser muy variada (Zeviani and Di Donato 2004) dado que: (1) el genoma mitocondrial se hereda por vía materna, por tanto, estas enfermedades también son transmitidas por esta vía (Giles et al. 1980); (2) el nivel de

heteroplasmia en el que el mtDNA mutante se encuentra también aporta variabilidad y gravedad al fenotipo e, incluso, un nivel umbral a partir del cual se observan los efectos deletéreos de las mutaciones; (3) la transmisión del mtDNA a las células hijas durante la mitosis es estocástica. Por otra parte, la variabilidad en las manifestaciones clínicas depende de un gran número de factores como la naturaleza de la mutación, el gen afectado, la carga de la mutación, su distribución por tejidos y las necesidades energéticas específicas de los mismos. Las numerosas mutaciones de mtDNA descritas hasta la fecha se recogen en MitoMap (<http://www.mitomap.org>).

Más de la mitad de las mutaciones puntuales del mtDNA que producen enfermedad están localizadas en los genes que transcriben tRNAs. Una posible explicación para esta desviación estadística es que las mutaciones puntuales en los genes que codifican proteínas en el mtDNA únicamente producen defectos en la función o estructura de la proteína afectada, sin embargo, una mutación en un mt-tRNA produce fallos en el mecanismo de traducción mitocondrial por disminuir el número de mt-tRNAs funcionales y, consecuentemente, las 13 proteínas codificadas por este genoma se ven afectadas.

1.6.2. Mutaciones en genes nucleares

Dado que el genoma nuclear codifica proteínas necesarias para el mantenimiento, transcripción y traducción del genoma nuclear, son numerosos los genes nucleares que pueden producir enfermedades OXPHOS, además de los que codifican subunidades OXPHOS o proteínas necesarias para su ensamblaje. En estos casos la herencia no está asociada a la mitocondria (y por tanto a la vía materna), sino que se transmiten según una herencia típicamente mendeliana. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de las enfermedades mitocondriales provocadas por defectos en el genoma nuclear también resultan muy variables (Zeviani and Di Donato 2004; Boczonadi and Horvath 2014), no estando claras las causas de esta variabilidad aunque se atribuyen a factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Estas enfermedades pueden clasificarse según el componente mitocondrial afectado: defectos que alteran la estabilidad del mtDNA, mutaciones que se encuentran en genes que codifican para proteínas estructurales de la cadena OXPHOS o factores de ensamblaje, defectos que ocurren en los componentes de la cadena respiratoria no proteicos, mutaciones que afectan a proteínas implicadas la replicación, transcripción y traducción del mtDNA (como proteínas ribosomales, aminoacil-tRNA sintetasas y

proteínas modificadoras de los mt-tRNAs) (Zeviani and Di Donato 2004; Smeitink et al. 2006; Boczonadi and Horvath 2014).

Más adelante, describiré con más detalle las enfermedades asociadas a defectos en la modificación de los mt-tRNAs por estar muy relacionadas con el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

2. Modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs

2.1. Los tRNAs y sus modificaciones post-transcripcionales

Como moléculas adaptadoras entre los mRNAs y las cadenas polipeptídicas durante el proceso de traducción, los RNAs de transferencia (tRNAs) son moléculas centrales en este proceso. Los tRNAs tienen una longitud de entre 55 y 90 nucleósidos según el organismo u orgánulo que los codifique y presentan una estructura característica. Su estructura secundaria es conocida por su forma de trébol y el plegamiento de esta secuencia de RNA resulta en una estructura tridimensional en forma de L.

Los nucleósidos de todas las especies de RNAs (tRNA, rRNA, mRNA, snRNA, snoRNA y tmRNA) pueden estar modificados post-transcripcionalmente, de manera que se alteran las propiedades químicas de sus nucleósidos y pueden mejorar la estabilidad, estructura y función de toda la molécula de RNA. Los tRNAs son las moléculas de RNAs más modificadas, ya que se estima que existen un 10% de nucleósidos modificados en cada molécula de tRNA (Grosjean 2009). Aproximadamente, 85 modificaciones post-transcripcionales diferentes han sido identificadas en las diversas moléculas de tRNA, siendo las posiciones 34 (posición de tambaleo) y 37 (posición adyacente a la base que aparee con la primera posición del codón) las que mayor variación de modificaciones presentan (figura 16). Estas modificaciones presentes en el lazo anti-codón son a menudo complejas y contribuyen a mejorar la eficiencia y fidelidad de la traducción del mRNA (Grosjean 2009; El Yacoubi et al. 2012).

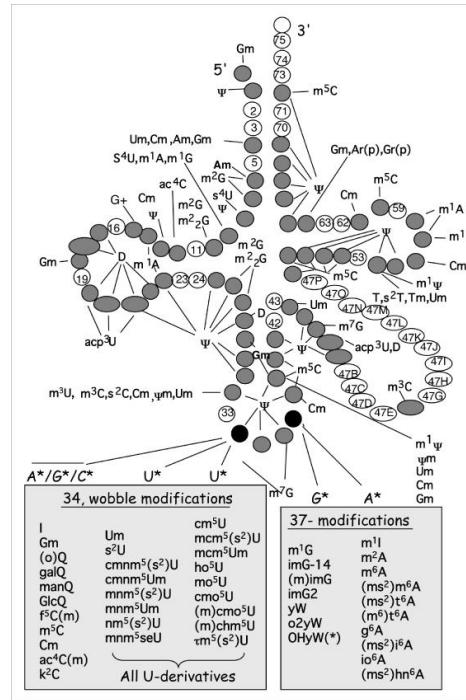


Figura 16. Representación de la estructura secundaria del tRNA y las posibles modificaciones presentes en cada una de las posiciones. Se muestran las modificaciones encontradas en todos los grupos (bacteria, hongos, eucariotas, cloroplastos, mitocondria y arquea). Imagen extraída de (Grosjean 2009). Notar el gran número de diferentes modificaciones que pueden encontrarse en las posiciones 34 y 37.

En nuestro trabajo nos centramos en las modificaciones que ocurren en la uridina de la posición de tambaleo (U₃₄) de los tRNAs que decodifican para codones NNA/NNG de cajas mixtas. Tales modificaciones pertenecen al tipo denominado xm⁵U, donde “m” representa un grupo metileno que se une directamente al carbono 5 (C₅) de la U₃₄, y “x” puede ser cualquier grupo derivado del amonio, glicina o taurina. Es ocasiones, la U₃₄ portando modificaciones xm⁵ puede llevar también un grupo tiol en la posición 2, originando modificaciones más complejas representadas como xm⁵s²U. Estas modificaciones xm⁵s²U restringen la capacidad de tambaleo de la uridina (U₃₄), ya que favorece el apareamiento con purinas (A y G) y evita el fallo de lectura (“missreading”) de los codones que acaban en pirimidinas (NNU/NNC), también conocidos como “near-cognate” (Yokoyama et al. 1985; Sasarman et al. 2011; Armengod et al. 2012; Armengod et al. 2015). Esta acción se atribuye fundamentalmente a la presencia del grupo tiol en la posición 2, mientras que ambos grupos (s² y xm⁵) de la U₃₄ son importantes para uniformizar la velocidad de

lectura de los codones NNA y NNG (dado que sin la modificación los codones terminados en A son leídos mucho más aprisa que los terminados en G), optimizando la velocidad de traducción y evitando que el ribosoma avance más lentamente en determinadas regiones, un comportamiento que puede promover el cambio de pauta durante la lectura del mRNA o “frameshifting” traduccional (Hagervall et al. 1998; Kruger et al. 1998; Brégeon et al. 2001; Westhof et al. 2014).

2.2. Enzimas modificadoras de la U₃₄ de tRNAs que leen codones de cajas mixtas acabados en purinas (NNA/NNG)

Las modificaciones del tipo xm⁵ y xm⁵s²U resultan de la actividad de proteínas que están conservadas evolutivamente desde bacterias a humanos (Armengod et al. 2012; El Yacoubi et al. 2012; Armengod et al. 2015). Se trata de las proteínas homólogas a las bacterianas MnmE y MnmG, que forman un complejo enzimático encargado de modificar la posición 5 de las U₃₄, y MnmA, encargada de la tiolación en la posición 2. En eucariotas, las homólogas de estas tres proteínas localizan en mitocondria donde modifican tRNAs mitocondriales.

En *Escherichia coli*:

En *E. coli*, la uridina de tambaleo (U₃₄) de tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU}, tRNA^{Glu}_{mnm5s2UUC}, tRNA^{Gln}_{(c)mnm5s2UUG}, tRNA^{Leu}_{cmn5UmAA}, tRNA^{Gly}_{mnm5UCC} y tRNA^{Arg}_{mnm5UCU} está modificada por la acción independiente de MnmE-MnmG y MnmA, tal como muestra la figura 17.

Las proteínas MnmE y MnmG de *E. coli* forman un complejo α2β2 (MnmEG) que cataliza la incorporación del grupo carboximetilaminometil o aminometil en la posición 5 utilizando glicina o amonio como sustrato respectivamente (Moukadiri et al. 2009). Ambas reacciones requieren GTP, FAD y un derivado del tetrahidrofolato (THF), el metilen-THF (mTHF). MnmE es una proteína que une GTP y tetrahidrofolato (THF), mientras que MnmG es una proteína de unión a FAD y NADH (Cabedo et al. 1999; Scrima et al. 2005; Yim et al. 2006; Moukadiri et al. 2009). Por su parte, MnmA es responsable de la incorporación del grupo tiol en la posición 2 de la U₃₄ en el tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU}, tRNA^{Glu}_{mnm5s2UUC} y tRNA^{Gln}_{(c)mnm5s2UUG} (Lauhon 2002; Kambampati and Lauhon 2003; Ikeuchi et al. 2006) (figura 17).

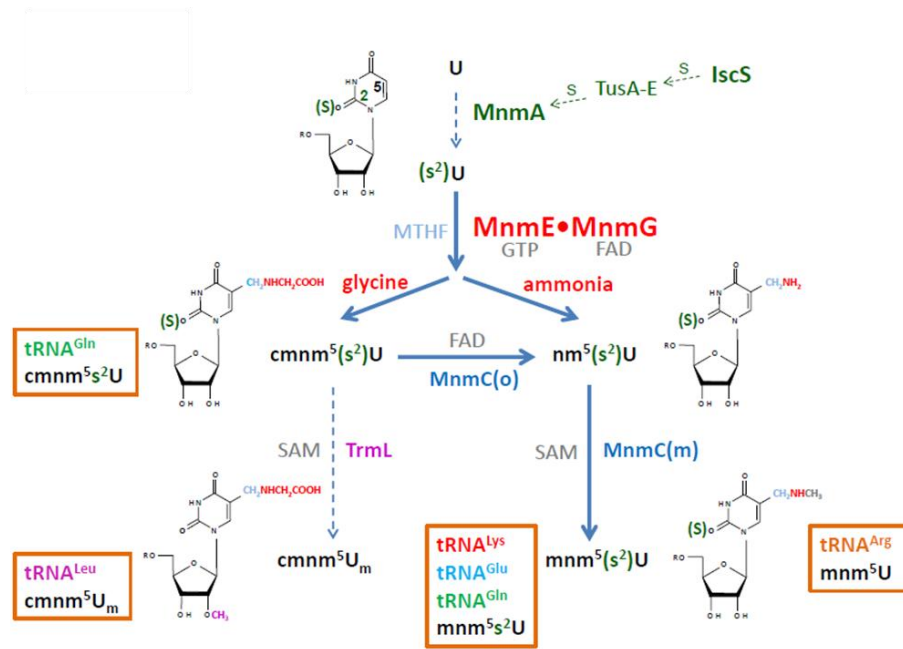


Figura 17. Rutas de modificación de la U₃₄ controladas por las proteínas MnmE-MnmG y MnmA en *E. coli*.

El complejo MnmEG actúa sobre la posición 5 de la U₃₄ de tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU}, tRNA^{Glu}_{mnm5s2UUC}, tRNA^{Gln}_{(c)mnm5s2UUG}, tRNA^{Leu}_{cmnm5UAAA} y tRNA^{Arg}_{mnm5UCU}. La reacción de tiolación en la posición 2 de la U₃₄ es catalizada por MnmA en el tRNA^{Lys}_{mnm5s2UUU}, tRNA^{Glu}_{mnm5s2UUC} y tRNA^{Gln}_{(c)mnm5s2UUG}, mientras que TrmL, una enzima no conservada dependiente de SAM, metila el grupo 2'-OH de la ribosa de la U en el tRNA^{Leu}_{cmnm5UAAA}. MnmA recibe el azufre (S) donado por IscS (otra enzima conservada hasta humanos) a través de una ruta en la que participan otras proteínas (TusA-E). La posición de MnmA en el esquema es arbitraria ya que MnmEG y MnmA actúan independientemente, por lo que la tiolación puede preceder o seguir a la modificación en la posición 5. MnmC es una enzima bifuncional no conservada en *E. coli* y otras bacterias que actúa sobre los productos introducidos por MnmEG. Ilustración obtenida de (Armengod et al. 2015).

En *Saccharomyces cerevisiae*:

En levadura, el homólogo de MnmA, que es conocido por MTU1, es el responsable de la tiolación de la posición 2 de la U₃₄ de los mt-tRNAs que leen los codones que descodifican para Lys, Glu y Gln. Los homólogos de MnmE y MnmG se llaman MSS1 y MTO1, respectivamente, y son los responsables de la incorporación del grupo cmnm en la posición 5 de la U₃₄ de los mt-tRNA Lys, Glu, Trp y Leu (figura 18).

En humanos:

En humanos, las proteínas homólogas a MnmA, MnmE y MnmG se designan como MTU1, GTPBP3 y MTO1, respectivamente, y utilizan como sustratos los mismos mt-tRNA que sus equivalentes en levadura. Se piensa que GTPBP3 y MTO1 están involucrados en la incorporación de taurina en lugar de glicina en la posición 5 de la U₃₄, aunque ninguna evidencia directa de su rol bioquímico ha sido demostrada hasta la fecha (Suzuki and Suzuki 2014) (figura I8). De manera que, en la mitocondria humana, los mt-tRNA Lys, Glu y Gln tienen modificada su U₃₄ con $\tau m^5 s^2$ y los mt-tRNA Trp y Leu con τm^5 .

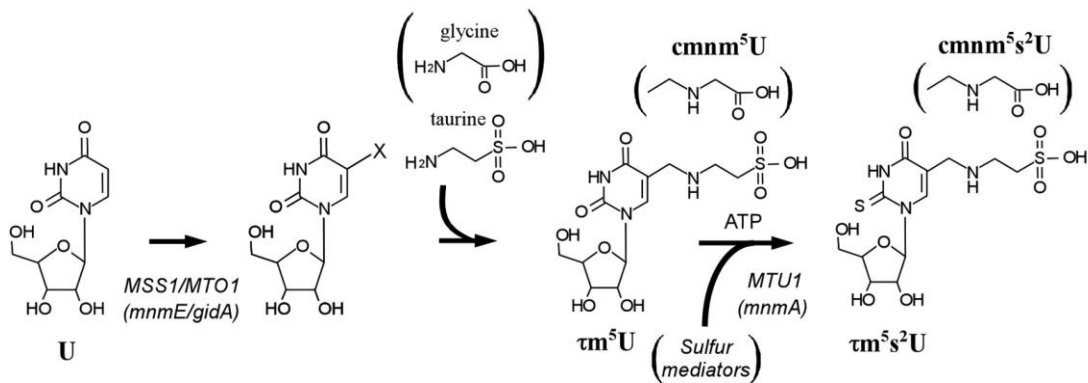


Figura I8. Ruta de modificación de la U₃₄ de mt-tRNAs en eucariotas. En levadura, las homólogas de MnmE y MnmG (MSS1 y MTO1, respectivamente) utilizan la glicina para introducir en la posición 5 de la U₃₄ el grupo cmnm⁵, mientras que en humanos GTPBP3/MTO1 utilizan la taurina, introduciendo el grupo τm^5 . En ambos casos (levadura y humanos) la homóloga de MnmA, llamada MTU1, introduce un grupo tior en la posición 2 de la U₃₄. Adaptado de (Umeda et al. 2005).

En *Ascaris suum*:

Se desconocen las enzimas que introducen la modificación en la U₃₄ de los mt-tRNAs de *A. suum*, un nematodo parásito de los cerdos, pero sí se conoce qué tipo de modificación tienen los mt-tRNAs que descodifican codones NNA/NNG de cajas mixtas en este gusano. El tamaño de estos gusanos permitió la obtención de suficiente cantidad de ciertos mt-tRNAs para identificar las modificaciones de la U₃₄ y se encontró que, de manera diferente a lo observado en los tRNAs de bacterias y en los mt-tRNAs de levadura y humanos, los mt-tRNAs que descodifican Lys, Glu y Gln

no estaban tiolados en la posición 2 y contenían el nucleósido cmnm^5U , mientras que Leu y Trp sí que lo estaban y contenían el nucleósido $\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$ (Sakurai et al. 2005).

Estas observaciones indican que el estado final de la modificación de la U_{34} en los mt-tRNAs parece ser dependiente de la especie de tRNA y del organismo.

2.3. Fenotipos producidos por la ausencia de modificación en la U_{34}

2.3.1. En *Escherichia coli*

En esta bacteria, la falta de modificación de la U_{34} dependiente de MnmE, MnmG y MnmA se ha asociado con alteraciones en la fidelidad traduccional (Elseviers et al. 1984; Sullivan et al. 1985; Brégeon et al. 2001; Urbonavicius et al. 2001; Björk and Hagervall 2005; Atkins and Bjork 2009). Las mutaciones nulas en *mnmE* o *mnmG* producen, probablemente como consecuencia del fallo en la traducción de determinadas proteínas, deficiencias en el crecimiento y una elevada sensibilidad al pH ácido (también observada en mutantes *mnmA*) (von Meyenburg et al. 1982; Gong et al. 2004; Yim et al. 2006; Moukadiri et al. 2009; Shippy et al. 2011; Faron et al. 2013; Li et al. 2014; Zhang et al. 2014; Armengod et al. 2015). Además, la combinación de mutaciones nulas en *mnmA* y *mnmE* produce letalidad sintética en determinadas condiciones de crecimiento, lo que sugiere que ambos genes son necesarios para la supervivencia de *E. coli* (Armengod et al. 2015).

2.3.2. En *Saccharomyces cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, mutaciones que anulan la actividad de las enzimas MTU1, MSS1 y MTO1 afectan la síntesis mitocondrial de proteínas y la respiración, observándose también una letalidad sintética bajo determinadas condiciones de crecimiento cuando se combinan mutaciones en MTU1 con mutaciones en MSS1 o MTO1 (Decoster et al. 1993; Colby et al. 1998; Li et al. 2002; Umeda et al. 2005; Yan et al. 2005; Wang et al. 2010).

2.3.3. En humanos

En los últimos años y gracias, en buena parte, a la introducción de técnicas de secuenciación masiva, se han identificado pacientes de enfermedades OXPHOS portadores de mutaciones en los genes nucleares *MTU1*, *MTO1* y *GTPBP3*. A destacar que los primeros pacientes fueron identificados en 2009 (*MTU1*), 2012 (*MTO1*) y 2014 (*GTPBP3*) (Zeharia et al. 2009; Ghezzi et al. 2012; Kopajtich et al. 2014). En los subapartados siguientes se describen las características asociadas a estas mutaciones, pero antes, cabe mencionar ciertas enfermedades debidas a mutaciones en el genoma mitocondrial que se asocian con la ausencia de las modificaciones producidas por *MTU1*, *MTO1* y *GTPBP3*. Se trata de dos de las encefalomiopatías mitocondriales más frecuentes (dentro de las enfermedades raras): el síndrome de la encefalopatía mitocondrial y acidosis láctica con episodios tipo ictus o MELAS (mitochondrial encephalomyopathy and lactic acidosis with stroke-like episodes) y la epilepsia mioclónica de fibras rojo-rasgadas o MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fiber) producidas por mutaciones en los genes mt-tRNA^{Leu}_(UUR) y mt-tRNA^{Lys}, respectivamente. Aparentemente, las mutaciones actúan como determinantes de identidad negativos para las enzimas *MTU1*, *MTO1* y *GTPBP3* puesto que las modificaciones, normalmente presentes en los citados mt-tRNAs ($\tau\text{m}^5\text{U}$ en tRNA^{Leu}_(UUR) y $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ en tRNA^{Lys}), están ausentes en los mt-tRNAs portadores de las mutaciones (Yasukawa et al. 2000; Kirino et al. 2006; Suzuki and Nagao 2011).

Esto refleja la complejidad que el mecanismo de modificación post-transcripcional de los mt-tRNAs entraña ya que no sólo las mutaciones en los genes que codifican para los enzimas modificadores afectan al nivel de modificación, sino que estos niveles también pueden variar por la presencia o ausencia de otras modificaciones o factores, quedando aún mucho por profundizar en los requerimientos para el funcionamiento de estas enzimas y en su regulación (Meseguer et al. 2014; Armengod et al. 2015)

Mutaciones en *MTU1*:

En humanos, las mutaciones en *MTU1* (OMIM*610230) producen fallo hepático agudo infantil y, en ocasiones, miopatía y síntomas neurológicos. Se trata de una enfermedad mitocondrial que puede revertir en algunos casos o ser letal en otros y en la que algunos

suplementos alimenticios pueden ayudar a superar la enfermedad (Zeharia et al. 2009; Schara et al. 2011; Boczonadi et al. 2013; Gaignard et al. 2013). Los pacientes con estas mutaciones muestran niveles drásticamente reducidos de tioración en los mt-tRNAs y también cantidades reducidas del conjunto total de los mt-tRNAs (Zeharia et al. 2009). La actividad enzimática de los complejos de la cadena OXPHOS en las mitocondrias aisladas de células musculares de pacientes revelan que la actividad de los complejos I, III y IV es inferior a la de los controles, lo que podría sugerir un problema en la síntesis mitocondrial de proteínas (Zeharia et al. 2009). Curiosamente, no en todos los pacientes ni tejidos celulares el proceso de traducción mitocondrial resulta dañado aunque, en aquellos en los que sí se han observado deficiencias, éstas principalmente recaen sobre los complejos I y IV (comparar los resultados de (Zeharia et al. 2009; Gaignard et al. 2013) con los de (Sasarman et al. 2011)). Dado que no se ha demostrado aún una relación directa e inequívoca del defecto OXPHOS con la síntesis mitocondrial de proteínas en células deficitarias en MTU1, el mecanismo patogénico subyacente está por resolver.

Mutaciones en *MTO1*:

Las mutaciones en *MTO1* (OMIM*614667) producen cardiomiopatía hipertrófica infantil y acidosis láctica y, en ocasiones, trastornos neurológicos (Ghezzi et al. 2012; Baruffini et al. 2013). Estas mutaciones se asocian, por lo general, con una disminución en la actividad de los complejos I y IV, una característica que podría ser consecuencia de una traducción mitocondrial defectuosa. Sin embargo, el análisis de células de algunos pacientes, que murieron en edades tempranas, no reveló un problema cuantitativo en tal síntesis. En contraste, sí que se detectó afectación en la traducción en las células de un paciente portador de una mutación diferente en homocigosis. Aunque la presentación clínica en algunos pacientes pareció depender de la severidad de la mutación, el curso de la enfermedad fue muy diferente en los pacientes de dos familias con el mismo genotipo mutante. Estos datos sugieren que otros factores genéticos o epigenéticos, así como variaciones ambientales (incluyendo tratamientos farmacológicos) pueden modular el fenotipo (Ghezzi et al. 2012; Baruffini et al. 2013; Tischner et al. 2015).

Mutaciones en *GTPBP3*:

Las mutaciones en *GTPBP3* (OMIM*608536), identificadas por primera vez en 2014 entre una muestra de pacientes con mitocondriopatías, producen cardiomiopatía hipertrófica infantil y acidosis láctica, con un 50% de los casos en los que se asocia también con síntomas neurológicos (Kopajtich et al. 2014). En los pacientes *GTPBP3*, los complejos I y IV del sistema OXPHOS presentan una actividad reducida respecto al control y en 3 de los 4 casos en los que se ha analizado la síntesis mitocondrial de proteínas se ha encontrado una disminución significativa. Curiosamente, el cuarto caso (25%) no mostró alteración en este proceso aunque el paciente murió a edad muy temprana, por lo que, de nuevo, nos encontramos con situaciones que revelan la complejidad del mecanismo subyacente y la posibilidad de que esté modulado por diversos factores.

Resumiendo la información anterior, mutaciones en *MTU1*, *MTO1* y *GTPBP3* han sido asociadas con disfunción mitocondrial, disminuyendo la actividad de CI o CIV de manera aislada o de forma combinada de CI+CIV o CIII+CIV. Sin embargo, el análisis del efecto de las mutaciones en la traducción mitocondrial ha producido resultados conflictivos. Es llamativo que no solo hay diferencias en el tipo de defectos OXPHOS encontrados entre pacientes, sino que el defecto también puede variar entre los tejidos de un paciente. Por estos motivos, la correlación entre los defectos mitocondriales traduccionales, las deficiencias OXPHOS y los síntomas clínicos permanece desconocida. Es posible, como se ha sugerido anteriormente, que el mecanismo de la enfermedad esté modulado por diferentes tipos de factores (genéticos, epigenéticos y ambientales) que expliquen la variabilidad fenotípica. Los modelos celulares resultan útiles para dilucidar parte de estos mecanismos a nivel celular, pero la gran variabilidad fenotípica entre individuos y tejidos aconseja utilizar modelos de animales que permiten comprender mejor la variabilidad entre tejidos y las rutas de comunicación entre los mismos. Para este trabajo se escogió el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

3. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo pequeño, que en la naturaleza coloniza hábitats ricos en microorganismos, como son las plantas y frutas en descomposición de muchos lugares del mundo, y que se alimenta de microorganismos, principalmente de bacterias (Félix and Braendle 2010; Frézal and Félix 2015). El nombre de este nematodo proviene del griego y del latín y significa “Caeno”-nuevo, “rhabditis”-forma de caña o vara, “*elegans*”-elegante, por lo que se podría traducir como “nuevo gusano con forma de vara elegante”. Debido a su tamaño, su rápido ciclo de vida, su elevada homología con los humanos (el 60-80% de los genes humanos tienen homólogo en *C. elegans*), su capacidad de revivir tras mantenerse congelados durante largos periodos de tiempo y de ser cultivado en un laboratorio en condiciones controladas y el potencial que ofrece para realizar ensayos genéticos con él, se ha convertido en uno de los organismos modelo más utilizado en investigación. Por este motivo, se conoce su linaje celular al completo que, además, es invariable entre los organismos. Un hermafrodita adulto contiene exactamente 959 células somáticas (302 corresponden a neuronas y 95 a pared celular), mientras que los machos adultos contienen 1031 núcleos somáticos (381 de ellos son neuronas).

El núcleo de las células de *C. elegans* contiene 5 pares de cromosomas autosómicos (I-V) y 1 cromosoma sexual (X). Existen dos individuos en relación al sexo en *C. elegans*, el hermafrodita capaz de auto-fertilizarse (XX) y el macho (XO), que sólo contiene una copia del cromosoma X y que se diferencia a partir del estadio L2 por la morfología de su cola. Los machos se generan en la población de manera espontánea, pero con una frecuencia muy baja (0,1%). El cruce de un macho con un hermafrodita aumenta la frecuencia en la que aparecen en la población (hasta un 50%) y permite realizar cruces genéticos (lo que ayuda en el aislamiento y mantenimiento de cepas mutantes, además de permitir incorporar mutaciones a diversos fondos genéticos). Los mutantes se suelen obtener por mutagénesis química o exposición a radiación ionizante.

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende diferentes estados: embrionario, larvario (de L1 a L4) y adulto, que se suceden durante los 3 primeros días del ciclo (www.wormatlas.org). Dependiendo de la temperatura de crecimiento, en el estado adulto, el gusano es capaz de sobrevivir unos 10 – 15 días tras finalizar su etapa reproductiva que dura aproximadamente 65 h. El final de cada estado larvario está determinado por un proceso de muda, en el cual se desprende la cutícula a medida que una nueva se sintetiza. La figura 19 representa los tiempos en los que

tarda en desarrollarse un gusano desde el momento de la fertilización a hasta que se convierte en adulto capaz de poner huevos durante unos 2-3 días a 22°C.

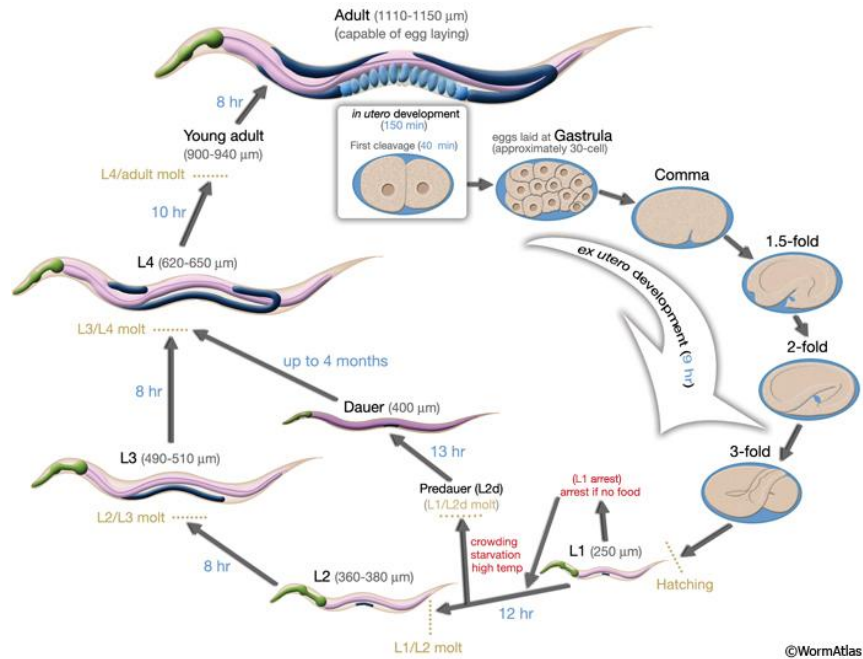


Figura 19. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. El tiempo 0 se considera el momento de la fertilización. Los números azules en las flechas indican el tiempo que el gusano se encuentra en cada estadio. La longitud del animal en cada estadio se indica en μm . Ilustración tomada de www.wormatlas.org.

La temperatura afecta a los tiempos de muda y desarrollo de *C. elegans*, puesto que una temperatura superior (25°C) acelera el ciclo de vida de este nematodo, afectando también la cantidad de huevos que son capaces de autofertilizar y poner (unos 300 huevos a 20°C y unos 200 huevos a 25°C), tal como se refleja en la tabla I5. Si en los estadios larvarios tempranos L1-L2 las condiciones ambientales no son favorables, *C. elegans* puede dar lugar a un estado de resistencia denominado dauer, que se asemeja al estado de hibernación en los mamíferos, en el que puede sobrevivir varias semanas.

Tabla 15. Tiempo de desarrollo de *C. elegans* a diferentes temperaturas de crecimiento (www.wormatlas.org).

DEVELOPMENT AT DIFFERENT TEMPERATURES			
	"16°C" (16.0 ± 0.3°C)	"20°C" (19.5 ± 0.5°C)	"25°C" (25.0 ± 0.2°C)
Egg laid	0 hr	0 hr	0 hr
Egg hatches	16-18 hr	10-12 hr	8-9 hr
First-molt lethargus	36.5 hr	26 hr	18.0 hr
Second-molt lethargus	48 hr	34.5 hr	25.5 hr
Third-molt lethargus	60.0 hr	43.5 hr	31 hr
Fourth-molt lethargus	75 hr	56 hr	39 hr
Egg-laying begins	-90 hr	-65 hr	-47 hr
Egg-laying maximal	-140 hr	-96 hr	-62 hr
Egg-laying ends	-180 hr	-128 hr	-88 hr
Maximal egg- laying rate	5.4/hr	9.1/hr	8.1/hr
Total eggs laid	275	280	170

C. elegans tiene una morfología cilíndrica y se encuentra organizado en sistemas: epitelial, alimentario, excretor, nervioso, muscular, cuticular, pericelular y reproductor.

3.1. Sistema reproductor de *C. elegans* (tejido somático y germinal)

El sistema reproductor del hermafrodita de *C. elegans*, localizado en la parte central del nematodo, produce gametos maduros y proporciona el entorno adecuado para la fertilización y la puesta de huevos. Está estructurado en tres partes: la gónada somática, la línea germinal y el aparato para la puesta de huevos. La gónada y la línea germinal forman dos brazos simétricos en forma de U que se juntan por un útero común en el centro y se denominan brazo anterior y posterior (figura I10).

La gónada somática está compuesta por la célula distal (DTC), la cubierta de la gónada, la espermateca, la válvula espermateca-uterina y el útero (figura I10). Existen dos DTCs en las gónadas, cada una situada en el extremo distal del brazo anterior y posterior rodeando a las primeras 6-10 células germinales. Cada una de las DTCs es necesaria para la correcta elongación de

la gónada y para establecer el correcto patrón mitótico-meiótico de la línea germinal (mitosis-meiosis), ya que promueve la mitosis e inhibe la meiosis de las células más cercanas. La espermateca es el lugar que contiene el esperma y, además, es el lugar en el que ocurre la fertilización de los oocitos (www.wormatlas.org).

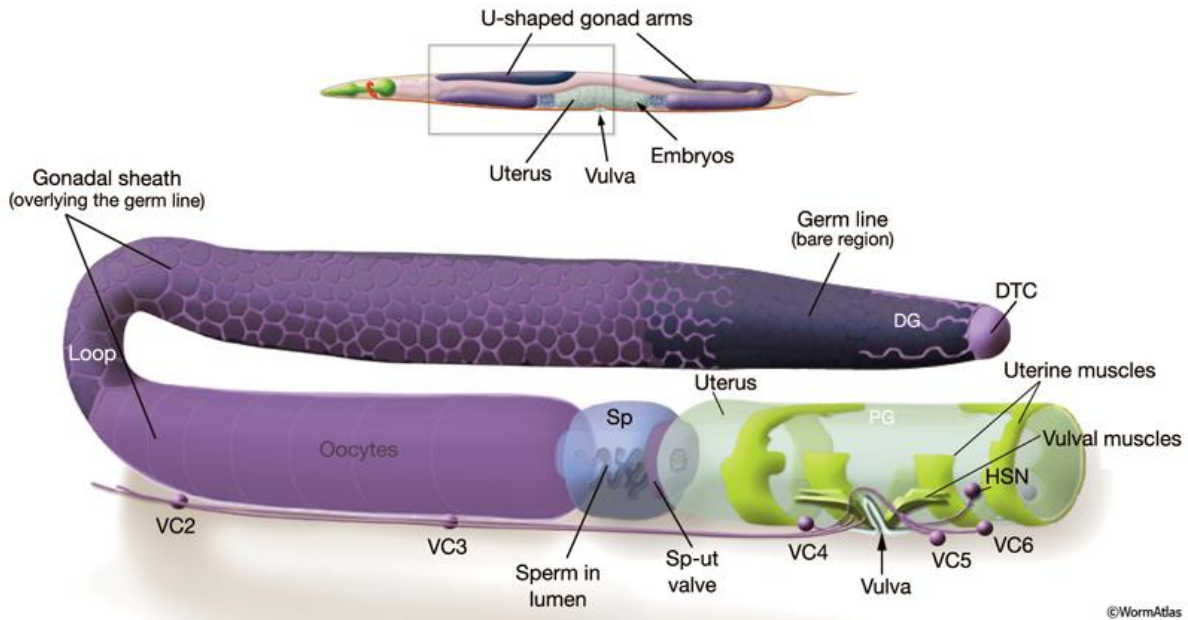


Figura I10. Sistema reproductor de un hermafrodita adulto. (Superior) Hermafrodita adulto desde una vista lateral. La parte izquierda simboliza la cabeza del gusano y la parte derecha, la cola. El sistema reproductor es simétrico y los dos brazos de la gónada en forma de U están unidos por un útero común. El sistema reproductor se abre al medio a través de la vulva, localizada en la parte central del cuerpo. (Inferior) Representación de una mitad del sistema reproductor. DTC: célula distal, DG: gónada distal, PG: gónada proximal, (Sp) espermateca, (Sp-ut): válvula espermateca-uterina, VC2-6 y HSNL/R: neuronas motoras que controlan la puesta de huevos.

A pesar de que las células que dan lugar a la línea germinal y somática comienzan a desarrollarse en la embriogénesis y en el primer estadio larvario, estos tejidos (germinal y somático) no están completamente formados hasta el estadio adulto (figura I11). Durante los estadios larvarios L1-L3, las células que darán lugar al tejido somático comienzan a multiplicarse y especializarse. Por otra parte, las células germinales proliferan más lentamente y no es hasta el estadio L3 cuando proliferan a mayor velocidad en respuesta a las señales emitidas por las DTCs,

tal como se observa en la figura I11. A partir del estadio L4 y en el gusano adulto, se cuadruplica el número de células germinales y se completa la formación de las gónadas (Hubbard and Greenstein 2005).

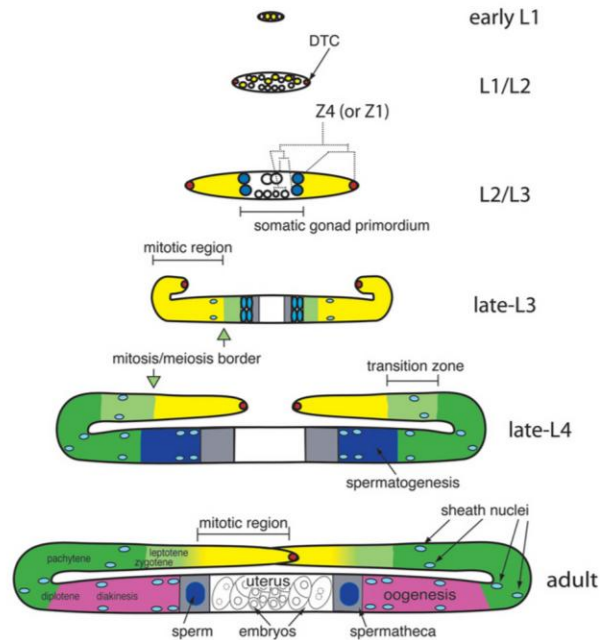


Figura I11. Ilustración del desarrollo de la gónada (tejido somático y germinal). Representación de la gónada en los diferentes estadios de desarrollo de *C. elegans*. La zona mitótica se encuentra representada en amarillo, la fase de transición en verde claro, la región cuyas células germinales se encuentran en paquiteno está representada en verde, la zona gris y azul oscuro indica el espermatozoides y espermateca y la región coloreada en rosa, la ovogénesis. La interfase mitosis-meiosis está indicada por dos flechas en el estadio L3 y L4. Imagen extraída de (Hubbard and Greenstein 2005).

La línea germinal en un hermafrodita adulto se organiza desde los extremos distales, o más cercanos a la célula DTC, al extremo proximal, que corresponde con el punto más cercano a la salida de los embriones en el nematodo. Como se aprecia en las figuras I11 e I12B, las células más cercanas al extremo distal del brazo suelen estar indiferenciadas y en un estadio mitótico; pero conforme las células se alejan del extremo distal y se acercan al proximal, progresan a través de diversas fases de la meiosis. Las células germinales distales forman un sincitio al que se conectan a través de uno de sus laterales a un canal común denominado raquis y que contiene un gran número de ribosomas libres, mitocondrias y retículos endoplásmicos rugosos (figura I12A). A

continuación se encuentra la zona de transición, en la que las células germinales entran en las primeras fases de la profase de la meiosis (leptoteno y cigoteno). Seguidamente, las células progresan en la fase de paquiteno y se detienen en este estadio para engordar gradualmente. La progresión a la siguiente fase de la meiosis, diploteno, ocurre en el bucle de la gónada y las células comienzan a organizarse en una fila a medida que entran en el brazo proximal. En esta última zona los oocitos detienen su desarrollo en estadio de diaquinesis hasta que maduran completamente, momento en el cual se produce la ovulación y la fertilización.

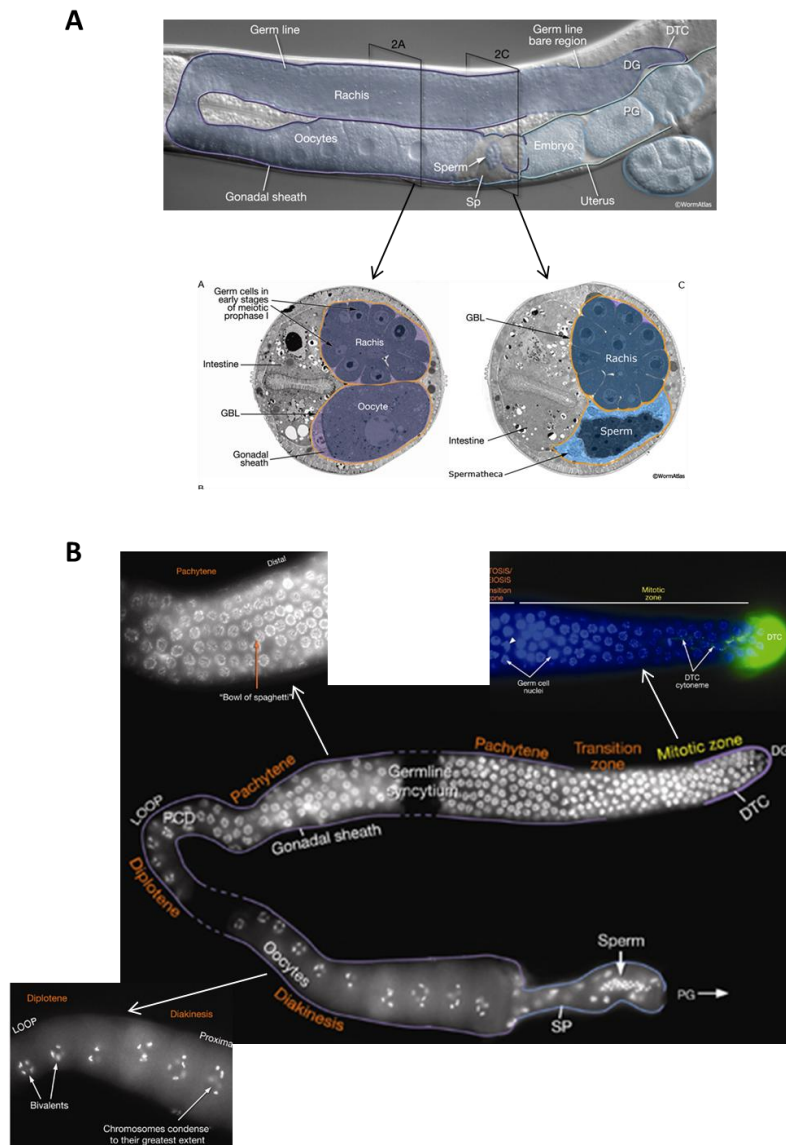


Figura 112. Imagen de la gónada anterior de un adulto hermafrodita y de sus células germinales. (A) Fotografía DIC de la gónada. Se ha coloreado en morado la localización de la línea germinal. Los cuadros

negros indican las secciones transversales en las que se puede observar las células germinales conectadas en el raquis. (B) Tinción DAPI de las células germinales de un hermafrodita adulto. En amarillo se indica la región mitótica próxima a la célula DTC. En naranja se indican las diferentes fases meióticas por las que las células germinales progresan y su situación en la gónada. Los núcleos de las células germinales en estado meiótico de paquiteno tienen un aspecto característico denominado comúnmente como “bol de espaguetis”. Los oocitos (diploteno y diaquinesis) tienen sus cromosomas prácticamente condensados y su aspecto se conoce como bivalente o tétrada. (www.wormatlas.org).

El hermafrodita puede autofertilizarse debido a que en el estadio L4 tardío la línea germinal produce un número determinado de gametos masculinos (esperma). Posteriormente, desde el estadio L4 tardío y adulto joven, la gónada únicamente produce gametos femeninos (oocitos) (figura I11). Por este motivo, el hermafrodita adulto es capaz de fertilizar los oocitos maduros (óvulos) utilizando su propio esperma justo al inicio del útero, aunque también puede fertilizarse utilizando el esperma de un macho. Finalmente, los embriones permanecen en el útero durante sus primeros estadios de desarrollo hasta que son expulsados a través de la vulva (figura I10).

3.2. Mitocondria y genoma mitocondrial de *C. elegans*

Las mitocondrias de *C. elegans* son muy similares a las del resto de organismos eucariotas. No obstante, presentan algunas particularidades que se comentarán a lo largo de este apartado y el siguiente, tanto en el número de copias por célula, como en su genoma mitocondrial, en sus mt-tRNAs y en su función.

La estructura, el metabolismo y la bioenergética del sistema OXPHOS de la mitocondria del nematodo son muy similares a las humanas y diversas rutas metabólicas (entre ellas el ciclo del TCA) también están conservadas (Murfit et al. 1976; Wadsworth and Riddle 1989). En condiciones aeróbicas, *C. elegans* produce energía por las vías metabólicas habituales (apartado 1.5), glicólisis y ciclo del TCA, tal como muestra la figura I13. También puede usar lípidos y aminoácidos como fuentes energéticas que entran en las rutas principales por diferentes puntos. Para la hidrólisis de lípidos de cadena impar y aminoácidos ramificados, *C. elegans* contiene el enzima metilmalonil-CoA epimerasa que procesa el propionil-CoA resultante de la hidrólisis de los compuestos mencionados (Kühnl et al. 2004). Los ácidos grasos son degradados mediante β -oxidación a acetil-

CoA (que puede entrar en el ciclo del TCA) y genera FADH_2 y NADH . La β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, que ocurre en peroxisomas, no está ligada directamente al metabolismo energético porque el transportador de electrones reducido es oxidado directamente por el oxígeno molecular (produciendo H_2O_2). Los aminoácidos pueden ser degradados por distintas rutas y sus esqueletos carbonados son metabolizados en el ciclo del TCA.

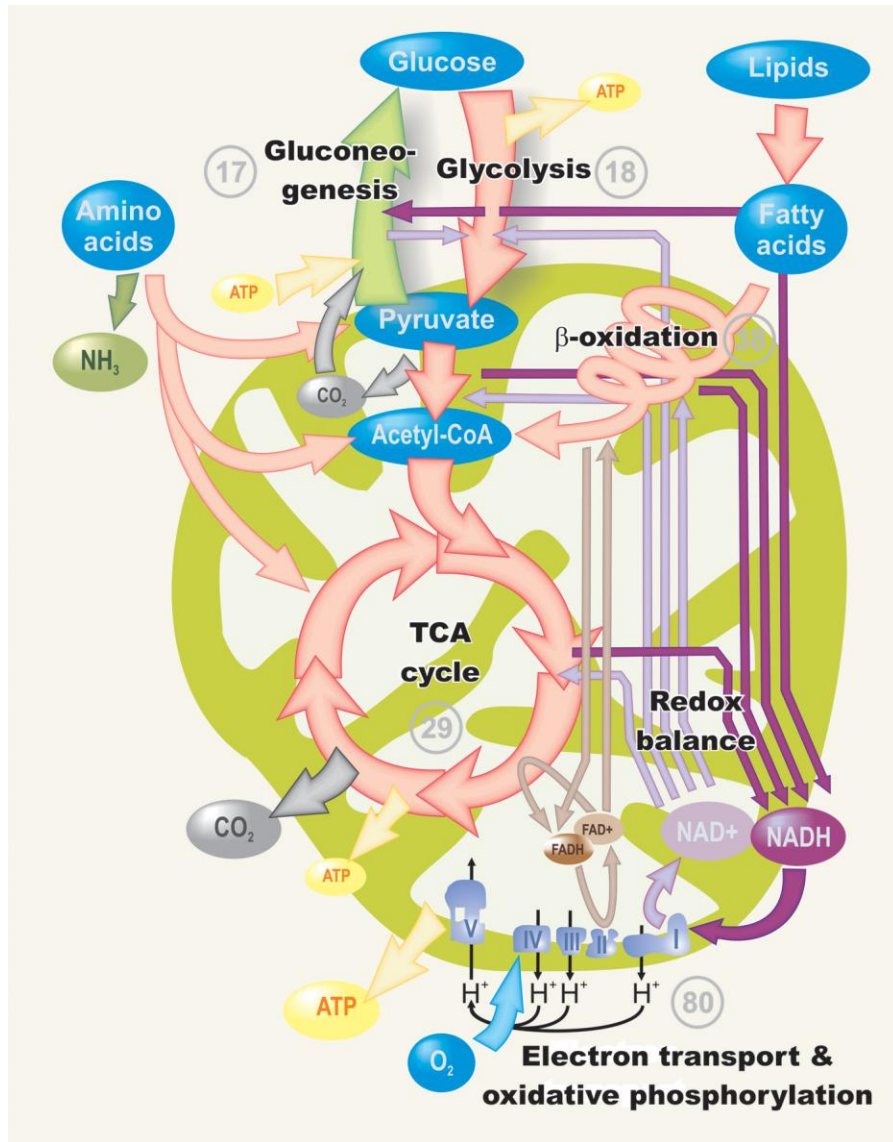


Figura I13. Representación de las vías metabólicas conservadas en la mitocondria de *C. elegans*. Los números localizados cerca de cada vía indican el número de ortólogos detectados en el genoma de *C. elegans*. Imagen tomada de (Braeckman et al. 2009).

C. elegans puede utilizar rutas energéticas alternativas en función del estado de desarrollo o las condiciones ambientales. En condiciones adversas, este nematodo reduce el flujo de productos de la glicólisis al ciclo del TCA (mediante la piruvato deshidrogenasa quinasa, un regulador negativo de la piruvato deshidrogenasa) de manera que se produce un cambio en el metabolismo energético. El mantenimiento del ciclo del TCA puede hacerse por rutas anapleróticas, dependientes de la degradación de los ácidos grasos y aminoácidos. Además, *C. elegans*, entre otros nematodos, tiene los enzimas del ciclo del glioxilato, una vía anaplerótica que conecta la mitocondria y los glioxisomas y que convierte dos acetil-CoA en succinato y malato gracias a dos actividades enzimáticas, la isocitrato liasa y la malato sintasa que en *C. elegans* residen en la misma proteína que se expresa mayoritariamente en estados larvarios tempranos o en respuesta a condiciones de crecimiento (Liu et al. 1995; Cristina et al. 2009; Castelein et al. 2014).

La secuencia del mtDNA de *C. elegans*, que fue obtenida de forma completa (Okimoto et al. 1992), reveló un genoma mitocondrial ligeramente más pequeño que el humano y también una organización génica diferente. La figura I14 muestra la organización de los genes contenidos en las 13.794 pb de longitud del mtDNA de *C. elegans*. El menor tamaño de este genoma respecto a su equivalente humano es debido fundamentalmente a la ausencia del gen ATP8, que en humanos codifica para una subunidad del complejo ATP sintasa (CV). Además, el mtDNA del nematodo está muy compactado y aproximadamente el 92% de su genoma mitocondrial es codificante (2 rRNA, 22 tRNA y 12 proteínas del sistema OXPHOS) (Okimoto et al. 1992; Lemire 2005).

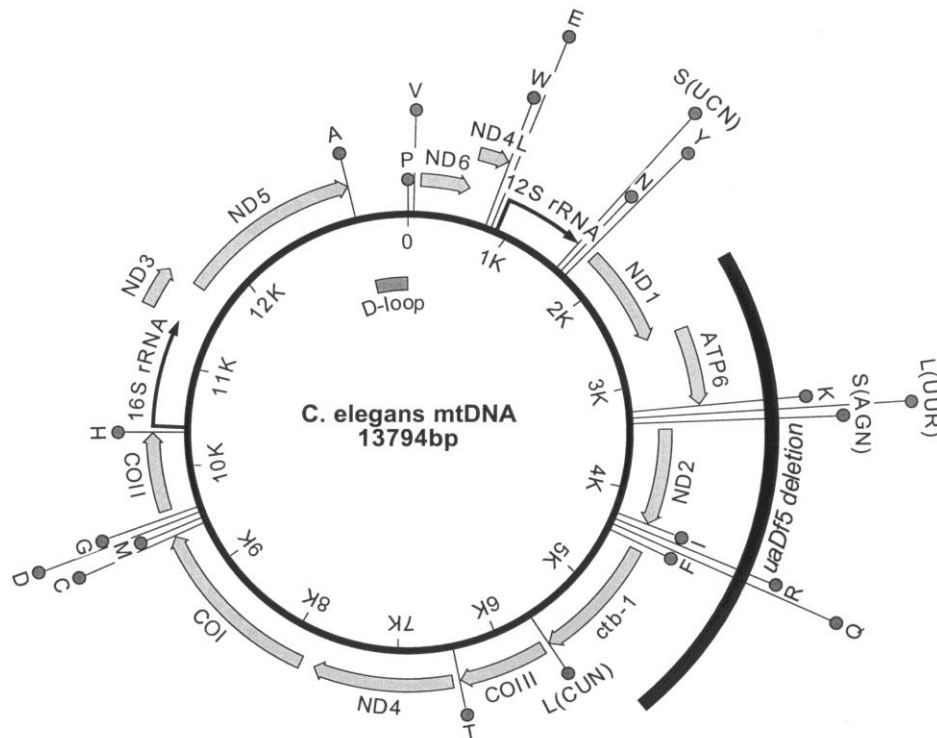


Figura I14. Representación del genoma mitocondrial de *C. elegans*. El mtDNA codifica para 12 proteínas del sistema OXPHOS (indicadas con flechas grises), 2 rRNAs (flechas negras) y 22 tRNAs (círculos etiquetados con la nomenclatura de una letra del código de los aminoácidos). Obtenido de (Lemire 2005).

El número de copias del mtDNA en todo el organismo de *C. elegans* es dependiente de su estadio de desarrollo. Un embrión contiene unas 25.000 copias de mtDNA, número que permanece invariable desde el estadio L1 hasta L3. El número de copias de mtDNA se quintuplica en las larvas L4 (130.000 copias) y en el hermafrodita adulto, el número de copias aumenta 6 veces más, alcanzando las 780.000 copias de mtDNA (Tsang and Lemire 2002; Tsang and Lemire 2003). En los organismos eucariotas superiores se ha calculado que en cada célula existen entre 1.000 y 10.000 copias del mtDNA (Shuster et al. 1988; Lightowlers et al. 1997; Tully and Levin 2000); sin embargo, el contenido de mtDNA por célula en *C. elegans* es considerablemente inferior y variable según el estadio del organismo. Las larvas L1 tendrían una media de 45 copias por célula y las larvas L4 aproximadamente 70 copias, aunque se desconoce si las células de diversos tejidos pueden tener una mayor representación de este orgánulo según su requerimiento energético. La excepción en el caso de *C. elegans* es que las células germinales indiferenciadas contienen unas 250 copias de mtDNA, mientras que el esperma tiene un número mucho menor, entre 30 y 40

copias (Tsang and Lemire 2002; Tsang and Lemire 2003; Lemire 2005), lo que determina que el tejido germinal sea el más rico en mitocondrias de todo el organismo. De esta manera, el aumento observado en el número de copias de mtDNA a partir del estadio L4 durante el desarrollo de *C. elegans* coincide con la maduración sexual, ya que el tejido germinal se desarrolla mayoritariamente a partir de este estadio y las células germinales son las que contienen un mayor número de copias de mtDNA.

Al igual que en humanos y otros eucariotas, mutaciones en los genomas mitocondriales y nucleares producen disfunción mitocondrial en *C. elegans*, generando diversos fenotipos que incluyen defectos en el desarrollo larvario, esterilidad y disminución o aumento de la longevidad. Curiosamente, en *C. elegans* las mutaciones en el mtDNA tiene un efecto mucho menor o incluso no presentan ningún fenotipo a nivel de organismo. Tsang y Lemire (Tsang and Lemire 2003) piensan que los organismos eucariotas más simples, como el gusano o la mosca, podrían tolerar mejor las mutaciones en el mtDNA o tener mecanismos de control que eviten su transmisión.

Por otra parte, las mutaciones en el genoma nuclear que afectan a componentes mitocondriales (proteínas de la ETC, factores de ensamblaje o proteínas implicadas en la maquinaria de replicación, transcripción y traducción a diferentes niveles) sí pueden producir fenotipos drásticos en el gusano. Las mutaciones en genes que participan en la ETC desvelan que el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS es necesario para la viabilidad y el desarrollo larvario a partir del estadio L3, puesto que sus mutaciones provocan la detención del desarrollo en ese estadio (revisado en (Tsang and Lemire 2003; Ventura et al. 2006; Rea et al. 2007)). En la revisión de Tsang y Lemire (Tsang and Lemire 2003), los autores sugieren la causa para tal detención en L3 y no en otro estadio. Estos autores lo relacionan con que los estadios L3 y L4 y siguientes requieren grandes cantidades de energía. Los estadios embrionarios y larvarios anteriores tienen un metabolismo reducido y utilizan, en parte, el ciclo del glioxilato para permitir el crecimiento a partir de los ácidos grasos, produciendo precursores C4 (como succinato), necesarios para procesos biosintéticos, a partir de unidades de 2 carbonos, y promoviendo rutas que proveen de moléculas energéticas (ATP y GTP) en cantidades suficientes para mantener ese estado metabólico, mientras que se reduce la actividad del ciclo del TCA y del sistema OXPHOS. Tras esos estados larvarios tempranos, los requerimientos energéticos aumentan, se activa el ciclo del TCA y la fosforilación oxidativa, mientras decae la actividad del glioxilato. Es, por lo tanto, al final de la etapa larvaria, cuando su metabolismo utiliza OXPHOS como fuente de ATP,

coincidiendo con los primeros aumentos en el número de copias de mtDNA. Esta idea refleja la fuerte conexión existente entre el metabolismo y OXPHOS. Por otra parte, algunos mutantes de gusano estudiados pueden sobrevivir hasta el estadio adulto aunque, cuando en lugar de inactivar el gen con una mutación se silencia mediante RNAi, se observa que el desarrollo se detiene en estadios embrionarios o larvarios tempranos (Tsang and Lemire 2003; Ventura et al. 2006). Esta diferencia es debida a la carga materna de los mutantes heterocigotos de los que se parte para obtener el homocigoto, ya que tal carga (proteínas, RNAs, etc.) heredada por éste contribuye a su supervivencia, dado que su acción se extiende más allá del estadio L3, permitiendo que un gusano adulto se forme. Por último, las mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas implicadas en la traducción de subunidades de la ETC o componentes del sistema OXPHOS en sí mismos pueden afectar a la vida media del organismo, tanto acortándola, como alargándola (revisado en (Tsang and Lemire 2003; Durieux et al. 2011; Chang et al. 2014; Dancy et al. 2015)). Las mutaciones que afectan al gen *clk-1*, una hidroxilasa requerida para la síntesis de ubiquinona, empeoran la eficiencia de la fosforilación oxidativa, tienen un menor número de descendientes y aumentan la vida media del gusano (Felkai et al. 1999). Los mutantes *nuo-6*, cuya deleciones afectan a una subunidad del CI, presentan el mismo fenotipo que los mutantes *clk-1* (Yang and Hekimi 2010). En cambio, los mutantes *gas-1* y *mev-1*, cuyas mutaciones afectan a los genes *gas-1* (que codifica para una subunidad de CI) y *mev-1* (que codifica para la subunidad c de la succinato deshidrogenasa, que es parte del CII), respectivamente, presentan defectos en la ETC, una reducción en el número de descendientes y, en este caso, una vida media inferior que la de la cepa salvaje (Senoo-Matsuda et al. 2001; Kayser et al. 2004). Todos estos datos, de nuevo, ponen de manifiesto la estrecha interacción de la función mitocondrial con el metabolismo y la señalización existente entre todos los tejidos para modular la longevidad.

3.3. Características especiales de los mt-tRNAs de *C. elegans*

En 1987, Wolstenholme y colaboradores identificaron en *A. suum* genes de tRNAs que carecían del brazo T característico de la estructura secundaria canónica de los tRNAs (Wolstenholme et al. 1987). Los tRNAs que carecen del brazo T tienen un bucle de sustitución, denominado bucle TΨV, que sustituye el brazo T y la región variable. No obstante, gracias a una modificación post-transcripcional en la A de la posición 9 (m¹A), éstos pueden plegarse en una

estructura similar a la de los tRNAs canónicos (Wolstenholme et al. 1987; Ohtsuki and Watanabe 2007; Watanabe et al. 2014).

Cuando se secuenció el genoma mitocondrial de *C. elegans* se observó que 20 de los 22 mt-tRNAs tenían esta estructura característica, un bucle de sustitución TΨV con una longitud de este bucle de entre 6 y 12 nt (figura I15). Los otros 2 mt-tRNAs (Ser y Arg) contienen un bucle variable y un brazo T, como los tRNAs canónicos, pero en este caso carecen del brazo DHU que es sustituido por un bucle de entre 5 y 8 nt (figura I15). Además de estas características estructurales, los mt-tRNAs de *C. elegans* tienen otra peculiaridad en cuanto a su longitud, ya que presentan una longitud más corta que otros tRNAs mitocondriales, pues contienen entre 54 y 63 nt.

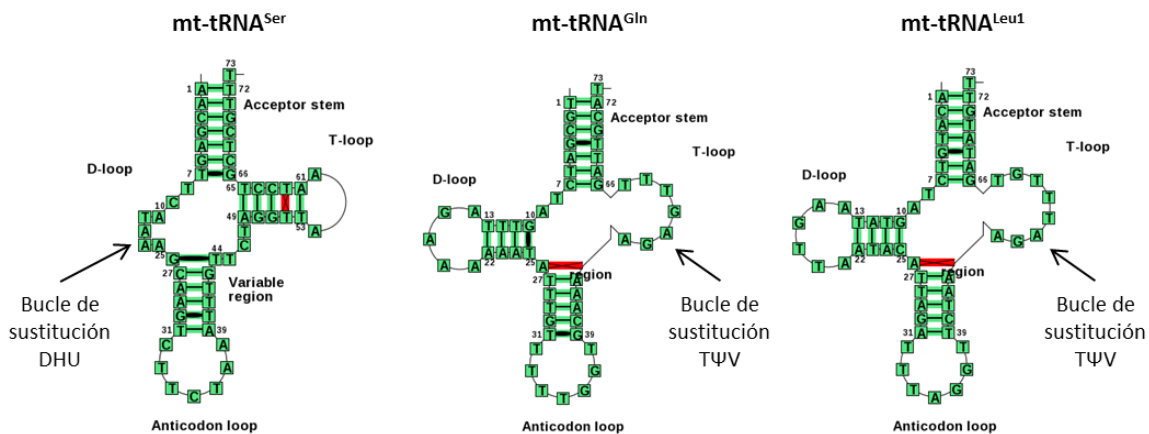


Figura I15. Estructura secundaria de los mt-tRNAs de *C. elegans*. El mt-tRNA^{Ser} carece del brazo característico D y presenta una sustitución de pocos nucleósidos (7 nt) en su lugar (bucle de sustitución DHU). Los mt-tRNA^{Gln} y mt-tRNA^{Leu1} carecen del brazo T característico y, en su lugar, contienen un bucle de sustitución (TΨV) (7-8 nucleósidos). Estructuras secundarias extraídas de <http://mtrna.bioinf.uni-leipzig.de/>.

3.4. Rutas de señalización de longevidad en *C. elegans*

Como se ha comentado anteriormente (apartado 3.2), la disfunción mitocondrial puede desembocar en un aumento de la vida media en *C. elegans*. Sin embargo, la mitocondria no es la única vía de señalización por la que se regula la longevidad, habiendo, además, estrechas relaciones entre las diversas vías. En este apartado se explican brevemente las principales rutas de

señalización conocidas que modulan la supervivencia y longevidad en *C. elegans*, dado que estos aspectos van a tener una especial relevancia en nuestros resultados. En general, como se verá a continuación, la longevidad aparece como consecuencia de una cascada de señalizaciones que, alterando la actividad de factores transcripcionales en tejidos específicos, cambia el patrón de expresión nuclear, estimulando determinados procesos celulares que tienen un efecto sistémico, es decir, afectarán a tejidos distantes mediante, al menos en algunos casos, la acción de hormonas. De esta forma, las células somáticas adquieren propiedades de resistencia a estrés similares a las de las células germinales y que determinan mayor longevidad.

3.4.1. Señalización por insulina/IGF-1 (IIS)

Una consecuencia de los primeros trabajos relativos al estudio de la longevidad en *C. elegans* fue el descubrimiento de que el envejecimiento puede estar modulado por hormonas. *C. elegans* expresa unos 40 péptidos del tipo de la insulina, como INS-7. En condiciones normales, DAF-2 (ortólogo del receptor de insulina IGF1) está unido a sus ligandos y, por tanto, activado. La unión a sus ligandos desata una cascada de señalización a través diferentes quinasas que fosforilan el factor de transcripción DAF-16 (FOXO), quedando éste secuestrado en el citoplasma donde no puede ejercer su función (figura I16A). En cambio, en determinadas condiciones de estrés, disminuye la fosforilación de DAF-16 por estas quinasas, mientras puede ser fosforilado en diferentes posiciones por otras enzimas (como AMPK, un sensor de la ratio AMP/ATP) y translocado al núcleo, donde se une a sus genes diana y regula genes efectores implicados en la respuesta a estrés, formación del estado dauer y metabolismo, entre otros procesos (figura I16A y B) (Dillin et al. 2002; Murphy and Hu 2013). Una de las consecuencias de la inactivación por mutaciones o silenciamiento de *daf-2*, o de otros factores de la vía de señalización IIS, es la extensión de la vida media en *C. elegans*, lo cual probablemente depende de la expresión de múltiples genes-diana de DAF-16.

La señalización por insulina/IGF-1 en tejidos específicos, principalmente células neuronales e intestinales, es crucial para que la ruta afecte a la longevidad sistémicamente.

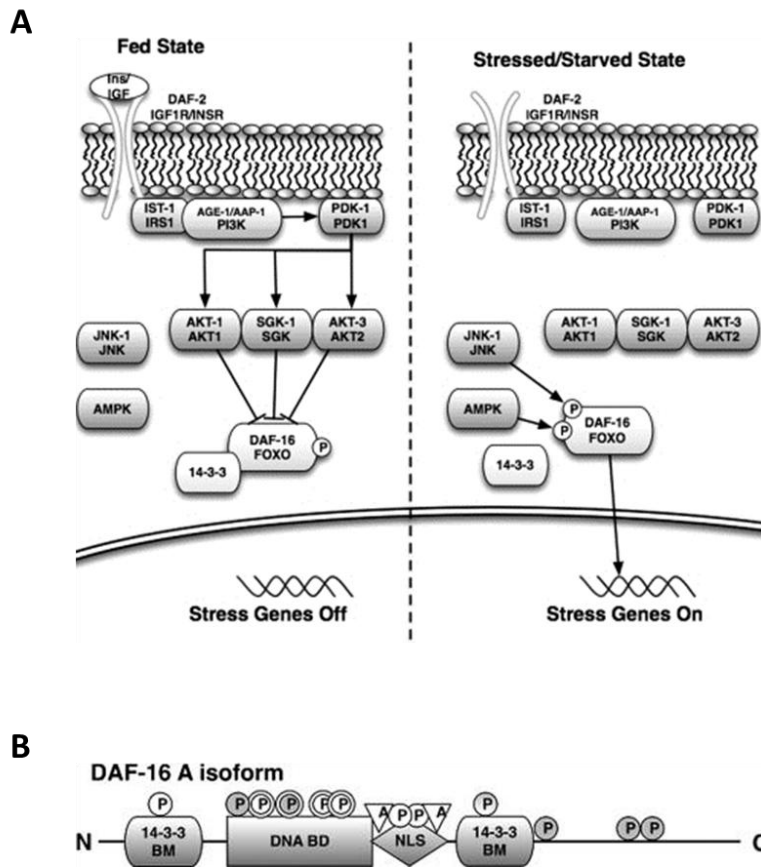


Figura I16. Diagrama de la cascada de señalización por insulina en *C. elegans* que resulta en la modulación de la actividad del factor de transcripción DAF-16 por fosforilación. (A) Cuando la cantidad de alimento es suficiente (“fed state”), existe una elevada señalización por esta vía y DAF-16 se encuentra en el citoplasma. Sin embargo, en condiciones de estrés, DAF-16 se localiza en el núcleo debido a la baja señalización a través de esta vía y a su fosforilación en otros residuos realizada por otras quinasas. (B) Representación del factor de transcripción DAF-16 y sus dominios proteicos. Además, se muestran en la figura los lugares de fosforilación DAF-16 y sus dominios proteicos. Además, se muestran en la figura los lugares de fosforilación (P): los círculos blancos de un único borde indican los sitios de fosforilación de AKT-1/2, los círculos de doble borde señalan los puntos de fosforilación de CST-1 y los círculos grises indican los lugares de fosforilación por acción de AMPK. Los sitios de acetilación están marcados por unos triángulos con la letra A. BD (dominio de unión), BM (motivo de unión), NLS (señal de localización nuclear). Extraído de (Yen et al. 2011).

La señalización IIS es un elemento clave del metabolismo pues coordina la ingesta de alimento con la homeostasis de energía a través de diferentes rutas metabólicas, como glicólisis y lipólisis, además de responder a los niveles de ATP. Por tanto, y como veremos, IIS es una ruta de

señalización central que puede conectar con otras rutas de señalización de longevidad a diferentes niveles.

3.4.2. Señalización a través de TOR (target-of-rapamycin) o restricción calórica

TOR es un sensor de nutrientes que controla la reproducción y el crecimiento en función de la disponibilidad de aminoácidos y factores de crecimiento en el medio, y también está directamente implicado en la señalización de longevidad, pues su inhibición incrementa la longevidad. Como sensor de nutrientes, TOR es un mediador de la respuesta metabólica a la restricción calórica, un paradigma en el incremento de la longevidad. TOR existe en dos complejos TORC1 y TORC2, que tienen funciones diferentes en las células.

TORC1 regula el crecimiento y la proliferación celular, mientras que TORC2 regula la forma celular a través de la reorganización del citoesqueleto (Soukas 2009; Lapierre and Hansen 2012). Existen dos coactivadores de TOR, DAF-15/Raptor para TORC1 y RICT-1/Rictor para TORC2. La inhibición de TORC1, TORC2 o cualquiera de sus coactivadores señala para la activación de factores de transcripción, como DAF-16/FOXO, PHA-4/FOXA o SKN-1/Nrf, que aumentan la transcripción de genes efectores. Estos genes regulan procesos biológicos como la lipólisis, autofagia o la detoxificación, lo que en numerosas ocasiones resulta en una extensión de la vida media (figura I17). Actualmente, no se conoce al completo la ruta de señalización por TOR, pero sí se sabe que la señalización de TORC1 y TORC2 es paralela y, por ello, provocan respuestas celulares diferentes; si bien es cierto que en diversas ocasiones coinciden en activar el mismo factor de transcripción, como se observa en la figura I17 (revisado en (Lapierre and Hansen 2012)).

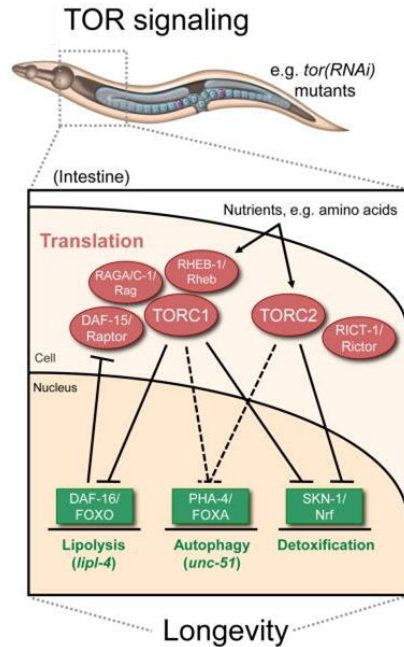


Figura I17. Esquema de la ruta de señalización de longevidad mediada por TOR en *C. elegans*. TOR responde a la cantidad de nutrientes en el medio formando dos complejos diferentes, TORC1 y TORC2. Las líneas punteadas indican la relación teórica entre los complejos y los factores de transcripción y la respuesta biológica que producirían. Las líneas continuas muestran las relaciones comprobadas experimentalmente. Imagen obtenida de (Lapierre and Hansen 2012).

TOR regula la expresión de INS-7, lo que sugiere que, al igual que DAF-2, modula el envejecimiento mediante un efecto sistémico sobre hormonas. La inhibición de TOR, como la de DAF-2, incrementa la lipólisis. Al igual que la inhibición de IIS, la de TOR también aumenta la autofagia. Ambas rutas de señalización parecen tener muchos elementos en común, como los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1, los genes diana codificantes de lipasas e INS-7 y posibles mecanismos efectores como autofagia y metabolismo de lípidos. Sin embargo, aún quedan muchos aspectos por dilucidar en lo que se refiere a la señalización por TOR en *C. elegans*.

3.4.3. Señalización por línea germinal

La línea germinal en *C. elegans* integra la señalización de nutrientes y comunica con otros tejidos que modulan el envejecimiento. La eliminación de las células germinales aumenta la

longevidad en un 60% (Hsin and Kenyon 1999), aunque la eliminación conjunta de la línea germinal y la gónada somática recupera la longevidad de la cepa salvaje. Esto sugiere que existen dos rutas de señalización opuestas inducidas por la línea germinal y por la gónada somática. La translocación al núcleo de DAF-16 en las células intestinales es necesaria para aumentar la vida media en gusanos con defectos en la línea germinal, por tanto, algunos de los genes diana o cofactores serán compartidos por esta vía y por las rutas de señalización IIS y TOR. También comparten mecanismos efectores como el metabolismo de lípidos y la autofagia. Sin embargo, las rutas deben tener elementos diferenciadores ya que la eliminación de la línea germinal en mutantes *daf-2* produce longevidad extrema, sugiriendo que las dos rutas actúan en paralelo. DAF-16 parece actuar en el intestino y en el tejido neuronal en respuesta a una reducción en la señalización por IIS. En ausencia de línea germinal, la translocación de DAF-16 al núcleo parece suceder también principalmente en las células intestinales, lo que implica un efecto “cell-non-autonomous” para propagar las señales de longevidad desde la línea germinal al intestino, entre otros tejidos (Libina et al. 2003). No obstante, existen cofactores específicos de línea germinal, como es el factor de elongación TCER-1 (Ghazi et al. 2009) y la proteína KRI-1 (figura 115) (Berman and Kenyon 2006). Además de DAF-16, una ruta de señalización a través de hormonas o esteroides, que se describe a continuación, también es necesaria para fomentar la supervivencia y longevidad en gusanos sin línea germinal (Hsin and Kenyon 1999; Arantes-Oliveira et al. 2002).

3.4.4. Señalización por hormonas o esteroides

La señalización por esteroides cuenta con tres componentes clave principales: DAF-9 (ortólogo del citocromo P450 que sintetiza un ligando de DAF-12) (Jia et al. 2002), DAF-36 (ortólogo de una oxigenasa del tipo Rieske que también sintetiza un ligando que modula la actividad de DAF-12) y DAF-12 (receptor de hormonas nuclear implicado en la determinación de entrada en dauer y/o longevidad). Las células germinales y el tejido somático regulan de manera opuesta la longevidad; mientras que las células germinales regulan negativamente la localización nuclear de DAF-16 (tanto a través de KRI-1 como a través de DAF-9 y DAF-12) para que no pueda ejercer su función pro-longevidad, las células de la gónada (tejido somático) inhiben la ruta de la IIS (a través de DAF-2) y favorecen la translocación de DAF-16 al núcleo, que puede activar transcripcionalmente sus genes diana, habitualmente relacionados con la extensión de longevidad.

En ausencia de células germinales por esterilidad o disfunción reproductiva se elimina el bloqueo sobre DAF-9 quien, a su vez, puede activar a DAF-12 y éste permite la translocación de DAF-16 al núcleo. Así pues, la señalización hormonal parece actuar paralelamente a la ruta IIS, que promueve la longevidad a través de la inhibición de DAF-2, aunque en ocasiones compartan a DAF-16 como factor de transcripción, tal como queda representado en la figura I18.

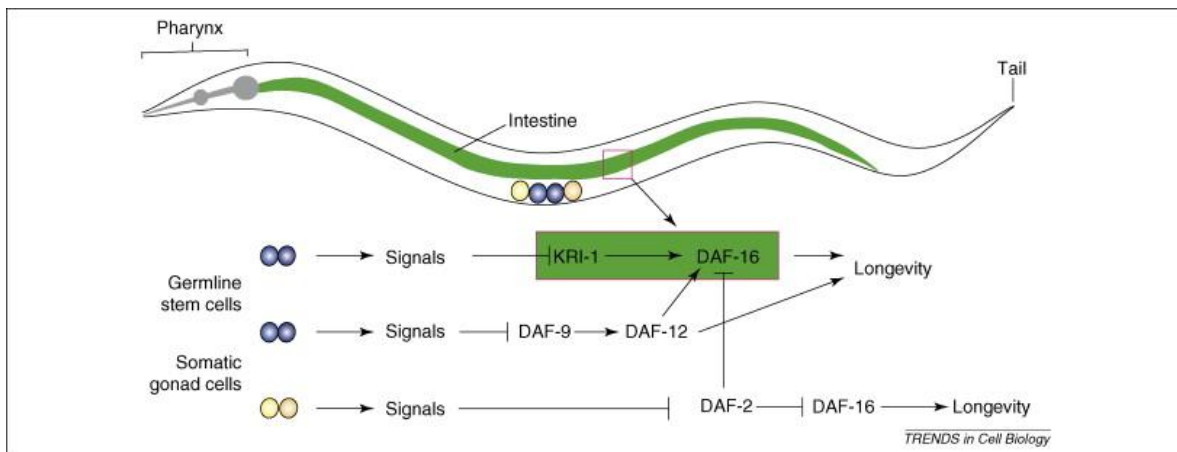


Figura I18. Modelo de la regulación de la longevidad por el sistema reproductor en *C. elegans*. Las señales desde las células germinales inhiben la acción de KRI-1 y DAF-9. KRI-1 favorece la translocación de DAF-16 al núcleo y DAF-9 activa a DAF-12 que provoca la extensión de la vida media de manera dependiente de DAF-16 (ya que puede activarlo) o de forma independiente de DAF-16. Puesto que las células germinales bloquean la acción de KRI-1 y DAF-9, sus funciones posteriores también quedan inhibidas, de manera que no pueden ejercer su función pro-longevidad. La gónada somática produce una señalización opuesta a la de la línea germinal para regular la longevidad, puesto que habitualmente inhibe a DAF-2, un receptor de la ruta de la insulina, cuya función principal es bloquear la localización del factor de transcripción DAF-16 en el citoplasma. La inhibición de DAF-2 favorece la translocación de DAF-16, tal como se ha explicado en el apartado 3.4.1. Imagen extraída de (Mukhopadhyay and Tissenbaum 2006).

Según hemos comentado, DAF-12 está implicado en la ruta de señalización por línea germinal pero no por gónada somática (Hsin and Kenyon 1999) y mutaciones en este gen pueden resultar tanto en un incremento como en una reducción de la vida media de *C. elegans* (Fisher and Lithgow 2006). DAF-12 es necesario para revelar el fenotipo de DAF-9, ya que DAF-9 actúa aguas arriba de DAF-12 en la ruta de señalización (Jia et al. 2002). Se ha propuesto que DAF-9 sintetiza un ligando de DAF-12, un tipo de ácido dafacrónico, que favorece la actividad señalizadora de

longevidad de DAF-12 y que inhibe la función inductora del estado dauer de DAF-12 (Jia et al. 2002; Dumas et al. 2013). DAF-9, DAF-12 y DAF-16 parecen formar un circuito complejo de regulación mutua y, además, DAF-12 puede provocar longevidad de manera independiente de DAF-16. Se piensa que DAF-9 podría estar inducido en condiciones favorables que estimulan la señalización hormonal iniciada por las rutas de insulina/IIS y TGF- β , para catalizar la síntesis de ácidos dafacrónicos (Wang et al. 2015) que se unen y activan DAF-12, promoviendo el ciclo reproductivo y la longevidad. Condiciones desfavorables impiden la síntesis del ácido dafacrónico y permiten que DAF-12 se una a un co-represor requerido para la formación de dauer. De esta manera, tanto DAF-9 como DAF-12 están directamente conectados con diversos procesos metabólicos y participan en la señalización de respuestas tan dispares como el crecimiento reproductivo, la inducción del estado dauer y la longevidad según su estado de activación (Dumas et al. 2013).

3.4.5. Señalización por mitocondria

En apartados previos (apartado 3.2) ya se ha comentado como defectos en el sistema OXPHOS pueden desembocar en la extensión de la vida media en *C. elegans*. Diversas proteínas se han identificado como moduladores de la longevidad en respuesta a mutaciones en genes implicados en la ETC, por ejemplo *hif-1*, *p53*, *ceh-23*, *crtc-1*, CREB y AMPK. Como se ha indicado anteriormente, DAF-16 puede ser activado por fosforilación dependiente de AMPK, que a su vez se activa con elevadas ratios AMP/ATP (figura 116B). Esto favorece la translocación al núcleo de DAF-16 y la posibilidad de que este factor active los genes de longevidad (Apfeld et al. 2004; Yen et al. 2011).

Por otra parte, defectos mitocondriales suelen relacionarse con la inducción de la respuesta UPR^{mt} (“mitochondrial unfolded protein response”). Ésta es una respuesta específica de mitocondria, en la que el estrés creado por los defectos mitocondriales en este compartimento activa una ruta de señalización al núcleo para inducir transcripcionalmente chaperonas mitocondriales que ayuden a controlar el estrés. Existen otras respuestas similares en citoplasma y retículo endoplásmico (UPR^{cit} y UPR^{er}, respectivamente), aunque no siempre se activan de manera simultánea. La señal UPR^{mt} puede comenzar con la pérdida de homeostasis en el proteoma mitocondrial y la activación de la proteasa ClpP, que degrada las proteínas en péptidos que son

transportados al citoplasma. En condiciones normales, con bajo número de péptidos degradados y transportados, el factor de transcripción ATFS-1 es transportado a la mitocondria para su degradación. En cambio, en situaciones de estrés mitocondrial, se reduce el importe de ATFS-1 a la mitocondria y permite que se acumule en el citosol y que sea transportado al núcleo (Nargund et al. 2012) donde, junto con la acción de DVE-1 y UBL-5, favorece la transcripción de las chaperonas mitocondriales HSP-60 y HSP-6 (homólogas a la HSP60 y HSP70 humanas, respectivamente). Estas chaperonas son transportadas a la matriz mitocondrial como respuesta compensatoria al estrés iniciado en la mitocondria (figura I19).

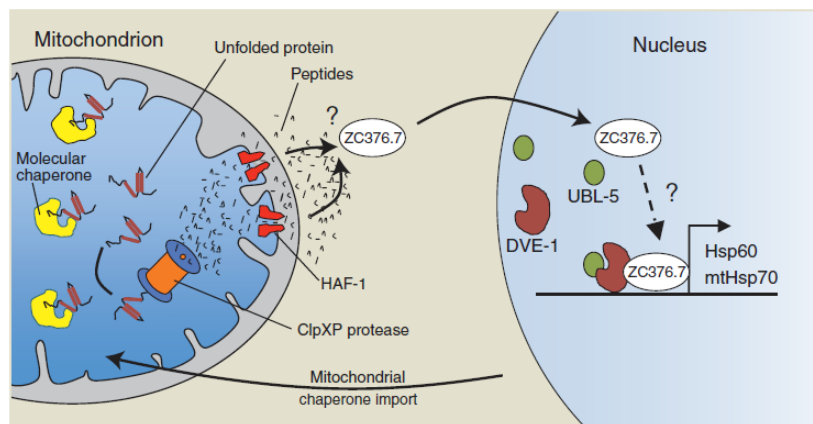


Figura I19. Ilustración de un modelo de la UPR^{mt}. La proteasa ClpP degrada las proteínas mitocondriales mal plegadas, HAF-1 exporta los péptidos y se activa la respuesta transcripcional en el núcleo. La respuesta UPR^{mt} finaliza con el transporte de las chaperonas a las mitocondrias donde de ejercen su función. ZC376.7 actualmente es conocido como ATFS-1. Modelo tomado de (Haynes and Ron 2010).

Recientemente, se ha sugerido que la inducción de la respuesta UPR^{mt} media la extensión de la longevidad en respuesta a un estrés mitocondrial normalmente causado por la inhibición del sistema OXPHOS (Durieux et al. 2011), si bien Bennett y colaboradores presentan resultados que contradicen esta afirmación pues sus datos sugieren que la activación de la respuesta UPR^{mt} no predice una mayor longevidad en *C. elegans* (Bennet et al. 2014). De esta manera, la relación entre la respuesta UPR^{mt} y la longevidad es un aspecto conflictivo que está todavía por resolver. No obstante, resulta una respuesta celular interesante ya que relaciona la inhibición de la ETC con el estrés mitocondrial y representa una de las rutas de señalización retrógrada mitocondria-núcleo más importantes.

Justificación y objetivos

*“El mejor científico está abierto a la experiencia,
y ésta empieza con un romance, es decir,
con la idea de que todo es posible”*

Ray Bradbury

En la introducción de este trabajo se han tratado las dificultades que supone desentrañar el mecanismo molecular que subyace en las enfermedades asociadas con defectos en la modificación post-transcripcional de mt-tRNAs debido a la variedad de fenotipos con que se presentan. No está claro como un supuesto defecto (estrés) de la traducción de las proteínas codificadas por el mtDNA (que va a resultar en una disfunción OXPHOS) puede dar lugar a fenotipos tan distintos, por ejemplo, fallo hepático infantil (mutaciones *MTU1*), cardiomiopatía hipertrófica infantil (mutaciones *GTPBP3* y *MTO1*) o encefalomiopatías (mutaciones MELAS y MERRF). Tampoco está claro por qué dentro de individuos portadores de un defecto en el mismo gen también existen diferencias en los síntomas. Nuestro grupo pretende testar la hipótesis de que estas mutaciones, aunque perturben en términos generales la síntesis mitocondrial de proteínas y el funcionamiento del sistema OXPHOS, provocan una señalización retrógrada mitocondrial diferente que es la responsable de la variabilidad fenotípica. En esta Tesis, se ha escogido el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* para abordar el estudio de la señalización activada por mutaciones en los genes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, homólogos de los humanos *MTU1*, *GTPBP3* y *MTO1*, respectivamente.

Los objetivos concretos de esta Tesis son los siguientes:

1. Identificar las proteínas homólogas a *MTU1*, *GTPBP3* y *MTO1* humanas en *C. elegans*, comprobar su localización mitocondrial y demostrar su implicación en la modificación de la uridina de tambaleo (U₃₄) de mt-tRNAs de *C. elegans*.

Justificación y objetivos

2. Estudiar los fenotipos que la inactivación por mutación knock-out y por silenciamiento de las tres proteínas homólogas a MTU1, MTO1 y GTPBP3 provocan a nivel celular (mitocondrial) y en el organismo entero.
3. Dilucidar los mecanismos que subyacen en los fenotipos encontrados y determinar las posibles diferencias entre los mecanismos promovidos por la inactivación de cada proteína.

Materiales y métodos

“La ciencia se compone de errores,
que, a su vez, son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne

1. Materiales

1.1. Material biológico

1.1.1. Cepas bacterianas

En el desarrollo del presente trabajo se han utilizado diferentes cepas bacterianas que quedan recogidas en la tabla M1.

Tabla M1. Relación de cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo	Características/Comentarios	Origen	Uso en este trabajo
OP50	<i>E. coli: ura⁻</i>	Su auxotrofia (uracilo) limita su crecimiento en placas NGM y esto facilita la observación de los gusanos	(Brenner 1974)	Alimento estándar para las cepas de <i>C. elegans</i>
MnmE nula	<i>E. coli: mnmE⁻</i>	Carece de la proteína MnmE. Kan ^R	ME. Armengod, (CIPF, Valencia)	Alimento para el cultivo líquido de <i>C. elegans</i>
HT115(DE3)	<i>E. coli: F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promoter-T7 polymerase (tet^R)) (IPTG-inducible T7 polymerase), (RNase III minus)</i>	Tet ^R ; polimerasa T7 inducible por IPTG; disrupción del gen RNase III. La falta de la dsRNasa capacita a la bacteria para acumular RNAs	(Timmons and Fire 1998)	Cepa huésped de los diferentes plásmidos utilizados en el silenciamiento génico por RNA de interferencia (RNA).
DH5α	<i>E. coli: supE44 ΔlacU169(Δ80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thiA1</i>		Hanahan et al., 1983	Clonación
L4440 RNAi	HT115(DE3) + plásmido L4440	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi. Control negativo
aak-1 RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>aak-1</i> (PAR2.3)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
aak-2 RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>aak-2</i> (T01C8.1)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
daf-2 RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>daf-2</i> (Y55D5A.5)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi

Materiales y métodos

<i>daf-9</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>daf-9</i> (T13C5.1)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>daf-12</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>daf-12</i> (F11A1.3)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>daf-15</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>daf-15</i> (C10C5.6)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>hsp-6</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>hsp-6</i> (C37H5.8)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>kri-1</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>kri-1</i> (ZK265.1)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>let-92</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>let-92</i> (F38H4.9)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>mtcu-2</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>mtcu-2</i> (F52H3.2)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>rict-1</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>rict-1</i> (F29C12.3)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi
<i>ucp-4</i> RNAi	HT115(DE3) + derivado de pL4440 incluyendo el silenciador para <i>ucp-4</i> (K07B1.3)	Amp ^R y Kan ^R	S. Tuck (Umeå University, Suecia)	Silenciamiento por RNAi

1.1.2. Cepa de levadura

En este trabajo se ha utilizado una única cepa de *S. cerevisiae*, denominada SC012, cuya nomenclatura en Euroscarf es BY4741. Su genotipo es el siguiente: MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0. Ha sido necesaria para el estudio de la localización celular de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2.

1.1.3. Cepas de *C. elegans*

Todas las cepas de *C. elegans* usadas en este trabajo (tabla M2) fueron derivadas de la cepa salvaje N2 Bristol. Las cepas fueron amablemente cedidas por tres colecciones de organismos o laboratorios diferentes:

- Caenorhabditis Genetics Center (CGC): se estableció en Missouri, Columbia, en 1979. Mantiene y distribuye la colección de cepas de *C. elegans* en la que están representados,

al menos, un alelo mutante de cada gen publicado y todos los reordenamientos cromosómicos (deficiencias, duplicaciones, translocaciones, inversiones). También están disponibles diferentes aislados de la cepa salvaje y especies cercanas a *C. elegans*. (Fuente: CGC web page).

- Laboratorio del Dr. Shohei Mitani, Japanese Bioresource Project (JBP): comenzó en 2002 financiado por el Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia, Deporte y Tecnología de Japón. Este proyecto pretende recolectar, almacenar y distribuir todos los recursos biológicos de *C. elegans* disponibles en investigación, lo que incluye mutantes por delección genómica de estos nematodos. También pretende recoger información sobre los promotores y marcadores útiles en experimentos donde *C. elegans* esté implicado (Fuente: JBP web page).
- Laboratorio del Dr. Simon Tuck, Universidad de Umeå (Suecia) (ST).

Tabla M2. Listado de cepas de *C. elegans* utilizadas en este estudio.

Nombre en este trabajo	Cepa	Genotipo <i>gen(mutación)</i> cromosoma	Observaciones	Origen
N2	N2	Salvaje	Var. Bristol	ST/CGC
<i>mttu-1</i>		<i>mttu-1(tm3160)</i> IV	Supresión 592 pb	JBP
<i>mtcu-1(ok3674)</i>	RB2623	<i>mtcu-1(ok3674)</i> I	Supresión 200 pb	CGC
<i>mtcu-1</i>		<i>mtcu-1;F39B2.5(tm5041)</i> I	Supresión 567 pb + inserción 13 pb	JBP
<i>mtcu-2</i>	VC1779	<i>mtcu-2(ok2309)</i> II	Supresión 1310 pb	CGC
nT1g	EW80	nT1[qIs51]		ST/CGC
<i>rrf-1</i>	NL2098	<i>rrf-1(pk1417)</i> I		ST/CGC
<i>ppw-2</i>	NL5117	<i>ppw-2(pk1673)</i> I	Supresión 3142 pb	ST/CGC
Cepas construidas en este trabajo por cruces				
<i>mtcu-1;mtcu-2</i>		<i>mtcu-1;F39B2.5(tm5041)</i> I; <i>mtcu-2(ok2309)</i> II	Obtenido mediante cruces entre las cepas <i>mtcu-1(tm5041)</i> I y <i>mtcu-2(ok2309)</i> II	Construido en este trabajo
<i>mtcu-2;mttu-1</i>		<i>mtcu-2(ok2309)</i> II; <i>mttu-1(tm3160)</i> IV	Obtenido mediante cruces entre las cepas <i>mtcu-2(ok2309)</i> II y <i>mttu-1(tm3160)</i> IV	Construido en este trabajo
<i>mtcu-2;mttu-1/nT1g</i>		<i>mtcu-2(ok2309)</i> II; <i>mttu-1(tm3160)</i> IV/nT1[qIs51]	Obtenido mediante cruces entre las cepas <i>mtcu-2(ok2309)</i> II, <i>mttu-1(tm3160)</i> IV y nT1g (nT1[qIs51])	Construido en este trabajo

Materiales y métodos

<i>mttu-1;rrf-1</i>	<i>mttu-1(tm3160) IV;rrf-1(pk1417) I</i>	Obtenido mediante cruces entre las cepas <i>mttu-1(tm3160) IV</i> y <i>rrf-1(pk1417) I</i>	Construido en este trabajo
<i>mttu-1;ppw-2</i>	<i>mttu-1(tm3160) IV;ppw-2(pk1673) I</i>	Obtenido mediante cruces entre las cepas <i>mttu-1(tm3160) IV</i> y <i>ppw-2(pk1673) I</i>	Construido en este trabajo

1.1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo son:

- Plásmido L4440 (figura M1): plásmido utilizado en los ensayos de RNA de interferencia (RNAi) por alimentación (feeding). El plásmido posee un origen de replicación (ori) y puede seleccionarse por resistencia a ampicilina (Amp^R). Además, contiene dos promotores T7 en orientación opuesta que flanquean el sitio de clonación múltiple (MCS), de manera que el fragmento insertado en el MCS se transcribe en ambos sentidos formando un dsRNA capaz de silenciar mediante la maquinaria celular de RNAi de *C. elegans*. En el MCS, se encuentran clonadas las secuencias correspondientes a cada uno de los genes que se desean silenciar por interferencia (figura M1) (Timmons and Fire 1998) y pertenecen a la colección de silenciadores para *C. elegans* construida por el grupo de Julie Ahringer del “The Wellcome CRC Institute (University of Cambridge, Cambridge, UK) (Fraser et al. 2000) y distribuida por “Source BioScience”. En este trabajo, los clones fueron cedidos por el Prof. Simon Tuck. Los respectivos plásmidos se transforman y expresan en la cepa HT115 que sirve de alimento al nematodo (Fraser et al. 2000; Timmons et al. 2001).

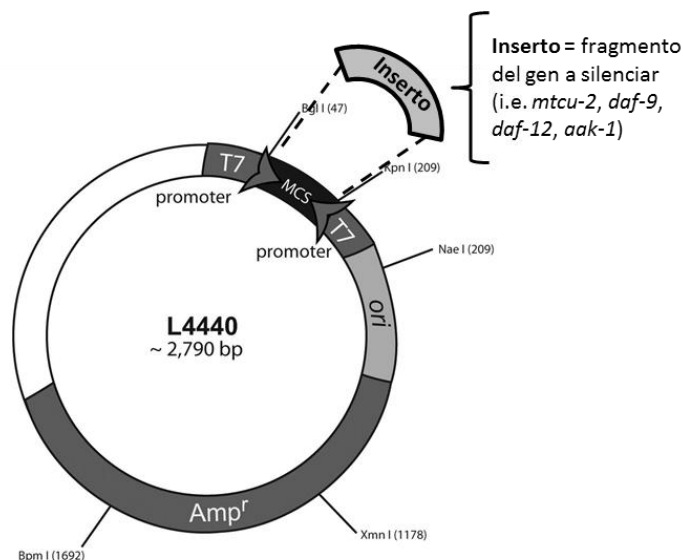


Figura M1. Plásmido L4440. Representación del lugar de inserción de un fragmento del gen a silenciar (inserto). MSC (sitio de clonación múltiple), Amp^R (resistencia a ampicilina), ori (origen de replicación), T7 (promotores).

- pME18S-FL3 (figura M2): plásmido cedido por el National Institute of Genetics (Japan) que contiene los cDNAs de *mttu-1* (clon yk732h3), *mtcu-1* (clon yk1087e01) y *mtcu-2* (clon yk1374e07) de *C. elegans* clonados entre los sitios de restricción de la enzima DraIII (Suzuki et al. 1997). Ha sido utilizado en este trabajo para obtener la secuencia de cDNA de estas tres proteínas, necesaria para estudiar su localización celular. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina (Amp^R) al ser transformado en *E. coli*, lo que facilita la selección de transformantes.

Materiales y métodos

organismos. Permite la construcción de proteínas recombinantes fusionadas a GFP (proteína de fluorescencia verde). Contiene un promotor inducible por galactosa (GAL1). Se muestran los sitios de corte de las diferentes enzimas de restricción.

1.1.5. Oligonucleótidos

En la tabla M3 se muestran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Tabla M3. Relación de cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Tm	Uso en este trabajo
Oligos utilizados en el genotipado de los mutantes			
ceMTO1-L	CTGCCAGATTCTTGGTCGT	64,2°C	Amplificación gen <i>mtcu-2</i> (750 pb en alelo salvaje y 1 kb en alelo mutante)
ceMTO1-R	ACGCTGTTGATTTTGCCTT	63,5°C	
MTO1-int	TCCCGTAGTGATTACAACAC	57,5°C	
ceMTU1-L	TCTCTCCTCCACCAAGGCAT	80,4°C	Amplificación gen <i>mttu-1</i> (1,3 kb en alelo salvaje y 650 pb en alelo mutante)
ceMTU1-R	GGGACATCACATTGTCCACG	71,6°C	
F39+351-R	ACAATTCGTGTATTTCATC	59,3°C	Amplificación gen <i>mtcu-1</i> (1,3 kb en alelo salvaje y 650 pb en alelo mutante)
F39-870-F	AACAAATCAAACACAATACAACC	59,2°C	
pK1417-F1	CACACCTACGAGAGTCATCT		Amplificación gen <i>rrf-1</i> (450 pb en alelo salvaje y 508 pb en alelo mutante)
pK1417-F2	CACAGGAACCGTTTTGCTCA		
pK1417-R	CTGGTGGTTGTCCAGACTTT		
pK1673-F	CGGTTCCGGTTCCGACTCTT	69,5°C	Amplificación gen <i>ppw-2</i> (419 pb en alelo salvaje y 337 pb en alelo mutante)
pK1673-R1	GCGTGGAACAGAATAGCACT	61,9°C	
pK1673-R2	GCCAGAACAATGGGGAACAGA	68,3°C	
Oligos utilizados en la construcción de las proteínas recombinantes unidas a GFP por recombinación homóloga			
reB00-F	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGAAAATGCCACGAGTTG	84,2°C	Construcción de la proteína recombinante MTTU-1:GFP
reB00-R2	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCTCGAGGTCGATAAAGTTTCTTGAATATTC	76,7°C	
ref52-F	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGTCGACAATCTTCGCC	85,5°C	Construcción de la proteína recombinante MTCU-2:GFP
ref52-R	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCTCGAGGTCGATTTTCCGATACAAAATTGTC	81°C	
reGTPBP3-F	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACAATGTGGCGGGGGCTTTGGAC	88,3°C	Construcción de la proteína recombinante MTCU-1:GFP
reGTPBP3-R	AGTTCTTCTCCTTTACTCATTCTCGAGGTCGACTTCCACACAGAAGTCC	84,3°C	
Oligos utilizados para la detección de mt-tRNA^{Gln} y mt-tRNA^{Leu} por Northern Blot			
3'B-Gln	GCAATCAAACCTTTTGCACCAAAAACAA	71,3°C	Detección de mt-tRNA ^{Gln}
3'B-Leu	AGTTGACGGATATCTTTGCGCTTAAAACA	72°C	Detección de mt-tRNA ^{Leu}

Materiales y métodos

Oligos utilizados para calcular la ratio mtDNA/nDNA			
MTCE.21-F	GTTTATGCTGCTGTAGCGTG	61,1°C	Amplificación de parte del gen <i>ctb-1</i> (mitocondrial)
MTCE.21-R	CTGTTAAAGCAAGTGGACGAG	61,4°C	
F36A4.7-F	TGGAAGCTCTGGAGTCACACC	62,9°C	Amplificación de parte del gen <i>ama-1</i> (nuclear)
F36A4.7-R	CATCCTCCTTCATTGAACGG	64,4°C	
Oligos utilizados para cuantificar los niveles de mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real			
			mRNA cuantificado
act1_F	GAAGGAAATCACCGCTCTTG	63.6°C	<i>act-1</i> (usado como normalizador)
act1_R	TCCACATCTGTTGGAAGGTG	63.7°C	
Fgt1_F	AGACAAGTGGGCAGTACTCA	67.2°C	<i>fgt-1</i> (vía de la glicólisis)
Fgt1_R	GGTCCGGTGGCAAAGGA	67.4°C	
Glna1_F	AGCCAAGTGGACGGCTTTT	65.9°C	<i>glna-1</i> (glutaminasa)
Glna1_R	TGCGCCAGCATTGATTAGC	67.3°C	
Acs17_F	GGAGACTATCACTGGAGAAGCTATG	63.2°C	<i>acs-17</i> (vía de la oxidación de los ácidos grasos)
Acs17_R	GAAGTCTTCTCTCAAGAGTAG	64.4°C	
Ldh1_F	GAGAGAAGACTGACAACGAACACTG	65.3°C	<i>ldh-1</i> (vía de la glicólisis)
Ldh1_R	GAACGACTGGAAGAGAAAGGTAGAC	64.3°C	
Hsp6_F	CAAACCTCTGTGTCAGTATCATGGAAGG	70°C	<i>hsp-6</i> (vía UPR ^{mt})
Hsp6_R	GCTGGCTTTGACAATCTTGATGGAACG	72.9°C	
Ucp4_F_a	CGAACTTAAAGATAATTGGCTAACTCA	63.3°C	<i>ucp-4</i>
Ucp4_R_a	CGACATCTGATGGAAGTGATACAA	64.9°C	
Acdh12_F	CCGATGTTTTCACTGTGTTTTGC	66.4°C	<i>acdh-12</i> (vía de la oxidación de los ácidos grasos)
Acdh12_R	CAAACGCTCTTTCGACAATGAAT	66°C	
Hsp60_F	AGTCGTCGTTGCAGAGCTCAA	67.4°C	<i>hsp-60</i> (vía UPR ^{mt})
Hsp60_R	TCTTCATGGCGTCACTGATGA	66.9°C	
Pfk1.1_F	GCTCGACTTTATCCGTCAGC	63.8°C	<i>pfk-1.1</i> (vía de la glicólisis)
Pfk1.1_R	CAGCGCTGTTTCATACCTTGA	64°C	

1.2. Material químico y bioquímico

1.2.1. Medios de cultivo y tampones

- Medio LBT: utilizado para el crecimiento de las cepas de *E. coli*. Este medio contiene: 10 g/l de NaCl, 10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 40 mg/ml de timina. Necesita ser autoclavado antes de usarlo.

- Medio YPD: empleado para el crecimiento de *S. cerevisiae*. Este medio de cultivo líquido contiene: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona y 20 g/l de glucosa. Autoclavar antes de utilizar.
- Medio SD: empleado para el crecimiento en sólido de *S. cerevisiae*. Este medio incluye: 6,7 g/l de “yeast nitrogen without aa”, 20 g/l de agar, 2% de glucosa y 850 ml de H₂O. Autoclavar antes de distribuir en placas.
- Placas de agar NGM (“Nematode Growth Media”) (Brenner 1974): utilizadas para el mantenimiento de las cepas de *C. elegans*. La receta de este medio es la siguiente: autoclavar 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona y 17 g de agar disueltos en 975 ml H₂O. Una vez enfriado hasta una temperatura aproximada de 55°C, en la que aún no ha comenzado a solidificar, añadir, en este mismo orden, 1 ml de CaCl₂ (1 M), 1 ml de colesterol (5 mg/ml en etanol al 100%), 1 ml de MgSO₄ (1 M) y 25 ml de tampón KPO₄ (1 M). Mezclar bien y rellenar placas Petri de 55 mm de diámetro con 15 ml del medio. Es importante dejar secar bien las placas a temperatura ambiente durante 2 ó 3 días antes de utilizarlas.
- Tampón KPO₄ (1 M) pH 6: para preparar este tampón es necesario preparar las soluciones A y B por separado y mezclarlas posteriormente para obtener el pH correcto (pH 6). Solución A: disolver 34 g de KH₂PO₄ en 250 ml de H₂O. Solución B: disolver 45,6 g de K₂HPO₄ en 200 ml de H₂O. Añadir lentamente la solución B a la solución A para subir el pH hasta pH 6. Separar en alícuotas de 50-100 ml y autoclavar.
- Medio M9 1x (Brenner 1974): utilizado en diversos métodos de trabajo de *C. elegans*. Se disuelven y autoclavan 5,8 g/l de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g/l de KH₂PO₄, 5 g/l de NaCl y 0,25 g/l de MgSO₄·7H₂O en H₂O.
- Medio S-basal: utilizado para crecer en cultivo líquido las cepas de *C. elegans*. A 897,96 ml de H₂O se le añaden 20 ml de NaCl 5 M, 50 ml de KH₂PO₄ 1 M y 0,03 ml de Antifoam A concentrado. Tras autoclavar esta solución se añaden, en condiciones de esterilidad, 10 ml de K-citrato 1 M pH 6.0 (20 g de ácido cítrico monohidratado y 293,5 g de citrato tripotásico monohidratado para 1 litro de H₂O), 5 ml de 2 x “trace metal solution” (186 mg de Na₂EDTA, 69 mg de FeSO₄·7H₂O, 20 mg de MnCl₂·4H₂O, 29 mg de ZnSO₄·7H₂O y 1.6 mg de CuSO₄ para 100 ml H₂O), 3 ml de CaCl₂ (1 M), 3 ml de MgSO₄ (1 M), 1 ml de colesterol 5 mg/ml (en etanol 100%) y 10 ml de nistatina (10.000 unidades/ml, -20°C).

- Solución de glicerinado para *E. coli*: 65% de glicerol (v/v), 0,1 M de MgSO₄ y 25 mM de TrisHCl pH 8.
- Medio de congelación de *C. elegans* (Brenner 1974): se disuelven y autoclavan 5,58 g/l de NaCl, 6,8 g/l de KH₂PO₄ (anhidro), 300 g/l de glicerol, 5,6 ml/l de NaOH (1 M) en H₂O. Tras el autoclave, añadir 3 ml/l de MgSO₄ 0,1 M en condiciones de esterilidad.
- Solución hipoclorita alcalina al 20%: se utiliza en el protocolo de sincronización de *C. elegans* y tiene que prepararse inmediatamente antes de su uso. Se añaden 3,25 ml de NaOH 1 M y 3 ml de lejía a 8,25 ml de H₂O.
- Placas NGM para RNAi: son placas NGM enriquecidas con IPTG, lo que permite la activación de los promotores de la polimerasa T7, y antibióticos, que corresponden a la resistencia de la cepa de *E. coli* HT115 (Tet^R) y del plásmido L4440 (Amp^R). Autoclavar 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona, 17 g de agar y 1 ml de colesterol 5 mg/ml (en etanol al 100%) disueltos en 1 litro de H₂O. Una vez la solución se ha enfriado hasta una temperatura de 55°C, se añade 1 ml de CaCl₂ 1 M, 1 ml de MgSO₄ 1 M, 15 ml de K₂HPO₄ 1 M pH 6, 0,5 ml de ampicilina 100 mg/ml, 0,5 ml de tetraciclina 100 mg/ml y 2,5 ml de IPTG 100 mg/ml (siendo la concentración final de IPTG en placa de 1 mM). Distribuir en placas Petri y dejar secar durante 2 ó 3 días.
- Tampón de lisis (para el genotipado de único gusano): se prepara una disolución de 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,2, 2,5 mM MgCl₂, 0,45% NP-40, 0,45% Tween 20 y 0,01 % gelatina y se divide en diferentes alícuotas de 200 µl cada una, que se almacenan a -20°C.
- Tampón de lisis (para purificar mitocondrias): se prepara siempre fresca. La solución contiene 20 mM de MOPS pH 7,2, 500 mM de sacarosa y 1 mM de EDTA).
- Proteinasa K (10 mg/ml): la proteinasa K se solubiliza en agua a una concentración de 10 mg/ml y se almacena en alícuotas de 5 µl a -20°C.

1.2.2. Reactivos

Todas las enzimas y reactivos químicos usados en este trabajo fueron de grado apto para biología molecular y para el cultivo de *C. elegans*. La mayoría fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: GE Healthcare, Invitrogen, MERCK, Lifetechnologies, Panreac, Promega, Roche y Sigma; y se encuentran detallados en el anexo I.

1.3. Equipos

El Laboratorio de Modificación de RNA y Enfermedades Mitocondriales dispone de todos los instrumentos habituales para la ejecución de técnicas de Biología Molecular y Genética Microbiana (i.e. pipetas, electroforesis, análisis por HPLC y PCR cuantitativa), además de material básico para la manipulación de *C. elegans* (i.e. estufas y estereomicroscopio). El CIPF cuenta con servicios que permiten realizar los ensayos especificados en este trabajo como microscopia de fluorescencia, incubadores, centrífugas, etc. El laboratorio del Prof. P. Dedon tiene todo el instrumental científico necesario para realizar los análisis de los ribonucleósidos por espectrometría de masas. El Laboratorio del Prof. S. Tuck cuenta con el material básico para la manipulación y el análisis de *C. elegans*. El anexo II contiene un listado de los equipos utilizados.

1.4. Programas informáticos

- Windows Office para el tratamiento de textos.
- GraphPad Prism para el análisis estadístico descriptivo e inferencial.
- Primer3 y Primer Express para el diseño y análisis de oligonucleótidos para PCR.
- Step One software 2.0 para el tratamiento de datos de PCR cuantitativa.
- ImageQuant para el análisis densitométrico.
- EndNote para manejo de referencias.
- ImageJ y GIMP para el análisis de imágenes de fluorescencia.
- EZCHROM elite para visualización y análisis de datos en HPLC.
- “Qualitative Analysis B.06.00’ de Mass Agilent para el análisis de datos de espectrometría de masas.
- Clustal Omega de EMBL-EBI para el alineamiento de secuencias proteicas.
- Las bases de datos PubMed, MODOMICS, CGC, NCBI, MITOMAP, WormAtlas, WormBook y Wormbase para obtener información de artículos, modificaciones de RNA, secuencias génicas y cepas de *C. elegans*.

2. Métodos

2.1. Mantenimiento y crecimiento de los cultivos bacterianos y de nematodos

2.1.1. Cultivos bacterianos

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LBT (con o sin antibiótico, según los requerimientos de la cepa, para seleccionar las bacterias que contienen un plásmido específico) a 37°C con agitación, siguiendo los procedimientos descritos por (Miller 1992).

Para mantener las cepas bacterianas a largo plazo se almacenan a -80°C mezclando, en una proporción 1:1, el cultivo crecido en medio líquido LBT con la solución de glicerinado.

La preparación de competentes bacterianas y su transformación con plásmidos se realizó siguiendo procedimientos estándar (Hanahan et al. 1991).

2.1.2. Cultivos de *S. cerevisiae*

Para crecer y transformar *S. cerevisiae* se han utilizado métodos y procedimientos clásicos de crecimiento de levadura, que han sido descritos en el libro *Methods in Yeast Genetics* (Burke et al. 2000).

2.1.3. Cultivo de *C. elegans*

2.1.3.1. Cultivo sólido

Los protocolos de crecimiento estándar de *C. elegans*, así como los protocolos de congelación y limpieza, están descritos en el capítulo de “Mantenimiento de *C. elegans*” en el *WormBook* (Stiernagle 2006). En el desarrollo de este trabajo la temperatura habitual de mantenimiento de *C. elegans* fue de 20°C, excepto que se especifique de otra manera.

2.1.3.2. Cultivo líquido

El protocolo utilizado en este trabajo para crecer cultivos líquidos de *C. elegans* ha sido descrito por Stiernagle en un capítulo del WormBook (Stiernagle 2006).

En este caso se ha iniciado el litro de cultivo líquido de *C. elegans* a partir de 6 placas de gusanos crecidas en cultivo sólido y sin restos de bacteria. El proceso de recogida es el siguiente: se lavan los nematodos con medio M9 1x estéril (aprox. 2 ml cada vez), se inclinan ligeramente las placas para que los gusanos se escurran a un lado de la placa y puedan recogerse en tubos falcon de 15 ml. Se debe tener la precaución de utilizar siempre puntas, material y condiciones estériles. Se centrifugan los nematodos a 1400 rpm durante 1 min y se elimina el sobrenadante con cuidado de no perder o romper el pellet de gusanos. A continuación, se lavan 2 - 3 veces con medio M9 1x estéril para eliminar restos de bacteria. Finalmente, se disuelven en medio S-basal y se añaden a 1 litro de medio líquido (S-basal complementado tras autoclave). También se añaden 6 g aproximadamente de pellet de la cepa bacteriana MnmE nula al cultivo líquido para que sirva de sustento a los nematodos. El cultivo se crece a 20°C en agitación a 180 rpm durante varios días. Se debe monitorizar la cantidad de bacteria que queda en el cultivo líquido midiendo la OD600 y reponer con más cultivo de MnmE nula, siempre que sea necesario (aproximadamente en días alternos de cultivo). También se monitoriza el estado de los nematodos, tomando una muestra de cultivo líquido y observándola en el estereomicroscopio, de manera que se pueda determinar el estadio de los gusanos a medida que se desarrollan o si aparece algún tipo de contaminación.

Una vez el cultivo ha crecido suficientemente, cosa que ocurre entre los 6 y 9 días del inicio del cultivo líquido, se recogen los gusanos. Para ello se centrifuga el litro de cultivo líquido a 1500 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante. Posteriormente, se lava 5 veces con medio M9 1x estéril, repitiendo los ciclos de centrifugado en los lavados. Aproximadamente se obtienen entre 8 y 12 g de gusanos de una población mixta a partir de 1 l de cultivo líquido.

2.2. Genotipado (PCR a partir de un único gusano)

Este protocolo permite lisar individualmente gusanos, de manera que es posible realizar una PCR directamente a partir del lisado de un único gusano. Resulta muy útil el genotipado de los individuos en el proceso de cruce y para comprobar las mutaciones knock-out genéticas.

Materiales y métodos

A 200 μ l de tampón de lisis se le añaden 2 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). Se dispensan 7,5 μ l de esta mezcla en un tubo de PCR. Se transfiere un único gusano a la solución de lisis, procurando transferir la mínima cantidad de bacteria posible. Es aconsejable observar bajo la lupa la presencia del gusano en el tampón de lisis en el fondo del tubo.

Los gusanos se lisan en el termociclador siguiendo el siguiente programa: 60 min a 60°C (en los que el gusano es lisado) y 15 min a 95°C (que permiten inactivar la proteinasa K). Los lisados se mantienen a 4°C hasta su uso.

2 μ l de este lisado son suficientes para una reacción de PCR de 20 μ l de volumen. Las condiciones de la reacción de PCR se adaptarán a cada uno de genes amplificados y a la polimerasa. Las condiciones típicas son las siguientes:

Mezcla de reacción	
Buffer 10x	2 μ l
dNTPs	2 μ l
MgCl ₂	1 μ l
MIX oligos	1 μ l
TAQ	0,1 μ l
H ₂ O	11,9 μ l
Lisado de gusano	2 μ l

Características de la PCR	
Condiciones:	
95 °C	5 min
95°C	30 s
58 °C	30 s
72 °C	1 min 30 s
72 °C	10 min
8 °C	∞

x 34
ciclos

Finalmente, el resultado de la amplificación por PCR se corre en un gel de agarosa y se detecta con GelRedStain. El porcentaje de agarosa utilizado depende del tamaño de fragmento esperado.

2.3. Obtención de machos

Se colocan 5 individuos L4 hermafroditas por cada una de las seis placas NGM sembradas con la cepa bacteriana OP50 que se requieren para el ensayo. Se someten a un choque térmico (30 – 32°C) durante 4 – 6 h. A continuación, las placas se mantienen a 20°C. En la descendencia (F1) se obtienen unos pocos machos por placa. Para mantenerlos y aumentar el número de machos en la placa, es conveniente separarlos y cruzarlos con hermafroditas de la misma cepa.

2.4. Cruces (“retrocruces” y obtención de dobles mutantes)

Con la finalidad de que todas las cepas tengan un mismo fondo genético que disminuya la posible variabilidad que puede existir entre ellas y puedan ser comparadas entre sí y con la cepa salvaje, se realizan “retrocruces” con la cepa salvaje N2. De esta manera, las diferencias que se observen entre los mutantes y la cepa salvaje corresponderán únicamente a la mutación del gen de estudio (que habrá sido seleccionada específicamente durante los “retrocruces”). La mecánica de este proceso de “retrocruce” es muy similar a la de obtención de dobles mutantes por cruces entre las dos cepas simples, por lo que estos procedimientos serán descritos de manera conjunta en este apartado.

La mecánica de los cruces es la siguiente: se trata de cruzar machos de una de las cepas con hermafroditas de la otra cepa cuyas mutaciones o fondo genético se deseen combinar, como se describe visualmente en la figura M4. Se utilizan aproximadamente 10 placas NGM (ya sembradas con OP50 en una pequeña superficie) en cada paso del cruce y en cada una de las placas se coloca un hermafrodita y un macho, ambos en el estadio L4. La elección del estadio L4 para iniciar los cruces asegura que el hermafrodita no ha podido cruzarse con ningún otro macho ni ha empezado la auto-fertilización, de manera que se favorece que los descendientes encontrados en la placa provengan del cruce. Las placas en cuya descendencia (F1) se observan machos (aprox. en un porcentaje del 50%) como resultado del cruce son las adecuadas para continuar el proceso. Estos descendientes (F1) son heterocigotos para el gen de interés.

De cada placa de la F1 se seleccionan, al menos, 2 – 4 hermafroditas en estadio L4 que se colocan individualmente en placas NGM sembradas con OP50 para que den descendencia por auto-fertilización. Una vez ha pasado el tiempo necesario para que estos hermafroditas pongan sus huevos (F2), se retiran de la placa y se confirma su genotipo heterocigoto realizando PCRs a partir de un único gusano o mediante marcadores fenotípicos (como es el caso del balanceador nT1g, ya que emite fluorescencia GFP en la faringe de los gusanos que lo contienen). Los descendientes (F2), cuyos genotipos son variados (homocigoto salvaje, heterocigoto u homocigoto mutante), se desarrollan y se escogen 10 – 12 hermafroditas en estadio L4 que se colocan individualmente en placas NGM sembradas con OP50 para su auto-fertilización. De nuevo, una vez ha transcurrido el tiempo necesario para que estos hermafroditas pongan huevos (F3), los hermafroditas son retirados de las placas y se seleccionan los homocigotos mutantes según su

genotipo, analizado mediante PCR, o características visuales, como la expresión de fluorescencia. La placa o placas con los descendientes (F3) de estos hermafroditas homocigotos mutantes se selecciona(n) y se mantiene(n) en cultivo, ya que todos los nematodos tienen el genotipo que buscamos. En caso de que ninguno de los hermafroditas tenga el genotipo deseado, se debe seleccionar aquella con un genotipo apropiado para seguir la auto-fertilización, como por ejemplo, una heterocigota (con un alelo mutante y otro salvaje del gen de interés) y repetir el proceso explicado.

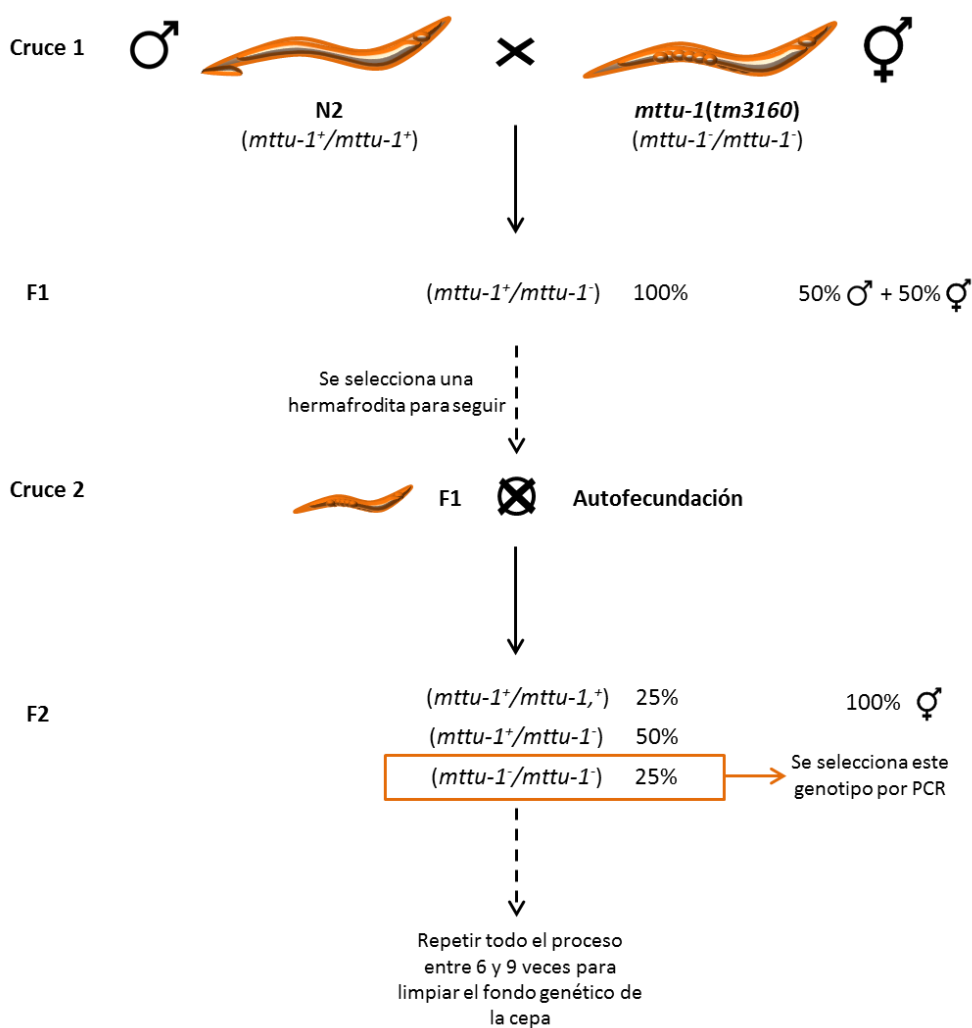


Figura M4. Representación de un “retrocruce”. La figura ilustra el proceso seguido para limpiar genéticamente una cepa mutante de *C. elegans* (*mttu-1(tm3160)* en este caso) y proporcionar el mismo fondo genético que la cepa salvaje (*N2*). Se indica el genotipo de cada cepa para el gen de interés. El

superíndice + representa el alelo salvaje y el superíndice – representa el alelo mutante. Los dos alelos del gen se encuentran separados por /. De esta manera, $mttu-1^+/mttu-1^+$ indica que el par de alelos del gen $mttu-1$ son salvajes y se encuentran en homocigosis, $mttu-1^+/mttu-1^-$ indica que los alelos se encuentran en heterocigosis y $mttu-1^-/mttu-1^-$ indica que ambos alelos son mutantes. F1 (primera generación) y F2 (segunda generación).

Es necesario repetir este proceso entre 6 y 9 veces para uniformizar el fondo genético de dos cepas (“retrocruce”), como se ha realizado con cada uno de los simples mutantes y la cepa salvaje (figura M4). Si, en cambio, se trata de cruces para obtener dobles mutantes, se sigue un esquema muy similar (figura M5) pero en el que tras cada cruce se debe genotipar (o seleccionar por características visuales) los dos genes de interés y determinar el estado de homocigosis o heterocigosis de cada uno de ellos. Los cruces y la auto-fecundación se repiten hasta obtener un doble mutante que sea homocigoto mutante para los dos genes de interés.

Materiales y métodos

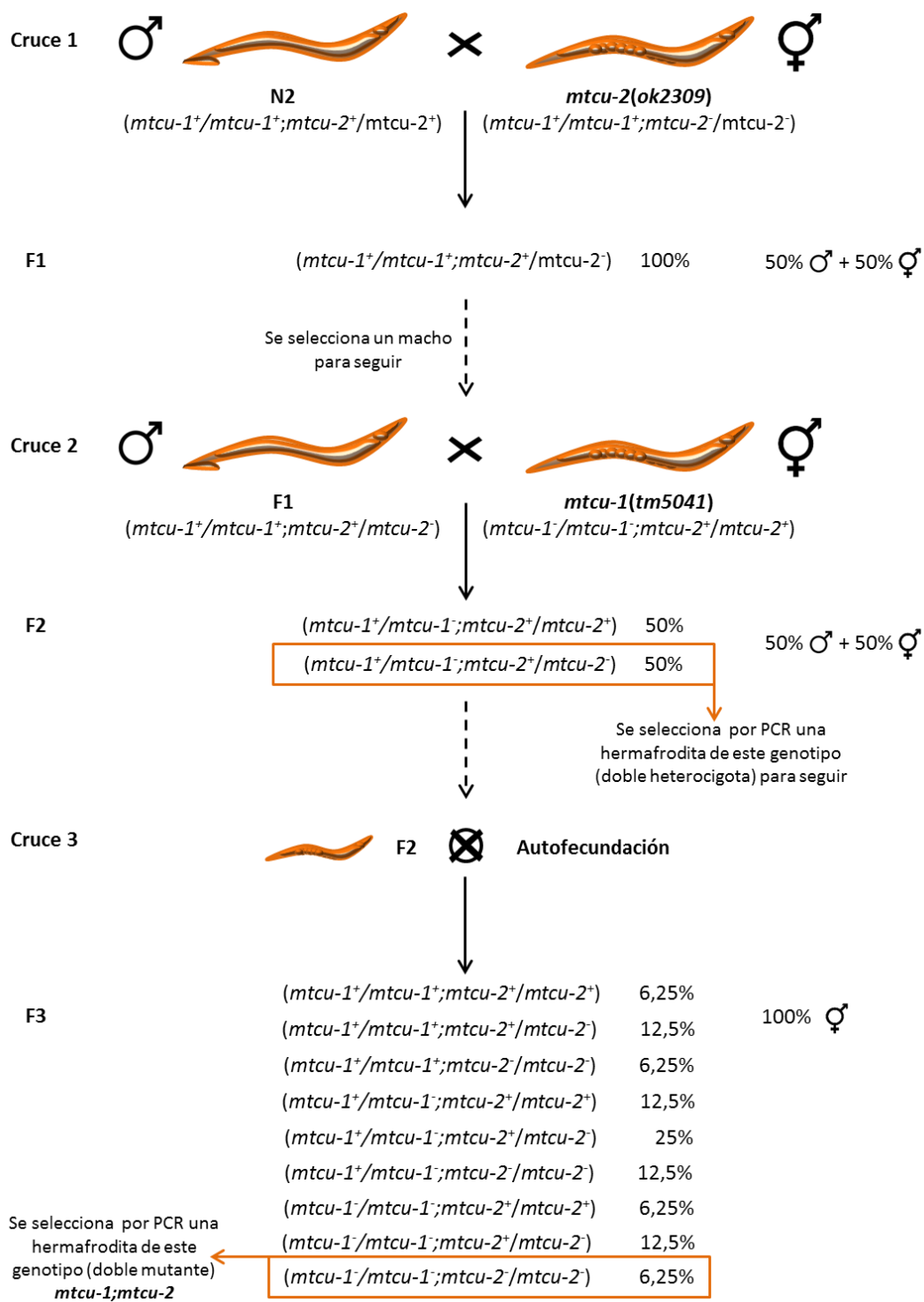


Figura M5. Representación de los cruces a realizar para obtener un doble mutante. La figura ilustra el proceso seguido para obtener el doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* mediante el cruce de los mutantes simples. Se indica el genotipo de cada cepa para los genes de interés. El superíndice + representa el alelo salvaje y el

superíndice – representa el alelo mutante. Los dos alelos de cada gen se encuentran separados por / y los dos genes por ;. De esta manera, el genotipo $mtcu-1^+/mtcu-1^+;mtcu-2^+/mtcu-2^+$ indica que los alelos salvajes de cada gen se encuentran en homocigosis, mientras que $mtcu-1^+/mtcu-1^-;mtcu-2^+/mtcu-2^-$ indica que los alelos de ambos genes se encuentran en heterocigosis y $mtcu-1^-/mtcu-1^-;mtcu-2^+/mtcu-2^-$ indica que ambos alelos del gen *mttu-1* son mutantes y que el gen *mtcu-2* está en heterocigosis. F1 (primera generación), F2 (segunda generación) y F3 (tercera generación).

2.5. Sincronización de *C. elegans*

Es posible sincronizar los gusanos de *C. elegans* para que inicien su desarrollo en un mismo estadio al mismo tiempo, de manera que puedan obtenerse poblaciones uniformemente desarrolladas en sus estadios larvarios. La sincronización de los nematodos se ha realizado según el procedimiento descrito por Stiernagle en un capítulo del WormBook (Stiernagle 2006). De manera resumida, se utiliza una solución que contiene lejía (solución hipoclorita alcalina al 20%) para matar a los hermafroditas adultos con huevos y disolver su cutícula, de manera que los huevos, que son resistentes a la solución hipoclorita alcalina a ese tiempo de tratamiento, quedan dispersos en la solución. El lavado de los huevos y su incubación durante la noche en tampón M9 1x permite que los huevos eclosionen pero que detengan su desarrollo en estadio L1, debido a la ausencia de cultivo bacteriano para alimentarse. Una vez los huevos han eclosionado y producido larvas L1, éstas se colocan en placas sembradas con OP50 para que reanuden su desarrollo de una manera sincronizada.

2.6. Construcción y expresión de proteínas de fusión fluorescentes en *S. cerevisiae*

Para estudiar la localización subcelular de las proteínas de *C. elegans* MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 se han utilizado proteínas derivadas recombinantes fusionadas con GFP, una proteína fluorescente. La figura M6 ilustra este proceso. Para ello se han amplificado por PCR los cDNAs correspondientes a cada una de las proteínas exceptuando su codón de parada. Los cebadores utilizados para amplificar cada una de las ORFs (pauta abierta de lectura) contienen, en su región 3', secuencias específicas de los cDNAs a amplificar y, en su región 5', secuencias homólogas a la región del plásmido pGREG600 donde se desean insertar los fragmentos amplificados. De esta manera, los fragmentos fueron clonados por recombinación homóloga en *S. cerevisiae*

conteniendo el plásmido pGREG600. El resultado fue que la secuencia del cDNA de cada una de las proteínas de *C. elegans* quedó fusionada, en su extremo 3', a la secuencia GFP codificada en el plásmido, como se muestra en la figura M6. Este plásmido (pGREG600) contiene un promotor GAL1 que controla la expresión de la proteína de fusión recombinante. Este procedimiento ha sido descrito por Jansen y colaboradores (Jansen et al. 2005). Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento de cDNA y recombinar en *S. cerevisiae* se muestran en la tabla M3. La transformación de esta construcción en levadura fue realizada por el protocolo de transformación con acetato de litio (Ito et al. 1983).

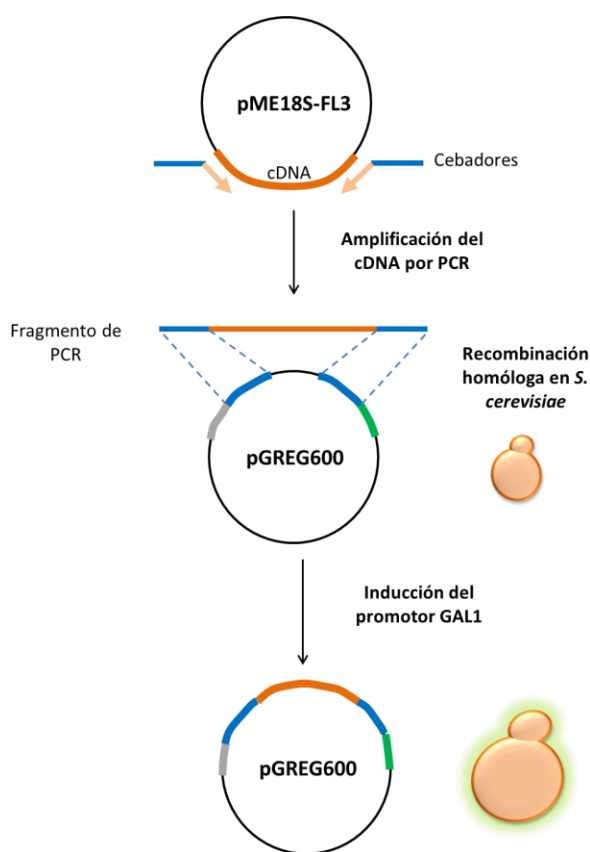


Figura M6. Ilustración de la construcción y expresión de las proteínas de fusión fluorescentes en *S. cerevisiae*. El cDNA (naranja) de cada una de las proteínas (contenido en el plásmido pME18S-FL3) es clonado utilizando cebadores que contienen una región de hibridación al cDNA (naranja claro) y otra región idéntica a una zona del plásmido pGREG600 (azul) que es necesaria para producir la recombinación homóloga en *S. cerevisiae* e insertar el cDNA. En gris se indica el promotor GAL1 y en verde la secuencia para

la expresión de GFP. Como consecuencia de la inducción del promotor GAL1 se expresan las proteínas de fusión y puede observarse su localización en levadura gracias a la fluorescencia GFP.

2.7. Purificación de mitocondrias crudas

Se parte de aproximadamente 8 - 12 g de una población mixta de gusanos obtenidos a partir de un litro de cultivo líquido. Tras un exhaustivo lavado de los mismos con tampón M9 1x, 4 g de pellet de nematodos se solubilizan en 4 ml de tampón de lisis (para purificar mitocondrias), descrito en el apartado 1.2.1. A continuación, se realizan 3 ciclos de congelación/descongelación usando, alternativamente, nitrógeno líquido y un baño a 37°C. Tras la última descongelación, se ponen en hielo y se sonicán en frío con 5 pulsos intermitentes de 20 s cada uno. Sin embargo, la lisis completa de los gusanos no se consigue hasta que se trituran junto con perlas de vidrio en un mortero. Esta lisis puede ser monitorizada al observar unos pocos microlitros de la muestra del mortero bajo el estereomicroscopio. Una vez se ha conseguido lisar todo el precipitado de gusanos, la muestra se centrifuga durante 30 min a 16000 g, a 4°C, para sedimentar la fracción cruda de mitocondrias. Aproximadamente, se obtienen entre 200 y 300 mg de extracto crudo de mitocondrias que puede conservarse a -20°C hasta su uso.

2.8. Purificación de RNA

En este trabajo se han utilizado diversas especies de RNA de *C. elegans* que han sido extraídas por diferentes métodos.

2.8.1. Purificación de RNA total pequeño a partir de un extracto de mitocondrias crudas de *C. elegans*

El RNA total pequeño mitocondrial se extrae a partir de 200 – 300 mg de un pellet de mitocondrias crudas de cada una de las cepas de *C. elegans*, siguiendo el protocolo descrito para la purificación de tRNAs de *E. coli* (Emilsson et al. 1992) pero sin añadir lisozima al tampón de lisis.

2.8.2. Purificación de RNA total de *C. elegans*

El RNA total de *C. elegans* puede obtenerse a partir de un volumen de 500 µl de un cultivo mixto de gusanos. A este volumen se le añade 1 ml de Trizol y se solubiliza el precipitado mediante el uso del vórtex (5 ciclos de 15 s cada uno) y de un tiempo de 5 min mínimo de reposo a temperatura ambiente al finalizar todos los ciclos. A continuación, se procede a centrifugar la mezcla a 14000 g durante 10 min, a 4°C, de manera que se forma un precipitado de la fracción insoluble. Al sobrenadante se le añaden 200 µl de CHCl₃ y se mezcla invirtiendo el tubo y con agitación en el vórtex durante 15 s. Los tubos se dejan a temperatura ambiente durante 2 ó 3 min antes de centrifugar a 14000 g durante 15 min a 4°C para separar las fases. El sobrenadante se pasa a un tubo limpio, se mezcla con 500 µl de isopropanol y se deja reposar durante 10 min para que el RNA precipite. El RNA precipitado se recupera por centrifugación (a 14000 g durante 10 min a 4°C). Tras eliminar el sobrenadante, el pellet, que contiene el RNA, se lava con 100 µl de etanol al 70%. De nuevo, se centrifuga la muestra a 7500 g durante 5 min a 4°C y se elimina el sobrenadante. El pellet se seca al aire libre inicialmente (durante 5-10 min) y al vacío después (durante 7 min como máximo para no secarlo demasiado). Se disuelve en 50 µl de agua y se cuantifica la concentración de RNA total obtenida. En ocasiones es necesario calentar los precipitados a 60°C para disolverlos completamente.

2.8.3. Purificación de RNA total pequeño a partir de *C. elegans*

Para cada cepa de *C. elegans*, se procesa un volumen de 500 µl de un cultivo mixto con el kit "Isolation of small and large RNA" de NucleoSpin® miRNA kit (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo descrito en el manual y denominado "RNA purification in combination with Trizol® lysis: small RNA".

2.9. Análisis de las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de *C. elegans* por espectrometría de masas

Una muestra de 30 µg de RNA total pequeño mitocondrial, obtenido de extractos crudos de mitocondrias de las cepas salvaje y mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*, se trata consecutivamente con nucleasa P1 (1,2 unidades de enzima, durante la noche - 16h - a 37°C) y fosfatasa alcalina bacteriana (0,2 unidades de enzima, 2h a 37°C). Posteriormente, se añade 1 µl del nucleósido marcado 15N5dA a 5 µM como control interno. Los hidrolizados se pre-purifican mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia-High Performance Liquid Chromatography) en una columna Develosil C30 con un gradiente de 10 mM de fosfato amónico y metanol como fase móvil (Gehrke and Kuo 1989). Las fracciones correspondientes a los tiempos de elución de los nucleósidos cmn^5U , mnm^5U , $cmnm^5s^2U$, mnm^5s^2U , s^2U , A y U, previamente determinados mediante patrones comerciales, se colectan manualmente y se liofilizan. Cada uno de los nucleósidos se disuelve en agua y se analiza en un HPLC en fase reversa con un 0,1% de ácido fórmico y un gradiente de acetonitrilo con un flujo de 0,3 ml/min. La tabla M4 muestra las condiciones del HPLC.

Tabla M4. Condiciones cromatográficas para resolver los nucleósidos previamente a ser analizados por un espectrómetro de masas.

Tiempo	% Tampón A (0,1% de ácido fórmico en H₂O)	% Tampón B (0,1% ácido fórmico en acetonitrilo)
0 minutos	100	0
12 minutos	99	1
18,7 minutos	94	6
20 minutos	94	6
24 minutos	0	100
27,3 minutos	0	100
28 minutos	100	0
41 minutos	100	0

La columna del HPLC (1290 uHPLC, Agilent) está acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo de ionización por electrospray (6490 ESI-QQQ, Agilent) que opera en modo ion positivo. El tiempo de retención, la relación m/z (masa-carga) del ion parental transmitido, la relación m/z del producto iónico monitorizado, el voltaje de fragmentación y la energía de colisión de cada nucleósido modificado a estudiar, así como de la uridina y la adenina se determinan gracias al uso de patrones comerciales, espectrometría de alta resolución y los patrones de fragmentación generados por Disociación Inducida por Colisión (CID) en un espectrómetro de masas de cuadrupolo TOF (Time-of-flight) (QTOF) y están especificados en la tabla M5.

Tabla M5. Datos de fragmentación de los nucleósidos en el espectrómetro de masas.

Nucleósido	Tiempo de retención	Relación m/z (ion parental)	Relación m/z (ion producto)	Voltaje de fragmentación	Energía de colisión
mnm ⁵ U	1,77 min	288,1	125,1	380 V	8 V
cmnm ⁵ U	1,86 min	332,1	125,1	380 V	8 V
mnm ⁵ s ² U	3,87 min	304,1	141,1	380 V	14 V
cmnm ⁵ s ² U	4,31 min	348,1	141,1	380 V	16 V
U	3 min	345,1	113,1	380 V	6 V
A	5,7	268,1	136,1	380 V	16 V

Los resultados se analizan en el software “Qualitative Analysis B.06.00” de Mass Agilent, y las señales se normalizan respecto al control 15N5dA y a los niveles de rU y rA. El diagrama de flujo M7 resume el procedimiento.

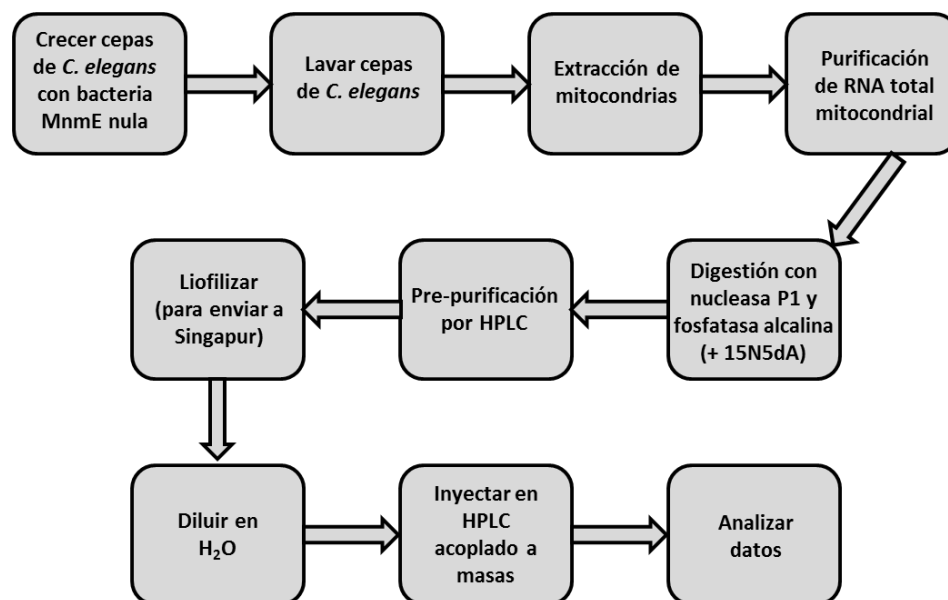


Figura M7. Diagrama de flujo del procedimiento para analizar las uridinas modificadas en los RNAs pequeños mitocondriales de *C. elegans* por espectrometría de masas.

2.10. Electroforesis en gel desnaturizante con APM y análisis por transferencia Northern

El análisis de la tiolación de los tRNAs mitocondriales se realiza mediante una técnica de transferencia Northern no radioactiva en un gel de poliacrilamida conteniendo urea y fenilmercurio (APM). En este análisis, el compuesto de mercurio (APM) que contiene el gel interacciona específicamente con los tRNAs que contienen un grupo tiocarbonilo, lo que añade masa a la muestra y provoca un retraso en su migración en el gel. El compuesto de APM ([p-(N-acrylamino)-phenyl]mercuric chloride) fue sintetizado (Igloi 1988) y cedido amablemente por el Prof. Stephane Vincent. Para fabricar los gels utilizamos acrilamida al 10%, urea a una concentración final de 8 M y 0,01 mg/ml de APM. Una muestra de 10 µg de RNA total pequeño se carga en cada gel y la electroforesis se realiza a 200 V durante 3 h a 4°C. Posteriormente, se realiza una transferencia semiseca de las muestras a una membrana de nylon cargada positivamente. Para estabilizar la muestra transferida a la membrana se irradia la misma con luz ultravioleta durante 2 minutos y, a continuación, se incuba a 80°C durante 45 minutos.

Para detectar los mt-tRNAs Leu y Gln se usan sondas específicas de DNA marcadas en su extremo 5' con digoxigenina (tabla M3) y se utilizan a una concentración final de 10 nM durante el

proceso de hibridación Northern. El revelado se realiza utilizando el kit de detección de digoxigenina “DIG luminiscent detection CDP-Star kit” de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.11. Ensayo de sensibilidad a la actividad endonucleasa de la angiogenina

Se digieren 7 μg de RNA total pequeño con 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de angiogenina en un tampón conteniendo 30 mM de HEPES pH 6,8, 30 mM NaCl y 0,001% de BSA. La digestión del RNA se realiza por incubación a 37°C a diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3h) y, tras la digestión, se inactiva la angiogenina a 95°C durante 10 minutos y se congelan las muestras, tal como se muestra en la figura M8. Los RNAs digeridos se separan en geles al 15% de poliacrilamida con 8 M de urea, a 200 V. Dado que interesa analizar la sensibilidad a la angiogenina de mt-tRNAs específicos, se realiza una transferencia Northern y se detectan los tRNAs dianas mediante sondas específicas, marcadas con digoxigenina, tal como se ha explicado en el apartado anterior.

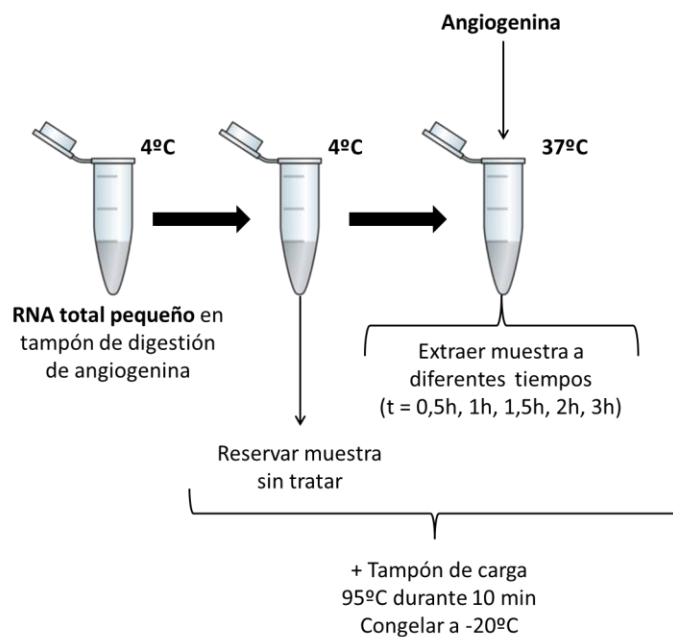


Figura M8. Representación del ensayo de digestión del RNA total pequeño de *C. elegans* con la nucleasa angiogenina.

Se cuantifican las señales obtenidas utilizando el software ImageQuant y se calcula la cinética de la digestión, representando la intensidad de señal respecto a los diferentes tiempos de digestión.

2.12. Cuantificación de la sobreexpresión de los mt-tRNAs

Los análisis Northern se escanearon y las medidas densiométricas se realizan gracias al software ImageQuant. Se compara la intensidad de los mt-tRNAs obtenidos de cepas mutantes con los de la cepa salvaje mediante el test estadístico T-test y se representa el valor medio \pm SEM.

2.13. Tinción con TMRE y MitoTracker Red

El potencial de membrana mitocondrial puede determinarse mediante el uso de TMRE y MitoTracker Red. TMRE es un colorante fluorescente (tonalidad rojo-naranja), cargado positivamente, que se acumula en mitocondrias funcionalmente activas. Las mitocondrias despolarizadas, al tener un menor potencial de membrana, tienen una menor capacidad de secuestrar el compuesto TMRE por lo que se acumula en ellas en un menor grado. MitoTracker Red, de forma similar, tiñe las mitocondrias en las células vivas y su acumulación en este orgánulo depende, también, del potencial de membrana mitocondrial.

Para la tinción con TMRE se disuelve este colorante en DMSO a una concentración de 50 μ M (concentración de stock) y se adiciona a placas de agar NGM previamente sembradas con bacteria OP50, a una concentración final de 1,25 μ M.

Una vez se han secado las placas, se depositan 10 hermafroditas en estadio L4 de cada cepa en una placa con TMRE y se mantienen en oscuridad durante 16 h a 20°C. Tras ese tiempo, los gusanos se transfieren a placas NGM frescas sembradas con OP50 y sin el agente TMRE durante 1 h adicional para lavar el exceso de fluoróforo. Finalmente, los gusanos se colocan en portaobjetos preparados para la observación (sobre una gota de agarosa al 2% con 0,5 mM de levamisole) y se examinan utilizando la longitud de onda de emisión y excitación de la rodamina en el microscopio Leica DMRB equipado con contraste de interferencia diferencial (DIC) y fluorescencia óptica. Las imágenes se capturan con una cámara Deltapix CCD. Todas las imágenes son capturadas a la misma magnitud (10x) y con los mismos ajustes. Para cuantificar la

fluorescencia del gusano completo, las imágenes se transforman a escala de grises y se analizan con ImageJ. Se representa la media \pm SEM y se estudia la significación aplicando el estadístico T-test con el software GraphPad Prism.

Para la tinción con MitoTracker Red se sigue el mismo protocolo, usando una concentración final de 5 μ M de este fluoróforo en las placas NGM sembradas con bacteria OP50.

2.14. Medidas de la ratio AMP/ATP en *C. elegans* utilizando HPLC

La medida de la ratio AMP/ATP se realiza siguiendo el protocolo descrito por Stocchi y colaboradores en 1985 y Apfeld y colaboradores en 2004 (Stocchi et al. 1985; Apfeld et al. 2004). Brevemente, se lavan 100 gusanos en estadio L4 con medio M9 1x y se dejan en un volumen de 70 μ l de este mismo medio. Se añaden 140 μ l de ácido perclórico al 8% previamente enfriado y se sonicán los gusanos en frío con 5-10 pulsos intermitentes (amplitud 16) de 30 segundos de duración cada uno. Se dejan reposar en hielo unos minutos y se añaden 90 μ l de KHCO_3 a 2,5 M (previamente enfriado) para neutralizar el ácido perclórico y, de nuevo, se mantiene la mezcla en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifuga a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra y se inyecta en el HPLC. Las condiciones cromatográficas están especificadas en la tabla M6. El flujo se mantiene a 1 ml/min y la columna utilizada en este análisis es Synergi fusion 5 u. Se utilizaron también patrones comerciales de ATP y AMP para establecer los tiempos de retención de cada nucleótido. Se aplica el estadístico T-test para conocer la significación del ensayo respecto a la cepa salvaje utilizando GraphPad Prism 5 y se representa la media \pm SEM.

Tabla M6. Condiciones de separación cromatográfica para detectar ATP y AMP.

Tiempo	% Tampón A (0,1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6)	% Tampón B (Tampón A + 10% de CH ₃ OH)
0 minutos	100	0
9 minutos	75	25
15 minutos	10	90
17,5 minutos	0	100
20 minutos	0	100
26 minutos	100	0
28 minutos	100	0
40 minutos	100	0

2.15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA

La ratio mtDNA/nDNA se determina mediante reacciones de PCR cuantitativa. Los cebadores utilizados para amplificar los genes *ama-1* (nuclear) y *ctb-1* (mitocondrial) se muestran en la Tabla M3. De cada cepa se seleccionan 4 nematodos de una población sincronizada en estadio L4 y se lisan en el tampón de lisis estándar para PCR que contiene proteinasa K durante 1 hora a 65°C. La PCR cuantitativa a partir de 2 µl de lisado de gusanos se realiza utilizando FastStart Universal SYBR Green Master PCR Mix (Roche). Los datos se normalizan respecto al gen nuclear *ama-1* y respecto a la cepa salvaje N2. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

2.16. Transferencia Western y cuantificación de las subunidades de los complejos OXPHOS

Por cada cepa, se cogen 100 hermafroditas adultos jóvenes sincronizados y se hierven durante 10 minutos en tampón de carga 4x (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 10% glicerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0,002% azul de bromofenol). Las proteínas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y se transfieren a membranas de PVDF. Se utilizan anticuerpos humanos puesto que han demostrado reconocer las proteínas homólogas en *C. elegans* debido a su gran similitud. Los anticuerpos utilizados para detectar las diferentes proteínas son los siguientes: anti-

NDUFS3 (1:1000), anti-MT-CO1 (1:1000) y anti-ATP sintasa (1:500) para analizar la expresión de las subunidades de los complejos OXPHOS NUO-2 (complejo I, codificada en el núcleo), CTC-1/COX-1 (complejo IV, codificada por el genoma mitocondrial) y ATP-2 (complejo V, codificada por el genoma nuclear), respectivamente. La actina se detecta gracias al anticuerpo ab8227 (1:2000) y se utiliza para normalizar los niveles de las subunidades. Se representa la media \pm SEM. La significación respecto a los niveles de expresión de las subunidades de la cepa salvaje se calcula con GraphPad Prism 5. Se considera significativamente diferencial su expresión a partir de un p-valor inferior a 0,05.

2.17. Cuantificación de los niveles de mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real

Los niveles de mRNA de diversos genes se cuantifican mediante PCR cuantitativa. Se utiliza RNA total de cada cepa como material de partida. Los cebadores utilizados para amplificar los mRNAs se diseñan de manera que hibriden en exones diferentes y la región amplificada no exceda de los 200 pb, así, el DNA contaminante que pueda quedar en la muestra no puede amplificarse y confundir los resultados. Los oligos usados para amplificar los diversos genes se encuentran descritos en la tabla M3. Para la PCR cuantitativa a partir de RNA total se utiliza FastStart Universal SYBR Green Master PCR Mix (Roche). Un ejemplo de la reacción en un pocillo de la placa de 48 pocillos está especificado en la tabla M7.

Tabla M7. Ejemplo de una mezcla de reactivos y muestra para amplificar mRNA por PCR cuantitativa a tiempo real.

Compuesto	Volumen (en μ l) para una reacción de 20 μ l	Concentración final
2X SYBR Green PCR Master Mix	10	1X
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/mL)	0,1	0,25 U/mL
RNase Inhibitor (20 U/mL)	0,1	0,1U/mL
Oligo F 10mM	0,2	100 nM
Oligo R 10mM	0,2	100 nM
Muestra	5	0,015 mg
H ₂ O	4,4	
Total	20	

Los datos se normalizan respecto al gen nuclear *act-1* y respecto a la cepa salvaje N2 y se representa la media \pm SEM. Se aplica el estadístico T-test para conocer la significación del ensayo respecto a la cepa salvaje utilizando GraphPad Prism 5. Se realizó un mínimo de tres ensayos independientes para cada cepa, además de que cada ensayo se hizo por triplicado.

2.18. Ensayos de fertilidad y cuantificación de la longitud del ciclo reproductivo

Estos ensayos se realizan esencialmente como están descritos en Wong et al, 1995 (Wong et al. 1995).

Para el ensayo de fertilidad, entre 20 y 40 hermafroditas en estadio L4 se transfieren individualmente a una nueva placa sembrada con bacteria, de manera que quede un único hermafrodita en cada placa. Los gusanos se transfieren diariamente, hasta que terminan de poner huevos, a nuevas placas frescas para evitar que las placas queden demasiado saturadas con los descendientes. La descendencia se contabiliza un día después de haber transferido a los hermafroditas. Durante todo el proceso los gusanos se mantienen a la temperatura deseada, en este caso 20 ó 25°C.

Para contabilizar la longitud del ciclo reproductivo, se escogen 5 hermafroditas adultos jóvenes y se transfieren manualmente a una nueva placa (todos juntos) durante 1 hora para que puedan poner huevos. Posteriormente, se eliminan los 5 hermafroditas y se establece ese momento como $t=0$. Las placas se incuban a la temperatura experimental (20 ó 25°C). Tras dos días, los gusanos, que se encuentran sincronizados en estadio larvario L3-L4, se transfieren individualmente a placas nuevas y se monitoriza el tiempo que tardan en poner el primer huevo de toda su descendencia con respecto al $t=0$.

Se representa la media \pm SEM. La significación respecto a la cepa salvaje se calcula utilizando el test estadístico T-test en GraphPad Prism 5.

2.19. Ensayo de silenciamiento por alimentación con RNA de interferencia (RNAi)

En organismos eucariotas no vegetales, el silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi) fue observado por primera vez por Guo y Kemphues en 1995 y posteriormente descrito con mayor detalle por Fire y colaboradores en 1998 en el organismo *C. elegans* (Guo and Kemphues 1995;

Fire et al. 1998). Se inicia con una secuencia de RNA de doble cadena (dsRNA) que contiene una perfecta homología con el gen endógeno que sufrirá el silenciamiento y que promueve la degradación específica de un mensajero de RNA de secuencia complementaria.

El RNAi es una herramienta efectiva para el estudio de las funciones génicas en diversos organismos y, en *C. elegans*, es comúnmente aplicado para estudiar la función de sus genes (sirvan como ejemplo (Lee et al. 2002; Ni and Lee 2010)). Existen cuatro métodos para proporcionar RNA de doble cadena (dsRNA) en *C. elegans*: (1) microinyección de dsRNA en cualquier región del animal (Fire et al. 1998), (2) alimentación del nematodo con bacteria capaz de producir dsRNA (Timmons et al. 2001), (3) inmersión (soaking) en dsRNA (Tabara et al. 1998) y (4) producción *in vivo* de dsRNA a partir de promotores transgénicos (Tavernarakis et al. 2000). El sistema de RNAi por alimentación es prácticamente exclusivo de *C. elegans*, ya que para el resto de organismos, el dsRNA debe proporcionarse por microinyección, electroporación o transfección. Debido a su facilidad, economía y exclusividad en *C. elegans*, resulta especialmente relevante este sistema y, además, es el utilizado en este trabajo. La secuencia de DNA de interés es clonada en un vector de expresión (pL4440), delimitada en ambos extremos por el promotor del bacteriófago T7. La cepa utilizada para expresar este vector es HT115(DE3), cuyo fondo genético es RNAasall⁻ que permite la acumulación de RNAs de pequeño tamaño, y que expresa la polimerasas del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG, para poder expresar el fragmento de DNA clonado (figura M1).

En este trabajo, los clones bacterianos de RNAi utilizados para alimentar *C. elegans* han sido cedidos por Simon Tuck (Universidad de Umeå, Suecia) y están descritos en el apartado M2. Como controles se usan *let-92* (RNAi), como control positivo, y el plásmido vacío L4440 (sin ningún inserto) transformado en la cepa HT115, como control negativo.

Para el silenciamiento génico por RNAi, los gusanos son sincronizados con el tratamiento de ácido hipoclorito y, una vez se han desarrollado los animales a estadio L4, se transfieren a las placas NGM que contienen las bacterias que expresan el dsRNA. Los ensayos de longevidad se realizan directamente con esos gusanos L4 (explicado en el apartado 2.21), mientras que para el resto de ensayos de RNAi, se realizan prestando atención a la descendencia de los gusanos L4 silenciados. Para analizar esta descendencia, los adultos de un día silenciados se transfieren a una nueva placa que contiene bacteria que expresa dsRNA y, una vez terminan de poner huevos, se

eliminan de la placa para no confundirlos con los descendientes. Los nematodos silenciados se observan día tras día y se toman imágenes de las placas con una cámara Nikon Digital Sight DS-L1.

2.20. Disección de las gónadas y tinción con DAPI

Adultos de un día se seleccionan individualmente y se transfieren a una nueva placa que carece de bacteria. Se pipetea 5 μ l de PBS + 0,25 mM de levamisole (un agente anestésico) sobre un portaobjetos de microscopio. Tras unos minutos, en los que los gusanos se han dispersado por la placa sin bacteria, los gusanos se transfieren a la gota de PBS (0,25 mM de levamisole). Utilizando un escalpelo, los nematodos se cortan aproximadamente por la mitad del cuerpo, lo que resulta en la extrusión de las gónadas. Las gónadas diseccionadas se fijan añadiendo 5 μ l de paraformaldehído al 4% durante 1 hora en una cámara humidificada. Tras la incubación, la mayoría de la solución se seca y las gónadas se incuban con 5 μ l de dimetilformamida (previamente enfriada a -20°C) durante 5 minutos. Se seca la mayor cantidad de solución posible y se lavan las gónadas con PBS al 1x + 0,1% de Tween. Finalmente, se añaden 5 μ l de la solución para prolongar la fluorescencia “Prolong Gold” con DAPI a una concentración de 1 μ g/ml. Las imágenes se obtienen con un microscopio LEICA DM 6000B a una magnificación 100x con DIC y con fluorescencia DAPI.

2.21. Ensayos de longevidad

Los ensayos de longevidad se realizaron a 25°C en placas de agar NGM conteniendo o no 0,05 mM de FUDR para evitar el crecimiento de la descendencia. Para cada cepa, se seleccionan aproximadamente 100 larvas en estadio L4, previamente sincronizadas, y se colocan 25 gusanos en cada placa FUDR(+) o FUDR(-) sembradas con OP50 o HT115 (que expresa el dsRNA correspondiente para producir el silenciamiento por RNAi). Este es considerado el inicio del experimento y, por tanto, el día 0. Cuando no se utiliza FUDR, los gusanos se transfieren todos los días hasta que dejan de poner huevos, momento a partir del cual la transferencia de los gusanos se realiza cada 2 ó 3 días. Los gusanos son monitorizados y contados cada día hasta su muerte. Los gusanos fueron contados como muertos cuando dejaron de responder a estímulos mecánicos. Ciertos gusanos de la población fueron censurados, es decir, excluidos del ensayo, si se secaban en

el borde de la placa o sus huevos eclosionaban internamente. Las curvas de supervivencia se representaron utilizando el software GraphPad Prism 5 y se aplicaron los test estadísticos Log-rank Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon. El test Gehan-Breslow-Wilcoxon es más sensible a las diferencias tempranas entre las supervivencias de ambos grupos, por el contrario, el test Log-rank Mantel-Cox es más sensible a las diferencias en la supervivencia que ocurren a tiempos más tardíos.

Resultados

*“Las ciencias tienen raíces amargas,
pero muy dulces frutos”
Aristóteles*

1. Identificación de los genes y proteínas homólogos a los bacterianos *mnmA*, *mnmE* y *mnmG* en *C. elegans*

En este apartado inicial del trabajo, el objetivo que se persigue es identificar y caracterizar los genes homólogos a *mnmA*, *mnmE* y *mnmG* de *E. coli* y *MTU1*, *GTPBP3* y *MTO1* humanos en *C. elegans*. Debido a que *C. elegans* fue el primer organismo pluricelular en tener su genoma completo secuenciado (Consortium 1998) y que ha sido depositado en diferentes bases de datos, hemos podido utilizar el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) para identificar las proteínas homólogas. Las secuencia de las proteínas bacterianas MnmA, MnmE y MnmG se introdujo como “query” en la interfaz de búsqueda y se obtuvo que estas proteínas eran muy similares a las codificadas por los transcritos B0035.16, F39B2.7 y F52H3.2 de *C. elegans*, respectivamente (anexo III). Esta información coincide con alineamientos de secuencias proteicas previamente publicados, en los que también se identificaban las homólogas humanas de MnmE y MnmG, denominadas GTPBP3 y MTO1, por comparación con *E. coli*, *S. cerevisiae* y *M. musculus* entre otros (Li and Guan 2002; Li et al. 2002).

1.1. Gen *mttu-1* (B0035.16) y proteína MTTU-1

Según la información contenida en la base de datos de *C. elegans* (www.wormbase.org), la proteína predicha como homóloga a MnmA (*E. coli*) y MTU1 (*S. cerevisiae* y *H. sapiens*) está codificada por el gen B0035.16. En este trabajo, este gen ha sido denominado como *mttu-1* (*nuclear encoded mitochondrial tRNA 2-thiouridylase-1*) y su nueva denominación depositada en esta misma base de datos de *C. elegans*. El gen *mttu-1* mapea en el cromosoma IV, dentro del operón CEOP4428, que también contiene el gen B0035.15 que codifica para el ortólogo de la proteína humana NDUFAF4 (factor de ensamblaje 4 del complejo I de la cadena OXPHOS) (Figura

R1). Según la base de datos “wormbase”, *mttu-1* tiene 1740 pb de longitud que están organizadas en siete exones y seis intrones (figura R1, tabla R1).

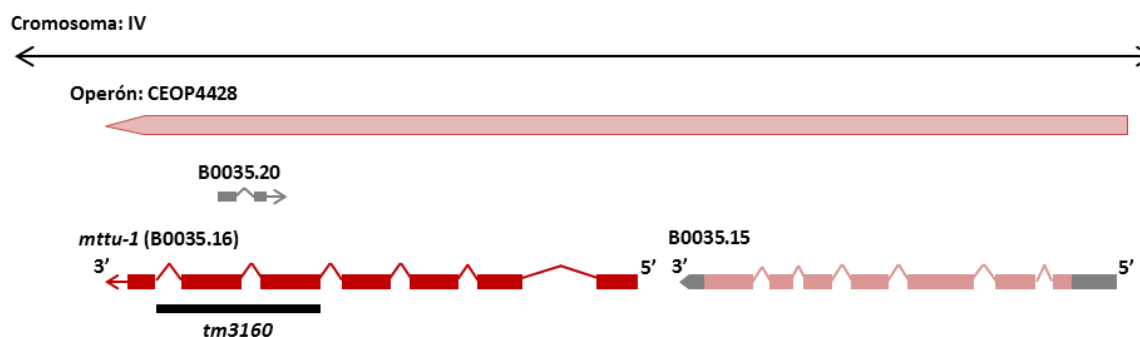


Figura R1. Esquema del operón CEOP4428 y del gen *mttu-1*, en el que se muestran los intrones (líneas entre los exones que representan las regiones eliminadas durante el procesamiento del mRNA) y exones (rectángulos que son las regiones del mRNA que se mantienen durante el ajuste (splicing) y se transcriben en una secuencia de aminoácidos). Se subraya con una línea negra la región eliminada en el mutante knock-out *tm3160*. En el operón CEOP4428, además de *mttu-1*, hay otro gen denominado B0035.15 que codifica para un ortólogo del factor de ensamblaje 4 del complejo NADH deshidrogenasa (CI) denominado NDUFAF4 que localiza en mitocondria. B0035.20 es un transcrito antisentido de función desconocida.

mttu-1 codifica para la proteína MTTU-1, de 375 aminoácidos de longitud y aproximadamente 42,8 kDa (Tabla R1). Esta longitud es muy similar a la de sus proteínas homólogas MnmA (*E. coli*) y MTU1 (*H. sapiens*), cuyas longitudes son de 368 y 421 aminoácidos, respectivamente. Además, se ha estudiado el porcentaje de identidad y similitud existente entre MTTU-1 y las proteínas homólogas de los diversos organismos utilizando la herramienta BLAST (NCBI). MTTU-1 guarda un 40% de identidad con MnmA (*E. coli*) y MTU1 (*H. sapiens*) y un 30% con MTU1 (*S. cerevisiae*). El porcentaje de similitud existente entre MTTU-1 y MnmA (*E. coli*), MTU1 (*S. cerevisiae*) y MTU1 (*H. sapiens*) es del 58, 45 y 54% respectivamente (tabla R2, anexo III).

1.2. Gen *mtcu-1* (F39B2.7) y proteína MTCU-1

El BLAST realizado con la secuencia de MnME (*E. coli*) como “query” indica que la correspondiente proteína homóloga en *C. elegans* está codificada por el gen F39B2.7, que en este trabajo hemos denominado *mtcu-1* (nuclear encoded mitochondrial tRNA carboxymethyl-amino-

methyl modification of uridine residues-1), tal como se refleja en la base de datos “wormbase”. Este gen está localizado en el cromosoma I, en el operón CEOP1760. Este operón contiene también otros 3 genes: F39B2.3, que codifica para una NADH quinona oxidoreductasa; F39B2.5, que codifica para la proteína ortóloga de las humanas SOCS7 y SOCS6 que regulan negativamente la vía de señalización mediada por citoquinas; y *sur-2*, que codifica para una proteína ortóloga a la humana MED23, una isoforma de la subunidad 23 de la RNA pol II implicada en la co-activación o mediación de la transcripción. *mtcu-1* presenta seis exones y cinco intrones en sus 4319 pb y codifica para una proteína denominada MTCU-1 formada por 439 aminoácidos (aprox. 48,7 kDa) (figura R2, tabla R1).

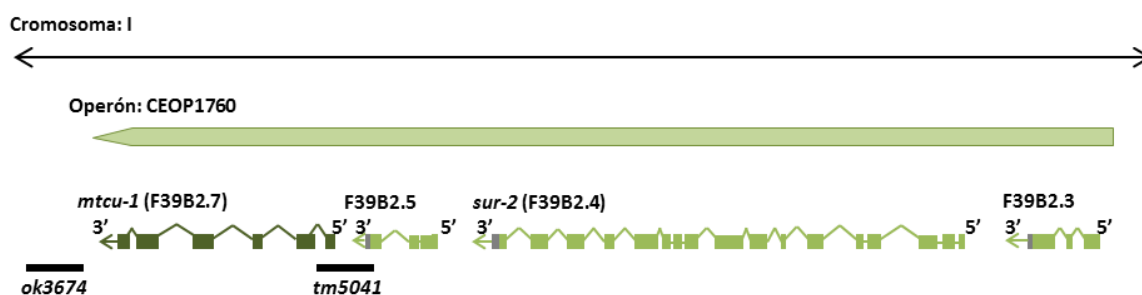


Figura R2. Esquema del operón CEOP1760 y del gen *mtcu-1*, en el que se muestran los intrones (líneas entre los exones que representan las regiones eliminadas durante el procesamiento del mRNA) y exones (rectángulos que son las regiones del mRNA que se mantienen durante el ajuste y se transcriben a una secuencia de aminoácidos). Se subraya con una línea negra la región eliminada en los mutantes knock-out *tm5041* y *ok3674*. En este operón hay otros tres genes: F39B2.5 (codifica para una homóloga de SOCS6 y SOCS7, supresoras de la vía de señalización por citoquinas), *sur-2* (codifica para una homóloga de MED23, una proteína implicada en activación de la transcripción) y F39B2.3 (codifica para una NADH ubiquinona reductasa).

Esta longitud también es parecida a la de la proteína bacteriana MnmE (454 aminoácidos) y a la de la humana GTPBP3 (524 aminoácidos). La identidad de secuencia de MTCU-1 con sus homólogas respectivas en *E. coli*, *S. cerevisiae* y humanos es del 28, 32 y 33% y la similitud es del 48, 51 y 47%, respectivamente (tabla R2, anexo III).

1.3. Gen *mtcu-2* (F52H3.2) y proteína MTCU-2

Al igual que en los casos anteriores, el alineamiento de la secuencia de MnmA (*E. coli*) utilizando BLAST (NCBI) identificó una homóloga en *C. elegans*, codificada por el gen F52H3.2, llamado *mtcu-2* (*nuclear encoded mitochondrial tRNA carboxymethyl-amino-methyl modification of uridine residues-2*) en adelante, como también consta en la base de datos de *C. elegans*. El gen *mtcu-2* mapea en el cromosoma II en el interior del operón CEOP2696, el cual también contiene el gen *let-268*, que codifica para una proteína que participa en el procesamiento, la secreción y la estabilidad del colágeno tipo IV. Según la “wormbase”, *mtcu-2* tiene 2456 pb de longitud, organizadas en seis exones y cinco intrones, y codifica para la proteína MTCU-2 de 638 aminoácidos de longitud y aproximadamente 71.7 kDa (figura R3, tabla R1).

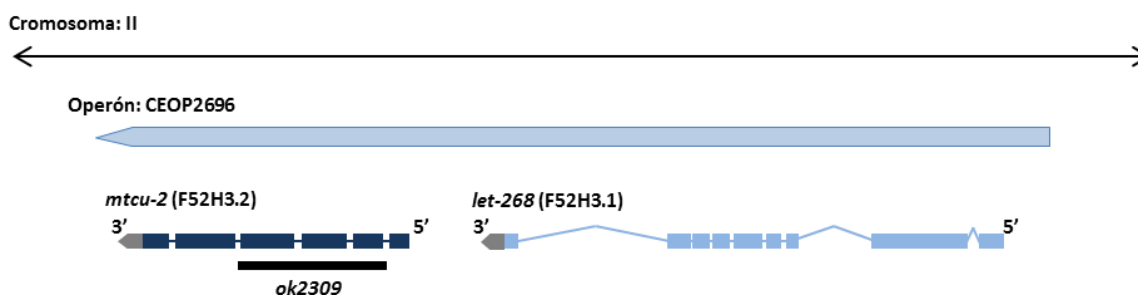


Figura R3. Esquema del operón CEOP2696 y del gen *mtcu-2*, en el que se muestran los intrones (líneas entre los exones que representan las regiones eliminadas durante el procesamiento del mRNA) y exones (rectángulos que son las regiones del mRNA que se mantienen durante el ajuste y se transcriben a una secuencia de aminoácidos). Se subraya con una línea negra la región eliminada en el mutante knock-out *ok2309*. En el operón CEOP2696, además de *mtcu-2*, existe otro gen denominado *let-268*, que codifica para una proteína implicada en la secreción y estabilidad del colágeno tipo IV.

De la misma manera que MTTU-1 y MTCU-1, MTCU-2 también es muy similar en número de aminoácidos a sus homólogas MnmG de *E. coli* (629 aminoácidos) y MTO1 de *H. sapiens* (732 aminoácidos). Una elevada homología de secuencia también se conserva para MTCU-2, ya que presenta una identidad de secuencia del 41, 42 y 48% y una similitud del 61, 62 y 63% con MnmG (*E. coli*), MTO1 (*S. cerevisiae*) y MTO1 (*H. sapiens*) (tabla R2, anexo III).

Tabla R1. Información sobre los genes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y sobre las proteínas que codifican, MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2.

Nombre en <i>C. elegans</i>	Gen			Proteína	
	Longitud	Operón	Cromosoma	Longitud	Mw
MTTU-1	1740 pb	CEOP4428	IV	375 aa	42,8 kDa
MTCU-1	4319 pb	CEOP1760	I	439 aa	48,7 kDa
MTCU-2	2456 pb	CEOP2696	II	638 aa	71,7 kDa

Tabla R2. Porcentaje de identidad de secuencia y similitud de las proteínas de *C. elegans* con sus homólogas en *E. coli*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* calculado a partir del alineamiento de secuencia realizado utilizando el programa BLAST (NCBI).

Porcentaje de identidad de secuencia y similitud			
<i>C. elegans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
	MnmA	MTU1/SLM3	MTU1
MTTU-1	40% (58%)	30% (45%)	40% (54%)
	MnmE	MSS1	GTPBP-3
MTCU-1	28% (48%)	32% (51%)	33% (47%)
	MnmG	MTO1	MTO1
MTCU-2	41% (61%)	42% (62%)	48% (63%)

El porcentaje de identidad se enciende como el número de coincidencias cada 100 posiciones de dos secuencias alineadas. La similitud tiene en cuenta el parecido fisicoquímico de los diferentes aminoácidos y se encuentra indicada entre paréntesis.

2. Localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2

En el apartado anterior se ha descrito la elevada similitud de secuencia que presentan MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 con sus homólogas humanas (MTU1, GTPBP3 y MTO1) y de levadura (MTU1, MSS1 y MTO1), respectivamente. Estas proteínas homólogas eucariotas modifican tRNAs mitocondriales y, por tanto, se localizan en mitocondria (Umeda et al. 2005; Wang et al. 2010; Suzuki and Suzuki 2014). Para estudiar la posible localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 se utilizaron diversas estrategias, entre ellas el software MitoProtII (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) que calcula la probabilidad de que una proteína se localice en mitocondria en función de la composición de aminoácidos de su extremo N-terminal (Claros and Vincens 1996). MitoProtII predijo, con una elevada probabilidad, que MTCU-1 (99,25%) y MTCU-2 (94.59%) se localizan en mitocondria y que la región que actúa como péptido señal tiene una longitud de 41 y 13 aminoácidos respectivamente (anexo IV). Sin embargo, la probabilidad con la que MitoProtII predijo que MTTU-1 localiza en mitocondria es baja, de un 20,20% (anexo IV).

Por otra parte, se realizó un alineamiento de secuencia de los extremos N-terminal de las proteínas de *C. elegans* con sus homólogas en *E. coli*, *T. marítima*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* utilizando el software on-line Clustal Omega del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El alineamiento de la secuencia N-terminal de estas proteínas reveló una clara secuencia líder en MTU1, MSS1 y MTO1 de *S. cerevisiae* y en las proteínas GTPBP3 y MTO1 humanas (figura R4, anexo V) pero ningún péptido líder evidente en el caso de las proteínas de *C. elegans*, ya que se inician prácticamente en la región conservada.

Resultados



Figura R4. Alineamiento múltiple de secuencia de los primeros aminoácidos de las homólogas en *E. coli*, *T. maritima*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*. Los símbolos asterisco (*), dos puntos (:), y punto (.) indican que las posiciones que marcan tienen un residuo totalmente conservado, residuos con propiedades muy similares o menos similares, respectivamente.

Para abordar experimentalmente el estudio de la localización subcelular y tisular de las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 tratamos inicialmente de fusionarlas a GFP, encargando la microinyección del operón de MTTU-1 fusionado a GFP en su extremo 3' al "*C. elegans* facility" del IDIBELL (Bellvitge). Desafortunadamente, las construcciones resultaron tóxicas y la expresión de las proteínas transgénicas en los pocos gusanos microinyectados supervivientes era inferior al límite de detección y no pudo diferenciarse de la autofluorescencia propia del gusano en la observación con un microscopio óptico de fluorescencia. Por ello, a continuación, utilizamos una estrategia alternativa para determinar la localización subcelular de las citadas proteínas consistente en expresarlas en levadura de manera heteróloga. Con esta finalidad, se clonaron los correspondientes cDNAs (careciendo del codón de parada) de cada uno de los genes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y se fusionaron en su extremo 3' a GFP en el plásmido pGREG600. En este plásmido la expresión de la construcción se encuentra controlada por el promotor de *S. cerevisiae* GAL1. Tras transformar la cepa SC012 de levadura con los plásmidos recombinantes (seleccionados gracias al gen URA3 del plásmido pGREG600), se procedió a su tinción con el marcador mitocondrial MitoTrackerRed. La localización subcelular de MTTU-1:GFP, MTCU-1:GFP y MTCU-2:GFP se estudió mediante microscopía confocal. En la figura R5 se observa que todas las proteínas de *C. elegans* localizan en mitocondrias de levaduras, ya que el marcador GFP y el marcador MitoTrackerRed mayoritariamente co-localizaron.

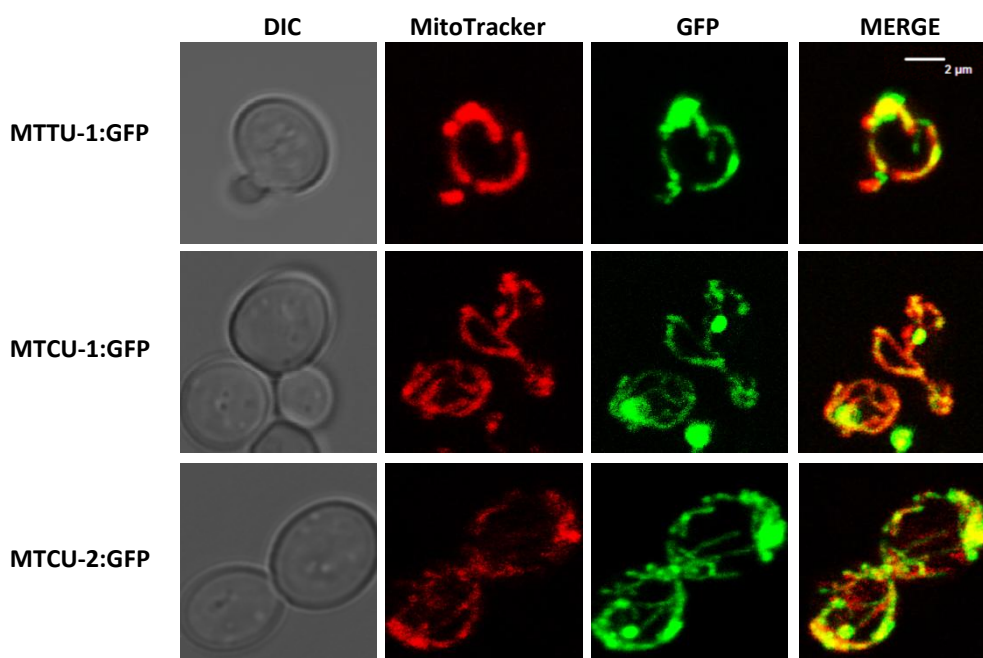


Figura R5. Localización mitocondrial de las proteínas de *C. elegans* MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.

Esto confirma que las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 de *C. elegans* son capaces de localizar en mitocondria, y que tienen la capacidad de alcanzar el compartimento mitocondrial de levadura sin necesidad de llevar el péptido líder característico de *S. cerevisiae*. Este resultado también sugiere que las secuencias señaladoras deben encontrarse inmersas en la región conservada de estas proteínas (regiones incluso presentes en las homólogas bacterianas).

3. Descripción de las cepas mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y mutantes dobles *mtcu-1;mtcu-2* y *mtcu-2;mttu-1*

Con la finalidad de explorar la función molecular y celular de los genes de *C. elegans* *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, utilizamos mutantes knock-out para cada uno de estos genes obtenidos del “National Bioresource Project” (Japón) (<http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/>) y del “Caenorhabditis Genetics Center” (CGC) (<http://www.cbs.umn.edu/research/resources/cgc>).

3.1. Mutante *mttu-1*

El mutante simple *mttu-1(tm3160)* tiene una deleción de 592 pb que implica la pérdida de los exones 5 y 6, del intrón 5 y de parte del intrón 6 (figura R1) y, por tanto, impide la expresión de una proteína completa, lo que presumiblemente resulta en la pérdida de la función que realiza MTU-1 dado que, además de otros residuos conservados, la región suprimida contiene la cisteína 205 (C119 en su homóloga de *E. coli*) descrita como un residuo catalítico imprescindible para llevar a cabo la función de modificación del tRNA (Numata et al. 2006).

La presencia de la mutación en el gen *mttu-1* puede comprobarse mediante PCR utilizando los oligos ceMTU1-L y ceMTU1-R (tabla M3) que producen un amplificado de 1,2 kb en la cepa salvaje y de 650 pb en el simple mutante *mttu-1* (figura R6).

3.2. Mutante *mtcu-1*

Al inicio de este trabajo, únicamente existía un mutante “knock-out” para este gen en las colecciones de *C. elegans*, el mutante *mtcu-1(ok3674)*. Sin embargo, en nuestro laboratorio comprobamos, mediante PCR y secuenciación de una región de DNA genómico de 1.1 kb que comprendía 600 pb aguas arriba del codón de parada de *mtcu-1* y 500 pb aguas abajo de este mismo codón de parada, que la región suprimida en este mutante realmente no afecta al gen *mtcu-1*. La región suprimida (aproximadamente 300 pb) se localiza entre 200 y 500 pb aguas abajo del codón de parada de *mtcu-1*. Por este motivo, solicitamos al consorcio CGC la construcción de un mutante knock-out para el gen *mtcu-1*, que denominaron *mtcu-1(tm5041)*. El mutante *mtcu-1(tm5041)* presenta una alteración genómica compleja que afecta al gen *mtcu-1* y también al gen F39B2.5, localizado en el mismo operón (CEOP1760), ya que una inserción de 13 nucleótidos de timina ha sustituido la región suprimida de 597 pb. Esta deleción elimina parte de la región 5'-UTR (untranslated region) y del exón 1 (que contiene residuos conservados, posiblemente implicados en la unión del tetrahidrofolato -THF-, uno de los sustratos de la reacción de modificación, ver figura R2). La mutación, presumiblemente, impide la expresión de la proteína MTCU-1 al suprimir su codón de inicio. Sin embargo, también elimina 40 nucleótidos (13 aminoácidos) de la región 3' del gen F39B2.5 que codifica para una proteína ortóloga de las proteínas humanas SOCS7 y SOCS6, que actúan como reguladores negativos de la señalización por citoquinas y de la actividad proteínica

quinasa. A pesar de estas circunstancias, usamos el mutante *mtcu-1(tm5041)* en algunos de los experimentos de este trabajo debido a la ausencia de otros mutantes “knock-out” del gen *mtcu-1* durante gran parte del mismo.

La presencia de la mutación puede comprobarse mediante PCR utilizando los oligos F39-870F y F39+351R (tabla M3) que amplifican una región de 1.3 kb en la cepa salvaje y una región de 650 pb en el simple mutante *mttu-1* (figura R6).

Recientemente, hemos incluido el mutante VC40256, portador de una mutación sin sentido en el aminoácido R36 de MTCU-1 y que, presumiblemente, produce una proteína MTCU-1 truncada y, por tanto, no funcional, ya que el extremo C-terminal contiene una región muy conservada que se ha visto que resulta esencial para la función modificadora de la homóloga bacteriana MnmE (datos de nuestro laboratorio no publicados). Actualmente, estamos realizando algunos experimentos con este mutante para verificar que ciertos fenotipos encontrados en el mutante *mtcu-1(tm5041)* son debidos a la inactivación del gen *mtcu-1* y no del gen F39B2.5.

3.3. Mutante *mtcu-2*

El mutante simple *mtcu-2(ok2309)* tiene una delección de 1340 pb que elimina los intrones y exones comprendidos entre el exón 2 y 5 (figura R3), y que puede ser comprobada por PCR utilizando los oligos ceMTO1-L y ceMTO1-R (tabla M3). Estos oligos amplifican una región de 750 pb en la cepa salvaje y de 900 pb en el mutante *mtcu-2* (figura R6). En este caso, la secuencia eliminada contiene residuos esenciales para la unión de FAD (uno de los cofactores de su homóloga bacteriana MnmG), y de tRNA, además de la cisteína catalítica 287 (C277 en su homóloga de *E. coli*) cuya mutación resulta en la pérdida de la función de modificación de tRNA (Osawa et al. 2009).

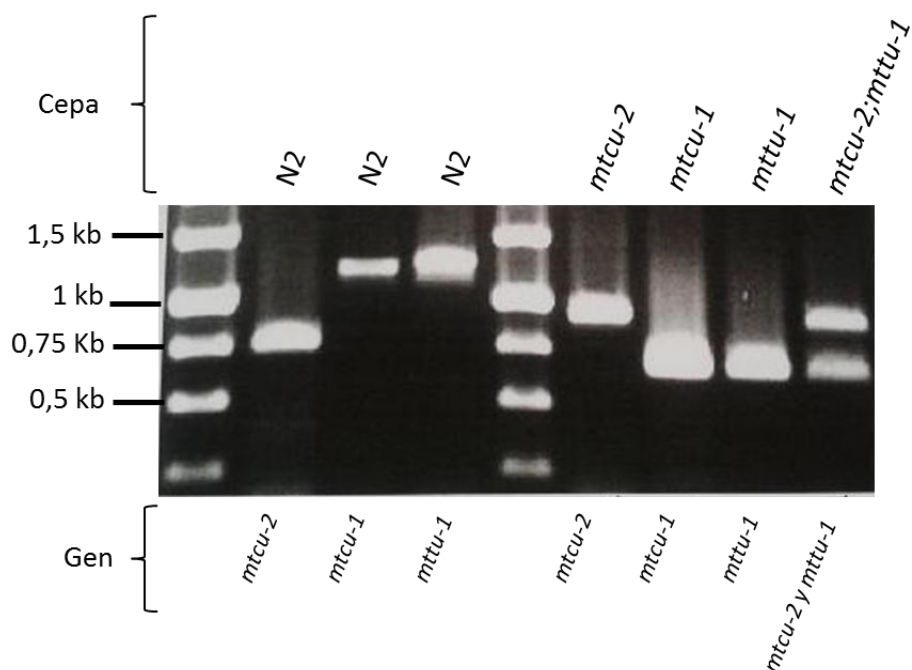


Figura R6. Comprobación del genotipo de los mutantes de *C. elegans* por PCR. La cepa analizada se indica en la parte superior y el gen en la parte inferior. Los cebadores utilizados en la PCR se describen en la tabla M3 en Materiales y Métodos.

Tal como se ha descrito, en los tres mutantes simples la eliminación de las respectivas secuencias génicas impide la correcta expresión de las proteínas completas y esto repercute en la función descrita actualmente para las mismas, la modificación de los tRNAs, ya que los residuos conservados eliminados en cada caso han sido identificados como elementos clave para la función modificadora, al menos en las proteínas homólogas en *E. coli*.

Todos los mutantes simples nombrados en este estudio se retro-cruzaron con la cepa salvaje un número mínimo de 7 veces con la finalidad de uniformizar el fondo genético con la cepa control para que los resultados puedan ser comparativos.

3.4. Mutante *mtcu-1;mtcu-2*

En *E. coli*, los mutantes *mnmE* y *mnmG* presentan el mismo fenotipo a menudo, aunque se han reportado resultados contradictorios en relación a su crecimiento. Mientras algún grupo detectó un peor crecimiento de los mutantes *mnmG* en medio mínimo (Brégeon et al. 2001),

nuestro grupo no observó tal diferencia (Yim et al. 2006). En *S. cerevisiae* los efectos de la inactivación de MTO1 en algunos rasgos fenotípicos (como por ejemplo, el ajuste de los intrones del DNA mitocondrial y la traducción mitocondrial) han resultado ser más severos que los producidos por la inactivación de MSS1, el homólogo de *mnmE* (Wang et al. 2010). Estas observaciones en bacteria y levadura sugieren que ambas proteínas MnmE/MSS1 y MnmG/MTO1 podrían tener alguna función diferencial y alternativa a la modificación de los tRNAs. Notablemente, la inactivación de esas proteínas individualmente tiene un efecto menor en el crecimiento bacteriano o la respiración mitocondrial que la inactivación del gen bacteriano *mnmA* o su correspondiente gen en levadura (*MTU1*), respectivamente (Brégeon et al. 2001; Wang et al. 2010). Con la intención de estudiar si existía un efecto sinérgico entre las mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2* decidimos construir un doble mutante *mtcu-1;mtcu-2*, sabiendo que los resultados deberíamos tomarlos con precaución dado que la mutación *tm5041* afecta no sólo al gen *mtcu-1*, sino, también, al gen F39B2.5. El doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* se construyó por cruce de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* mediante procedimientos estándar (ver figura M5 de Materiales y métodos). Dado que la mutación *tm5041* afecta a los genes *mtcu-1* y F39B2.5, el denominado, en este trabajo, doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* es realmente un triple mutante *mtcu-2;mtcu-1;F39B2.5*.

3.5. Mutantes *mtcu-2;mttu-1* y *mtcu-1;mttu-1*

Por otra parte, también en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, se ha observado un efecto sinérgico al combinar mutaciones en *mnmA* y *mnmE* de *E. coli* (Armengod et al. 2014) y mutaciones en *MTU1* y *MTO1* o *MSS1* en levadura (Umeda et al. 2005; Wang et al. 2010). Por este motivo, en este trabajo, se construyeron los mutantes dobles *mtcu-2;mttu-1* y *mtcu-1;mttu-1*. En ambos casos, los dobles mutantes fueron estériles, por lo que la cepa no pudo mantenerse con ambos genes mutados en homocigosis. Para solventar este problema, el gen *mttu-1* fue balanceado con nT1g, un marcador GFP que se expresa en la faringe y que está ligado al alelo salvaje de este gen. Debido a que ambos mutantes dobles *mtcu-2;mttu-1* y *mtcu-1;mttu-1* presentaron el mismo fenotipo (esterilidad) y a que la mutación compleja en el mutante *mtcu-1* afecta al gen F39B2.5 además de al gen *mtcu-1*, decidimos construir únicamente el mutante *mtcu-2;mttu-1/nT1g*, en el cual el gen *mtcu-2* es homocigoto mutante y el gen *mttu-1* se encuentra en heterocigosis. En la descendencia de este

mutante balanceado se pueden distinguir dos poblaciones de gusanos genéticamente diferentes: los mismos gusanos balanceados *mtcu-2;mttu-1/nT1g*, que pueden identificarse y seleccionarse por la expresión de GFP, y los dobles mutantes *mtcu-2;mttu-1* que son estériles y pueden seleccionarse porque no exhiben fluorescencia GFP (figura R7). *nT1g* en homocigosis es letal (Edgley et al. 2006), por lo que ningún descendiente de los gusanos balanceados presentará este genotipo.

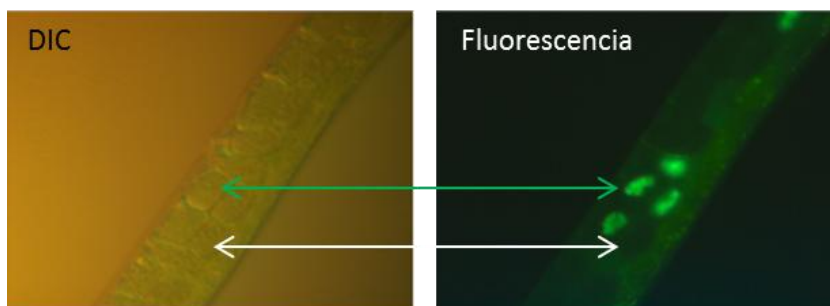


Figura R7. Matriz de un doble mutante *mtcu-2;mttu-1/nT1g* balanceado que contiene embriones mutantes *mtcu-2;mttu-1/nT1g* balanceados (fluorescencia GFP, flecha verde) y dobles mutantes *mtcu-2;mttu-1* (sin fluorescencia, flecha blanca). DIC: Microscopía de Contraste de Interferencia Diferencial.

4. Las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 modifican los tRNAs mitocondriales de *C. elegans*

Según la función modificadora de tRNAs mitocondriales que se ha demostrado realizan las homólogas de MTTU-1 en levadura y humanos (Umeda et al. 2005; Zeharia et al. 2009) y MTCU-1 y MTCU-2 en *S. cerevisiae* (Umeda et al. 2005), es razonable asumir que las proteínas de *C. elegans* estarían implicadas también en la modificación de los tRNAs mitocondriales de este nematodo, lo que podría tener consecuencias en el fenotipo de los organismos mutantes. Por tanto, la hipótesis que se desarrolla en este trabajo es que MTTU-1 es la enzima que añadiría un grupo tiol (s) a la posición 2 de la uridina de la posición de tambaleo en algunos tRNA mitocondriales, y que MTCU-1 y MTCU-2, conjuntamente, modificarían la posición 5 de la uridina 34 con un grupo carboximetilaminometil (cmnm) dado que en *A. suum* se ha mostrado que la modificación presente es cmnm⁵ (Sakurai et al. 2005) (figura R8).

Resultados

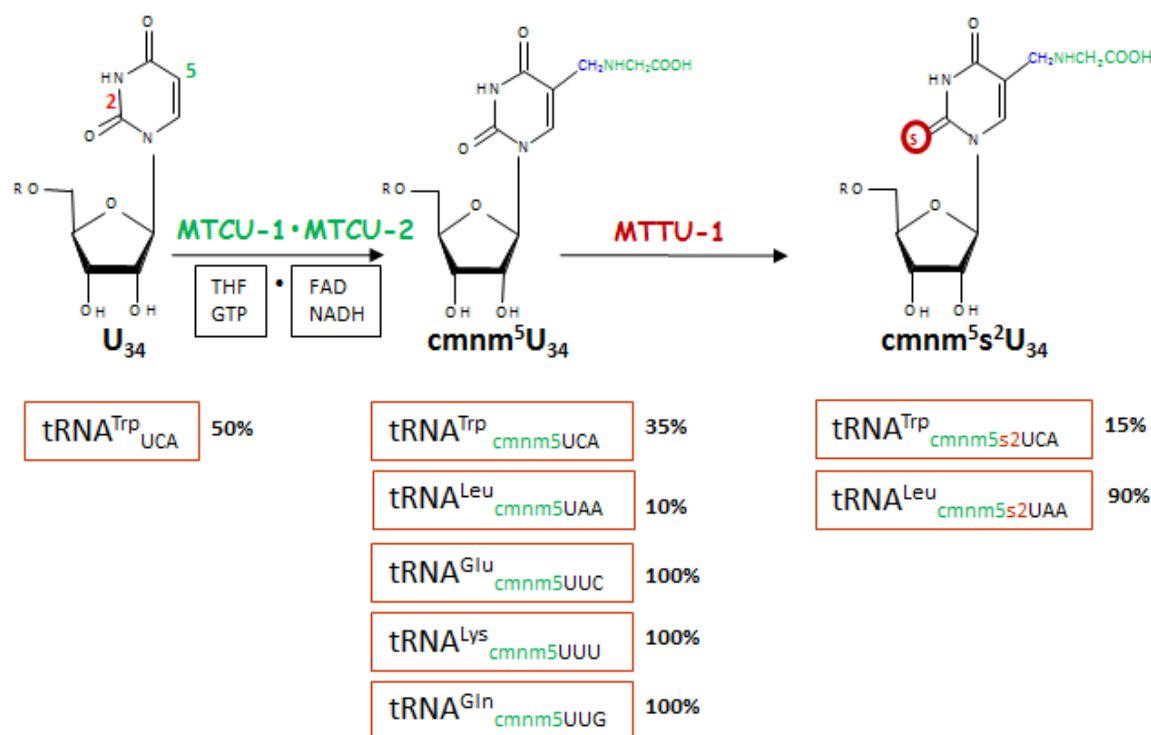


Figura R8. Hipótesis de la ruta de modificación de la uridina de tambaleo de los tRNAs mitocondriales de *C. elegans* inspirada por las referencias (Sakurai et al. 2005; Armengod et al. 2012). La posición de MTTU-1 en la vía de modificación es arbitraria, ya que, en nuestra hipótesis, proponemos que podría actuar tanto antes como después de las proteínas MTCU-1 y MTCU-2. Los porcentajes indican el grado de modificación de las diferentes especies de tRNAs mitocondriales.

El estudio de la modificación en la posición 5 en los tRNAs mitocondriales de la mayoría de organismos eucariotas con las técnicas disponibles hasta la fecha ha presentado diversos inconvenientes, principalmente debido a la baja abundancia de tRNAs mitocondriales respecto a sus homólogos citosólicos y, por ello, a su limitada disponibilidad a partir de muestras biológicas. Estos inconvenientes han podido ser superados en el caso del nematodo *Ascaris suum*, fundamentalmente debido a su gran tamaño (puede llegar a medir hasta 40 cm), de manera que el estado de modificación de la uridina de tambaleo de algunas especies de tRNAs mitocondriales de este nematodo ha podido ser determinado (Sakurai et al. 2005). En este estudio, se observó que la uridina de tambaleo de los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Trp} estaba modificada en posición 5 y posición 2 (cmnm⁵s²U₃₄) y que la U₃₄ de los mt-tRNA^{Lys}, mt-tRNA^{Gln} y mt-tRNA^{Glu} carecía de tiolación pero

estaba modificada en posición 5 (cmnm⁵U₃₄). La naturaleza de estas modificaciones de la U₃₄ es inusual ya que, en los tRNAs de *E. coli* y en los mitocondriales de levadura y humanos, los tRNAs que descodifican Lys, Gln y Glu están tiolados en posición 2, mientras que los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Trp} no lo están, aunque todos ellos tienen el grupo carboximetilaminometil (o uno equivalente) en la posición 5 (Umeda et al. 2005; Moukadiri et al. 2014; Suzuki and Suzuki 2014). Aunque *A. suum* ofrece la ventaja de su tamaño para una serie de estudios, la genética de los procesos metabólicos puede hacerse mucho mejor en *C. elegans* debido a su menor complejidad, a que se conoce bien su genoma y a la cantidad de utillajes y técnicas disponibles.

Desafortunadamente, el estudio de la composición nucleosídica de los mt-tRNAs de *C. elegans* tiene grandes limitaciones pues las técnicas actualmente disponibles requieren una cierta cantidad de muestra, difícil de conseguir debido precisamente al diminuto tamaño de *C. elegans*. En consecuencia, no ha sido posible hasta ahora, como veremos, proceder a la identificación directa de las modificaciones presentes en la U₃₄ de los mt-tRNAs de *C. elegans*, por lo que, como alternativa, hemos utilizado técnicas que calificamos como indirectas.

4.1. Análisis del estado de modificación de los tRNAs mitocondriales de *C. elegans* por espectrometría de masas

Como primera estrategia, optamos por purificar el RNA total pequeño a partir de mitocondrias de las cepas salvaje y mutantes de *C. elegans* (*mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*), tratarlo con nucleasa P1 y fosfatasa alcalina y analizar los nucleósidos resultantes por HPLC y por masas. En ninguno de los dos casos pudimos identificar los nucleósidos esperados probablemente por situarse debajo del límite de detección de la técnica y porque la mayor presencia de otras modificaciones más abundantes podría enmascarar la señal de las uridinas modificadas minoritarias en el total de la población; de manera que estas modificaciones de la posición de tambaleo se resuelven peor que otros nucleósidos por ambas técnicas. A continuación, y conociendo bien el perfil de elución en HPLC de los nucleósidos buscados, obtuvimos la fracción correspondiente a cada uno de ellos a partir del mt-RNA total digerido con nucleasa P1, para su posterior estudio por espectrometría de masas. Pensamos que la purificación mediante HPLC del hipotético nucleósido permitiría su identificación mediante una técnica más poderosa, como es la espectrometría de masas. Este ensayo se realizó en colaboración con el laboratorio del profesor

Peter Dedon en el SMART (Singapore-MIT Alliance For Research and Technology, Singapur), en el cual estuve trabajando durante una estancia predoctoral de 6 meses para aprender toda la tecnología de masas y sus aplicaciones al estudio de las modificaciones del RNA, en el que el grupo del Prof. Dedon tiene un reconocido prestigio (Chan et al. 2010; Chan et al. 2012; Su et al. 2014; Cai et al. 2015). Los resultados obtenidos sustentan la idoneidad de esta estrategia que, sin embargo, debe ser optimizada. Actualmente, seguimos trabajando en colaboración con el equipo del Prof. Dedon que también trata, por su parte, de optimizar la tecnología de masas con el fin de poder identificar nucleósidos de mt-tRNAs obtenidos de muestras biológicas de pequeño tamaño.

Por ello, esta estrategia está todavía en fase de optimización. En el laboratorio del Prof. Dedon han mejorado recientemente la técnica de masas para la identificación de nucleósidos y están muy interesados en continuar con la colaboración en esta materia por el desafío que representa. Procedimientos más sensibles que los actuales permitirían cuantificar directamente a partir de muestras de pacientes el grado de modificación de los mt-tRNAs y establecer su relación con la gravedad del fenotipo, así como estudiar si el estado de modificación de los mt-tRNAs varía en diferentes condiciones fisiológicas o patológicas. Entretanto, hemos optado para este trabajo por estrategias alternativas que, aunque menos precisas, pueden dar una idea acerca del estado de modificación de los mt-tRNAs en los mutantes de *C. elegans* objeto de nuestra investigación.

4.2. Análisis del estado de tiolación de los tRNAs mitocondriales de *C. elegans* mediante hibridación Northern en geles APM

Dadas las dificultades para identificar directamente el nucleósido presente en U₃₄ de los mt-tRNAs, decidimos emplear un método alternativo para detectar la presencia del grupo tiol en la posición 2 de la U₃₄ basado en una modificación del análisis Northern. El estado de tiolación de los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln} en este nematodo puede ser revelado mediante el uso del compuesto APM ((N-)Acroylamino-Phenyl-Mercuric chloride) (Igloi 1988) en una electroforesis en gel desnaturalizante combinada con una hibridación Northern para detectar específicamente los mt-tRNAs de interés. Cuando este compuesto de mercurio, APM, se encuentra en el gel, interacciona específicamente con los grupos tioles de la muestra de RNA, lo que provoca un retraso en su migración. Usando RNA total pequeño obtenido de la cepa salvaje de *C. elegans* y una sonda para el mt-tRNA^{Leu} observamos un retraso en la migración de este mt-tRNA con respecto al extraído de

la cepa *mttu-1*, deficiente en la enzima que presuntamente se encarga de introducir el grupo tiol en la posición 2 de la U₃₄ (figura R9A). Este resultado nos indica que el mt-tRNA^{Leu} de *C. elegans* está tiolado, al igual que ocurre en el mt-tRNA^{Leu} de *A. suum* y en contraste a lo descrito en *E. coli*, levadura y humanos. Dado que el mt-tRNA^{Leu} del mutante *mttu-1* no ha sufrido ningún retraso en su migración, se confirma que la proteína MTTU-1 es, efectivamente, responsable de la única tiolación presente en el mt-tRNA^{Leu} (por ejemplo, el tiol en la posición 2 de la U₃₄ como realizan sus homólogas en otros organismos).

En la figura R9A también se observa que, tanto el mt-tRNA^{Leu} de la muestra del mutante *mtcu-1* como el del mutante *mtcu-2*, muestran un retraso en su migración en el gel con APM. MTCU-1 y MTCU-2 presumiblemente modifican la posición 5 de la uridina de tambaleo y, el resultado obtenido en el gel, sugiere que la acción de MTTU-1 no resulta afectada por la inactivación de MTCU-1 o MTCU-2. La independencia con que se llevan a cabo las modificaciones en las posiciones 2 y 5 de la U₃₄ ha sido descrita anteriormente en *E. coli* (Elseviers et al. 1984; Sullivan et al. 1985) y en los mt-tRNAs de *S. cerevisiae* (Umeda et al. 2005), siendo los resultados de esta Tesis los primeros en mostrar la independencia de la acción de MTTU-1 en un organismo animal. Por otra parte, la hibridación con la sonda mt-tRNA^{Gln} en las muestras de RNA total pequeño obtenidas tanto de la cepa salvaje como de los mutantes simples no reveló ningún retraso en su migración, de lo que se deduce que mt-tRNA^{Gln} no está tiolado en *C. elegans* (figura R9B), al igual que lo observado previamente en el mt-tRNA^{Gln} de *A. suum* (Sakurai et al. 2005).

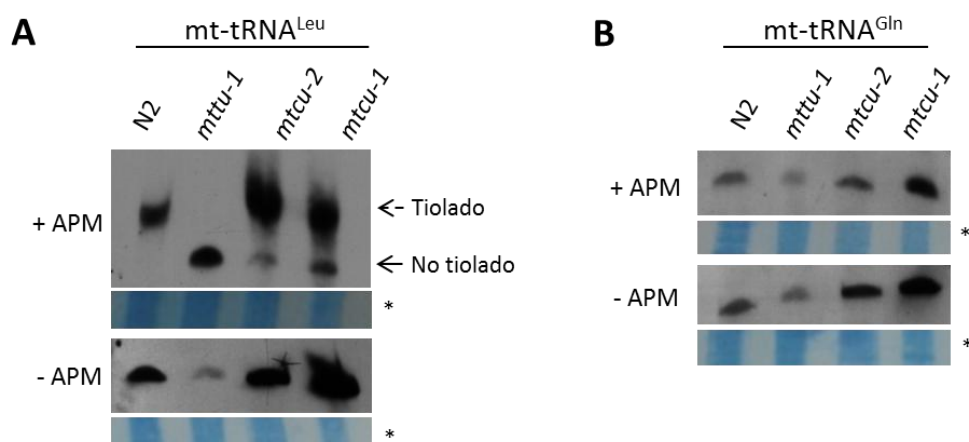


Figura R9. Análisis del estado de tiolación del mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln} de *C. elegans*. (A) Migración del mt-tRNA^{Leu} procedente de las cepas silvestre (N2) y mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* en transferencias Northern desde geles conteniendo (+APM) o no APM (-APM). Las flechas indican la migración de las moléculas tioladas y no tioladas. (B) Migración del mt-tRNA^{Gln} procedente de las cepas silvestre (N2) y mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* en transferencias Northern desde geles conteniendo (+APM) o no APM (-APM). 10 µg de RNA total pequeño de las cepas indicadas se analiza en un gel al 10% de poliácridamida desnaturizante (8 M de urea) que contiene o no 0,01 mg/ml de APM. La detección se realiza utilizando un sonda biotinilada complementaria a las secuencias del mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln}. *Tinción del RNA total pequeño con azul de metileno como control de carga.

4.3. Análisis de la modificación en posición 5 de la U₃₄ de los mt-tRNAs de *C. elegans* por digestión con angiogenina

Para determinar si MTCU-1 y MTCU-2 son las proteínas modificadoras de la posición 5 en la uridina de tambaleo de los tRNAs mitocondriales en *C. elegans* utilizamos un ensayo de sensibilidad a la digestión con angiogenina acoplado a un análisis Northern. La angiogenina es una nucleasa miembro de la superfamilia de la RNasa A con actividad específica para los tRNAs (Saxena et al. 1992; Fu et al. 2009; Schaefer et al. 2010; Li and Hu 2012; Blanco et al. 2014). Esta estrategia se basa en datos previos que indican que la pérdida de ciertas modificaciones incrementa la digestión por angiogenina de tRNAs citosólicos en *Drosophila melanogaster*, ratón y humanos (Schaefer et al. 2010; Blanco et al. 2014). En nuestro laboratorio, esta estrategia ha sido utilizada

con éxito para evaluar el estado de modificación de tRNAs de *E. coli* (usados como control ya que sus modificaciones pueden identificarse paralelamente por métodos directos) y de mt-tRNAs de un modelo celular en el que el gen *GTPBP3* (homólogo al *mtcu-1* de *C. elegans*) ha sido establemente silenciado (Martínez-Zamora et al. 2015). Este trabajo ha demostrado que los mt-tRNAs de las células silenciadas para *GTPBP3* son más sensibles a la digestión por angiogenina que los mt-tRNAs obtenidos de células control.

En esta Tesis, el RNA total pequeño aislado de la cepa salvaje y los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* fue tratado con angiogenina a diferentes tiempos (0,5h, 1h, 1,5h, 2h y 3h), de manera que los tRNAs de las muestras fueron digeridos en función de la duración del tratamiento. El mt-tRNA^{Leu} fue investigado mediante hibridación Northern con una sonda apropiada. Tanto el mt-tRNA^{Leu} de la cepa salvaje como el de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* fue digerido por la angiogenina, aunque el mt-tRNA^{Leu} extraído de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* resultó ser algo más sensible a la digestión por la nucleasa (figura R10A y R10C). Esta sensibilidad diferencial a la digestión por angiogenina fue cuantificada, tal como se observa en las figuras R10B y R10D, en la representación de la cinética de la digestión para cada uno de los tRNAs mitocondriales obtenidos de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* y la cepa salvaje.

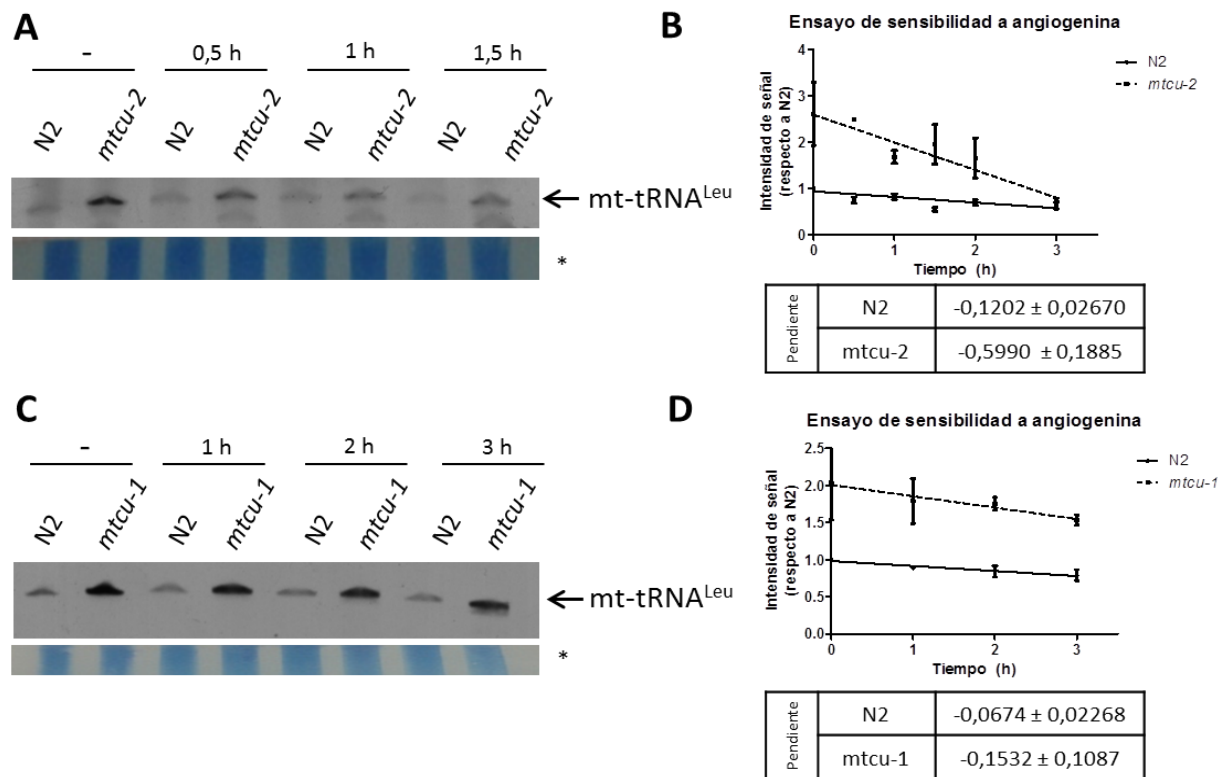


Figura R10. Digestión con angiogenina del mt-tRNA^{Leu} procedente de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* y de la cepa salvaje de *C. elegans*. (A) Digestión de 7 µg de RNA total pequeño de la cepa salvaje (N2) y del mutante simple *mtcu-2* con 12,5 µg/ml de angiogenina durante los tiempos indicados (0h, 0,5h, 1h y 1,5h). Los productos de la digestión fueron detectados por análisis Northern con la sonda específica para mt-tRNA^{Leu}. (B) Representación de la cuantificación del mt-tRNA^{Leu} de la cepa *mtcu-2* y de su cinética de digestión con angiogenina, en comparación con la cepa salvaje. (C) Digestión de 7 µg de RNA total pequeño de la cepa salvaje (N2) y del mutante simple *mtcu-1* con 12,5 µg/ml de angiogenina durante los tiempos indicados (0, 1, 2 y 3h). Los productos de la digestión fueron detectados por análisis Northern con la sonda específica para mt-tRNA^{Leu}. (D) Representación de la cuantificación del mt-tRNA^{Leu} de la cepa *mtcu-1* y de su cinética de digestión con angiogenina, en comparación con la cepa salvaje. En (B) y (D) los valores se ajustaron a una regresión lineal utilizando el software GraphPad Prism 5 y se calcularon las pendientes como indicadores de la velocidad de digestión del mt-tRNA^{Leu} por la angiogenina. * Tinción del RNA total pequeño con azul de metileno.

La pendiente de digestión del mt-tRNA^{Leu} de los mutantes simples fue ligeramente superior a la del tRNA salvaje, lo que implica una mayor sensibilidad a la digestión por angiogenina y sugiere que puede ser debida a la ausencia de la modificación en posición 5 de la U₃₄ que

presentan los mt-tRNA^{Leu} de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2*. Hay que señalar que el ensayo de digestión por angiogenina del tRNA mitocondrial de *C. elegans* ha resultado menos sensible que la digestión de los tRNAs mitocondriales humanos descrita en el trabajo de nuestro grupo arriba mencionado (Martínez-Zamora et al. 2015). Esta menor sensibilidad del ensayo puede ser debida a la conformación atípica de los tRNAs mitocondriales de los nematodos (Wolstenholme et al. 1987; Watanabe et al. 1994; Watanabe et al. 2014). Ya se ha descrito previamente que los ensayos de sensibilidad a endonucleasas pueden variar de manera importante dentro de los tRNAs del mismo organismo y respecto a la misma especie de tRNA entre organismos diferentes (Lu et al. 2005; Lu et al. 2008). En esta Tesis, usamos también otra nucleasa (la γ -toxina de *Kluyveromyces*), purificada a partir de una cepa de *E. coli* superproductora de la misma y amablemente cedida por el Prof. Byström (Lu et al. 2005; Lu et al. 2008) pero los resultados (datos no mostrados) no fueron mejores que los obtenidos con angiogenina.

4.4. Alteración de los niveles constitutivos de los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln} en los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*

Una de las dificultades para evaluar la sensibilidad a la angiogenina de los mt-tRNAs obtenidos de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* fue la mayor cantidad de mt-tRNA^{Leu} que se detectó en los análisis Northern a pesar de haber usado la misma cantidad de RNA pequeño total que en la cepa silvestre (ver figura R9 y R10). Una cuantificación de todos los análisis Northern realizados indicó un incremento de 2 y 1,5 veces, en relación a la cepa silvestre, de los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln} (figura R11). Por el contrario, en el caso del mutante simple *mttu-1*, observamos una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de estos dos mt-tRNAs respecto a la cepa silvestre (figura R11).

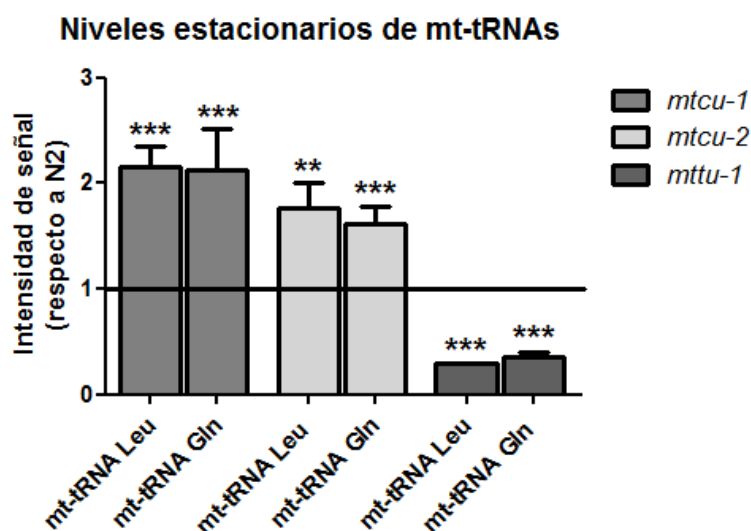


Figura R11. Cuantificación de los niveles estacionarios de los mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln} en las cepas salvaje y simples mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*.

Estos resultados sugieren que, en el caso de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2*, pueden activarse mecanismos compensatorios destinados a paliar el defecto en la modificación de la U₃₄ con un aumento en los niveles de tRNAs mitocondriales. De hecho, se ha descrito que la superproducción de tRNAs específicos puede compensar el fenotipo de mutantes de *E. coli* y levadura incapaces de modificar la U₃₄ (Brégeon et al. 2001; Esberg et al. 2006; Bjork et al. 2007; Leidel et al. 2008). Mientras que, en estos casos de la literatura, la superproducción de los tRNAs se consigue mediante clonaciones apropiadas, en el caso de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* aquí descritos proponemos que el defecto en la modificación de la U₃₄ estimula una señalización retrógrada por la que genes nucleares que controlan la síntesis y/o estabilidad de los mt-tRNAs resultarían activados.

En cambio, en el mutante *mttu-1* parece estimularse un proceso de signo opuesto que conduce a una disminución importante en los niveles de mt-tRNAs, incluso de aquéllos que como mt-tRNA^{Gln} no son sustrato de la proteína MTTU-1. Este comportamiento diferencial entre los mutantes *mtcu-1/mtcu-2* y *mttu-1* es muy interesante pues sugiere que la falta de modificación de la U₃₄ en la posición 5 o en la posición 2 genera respuestas diferentes en los gusanos.

5. La inactivación de *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* provoca disfunción mitocondrial en *C. elegans*

En humanos, mutaciones en *MTU1*, *MTO1* y *GTPBP3* producen disfunción de la fosforilación oxidativa mitocondrial, debido a que afectan a la actividad y a los niveles estacionarios de los complejos OXPHOS, principalmente de los complejos I y IV (Zeharia et al. 2009; Ghezzi et al. 2012; Kopajtich et al. 2014; Tischner et al. 2015). Por homología con las proteínas humanas y debido a que *MTTU-1*, *MTCU-1* y *MTCU-2* modifican los tRNAs mitocondriales de *C. elegans*, en este trabajo se ha investigado el efecto de las mutaciones knock-out de *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* en diversos aspectos de la fisiología mitocondrial.

Inicialmente, se estudiaron los niveles estacionarios de algunas subunidades de los complejos I, IV y V por transferencia Western. Las subunidades estudiadas fueron NUO-2 (NADH Ubiquinona Oxidoreductasa) del complejo I, CTC-1/COX-1 (Citocromo C Oxidasa) del complejo IV y ATP-2 (subunidad beta de la ATP sintasa) del complejo V. Las proteínas NUO-2 y ATP-2 están codificadas por el genoma nuclear mientras que CTC-1/COX-1 está codificada por el genoma mitocondrial. En las transferencias, también se detectó la actina como control de carga. Los datos, representados en la figura R12, revelaron que los niveles de NUO-2 (CI) se reducían en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, mientras que se mantenían inalterados en el mutante *mttu-1*. Llamativamente, tanto los niveles de la subunidad NUO-2 (CI) como los de la subunidad CTC-1/COX-1 (CIV) estaban drásticamente reducidos en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1*. Esto sugiere que se produce un efecto sinérgico de las mutaciones en *mtcu-2* y en *mttu-1* que afecta a la estabilidad y/o biogénesis de los complejos I y IV. En ninguno de los simples o dobles mutantes se observó ningún cambio en los niveles de la subunidad ATP-2 (complejo V).

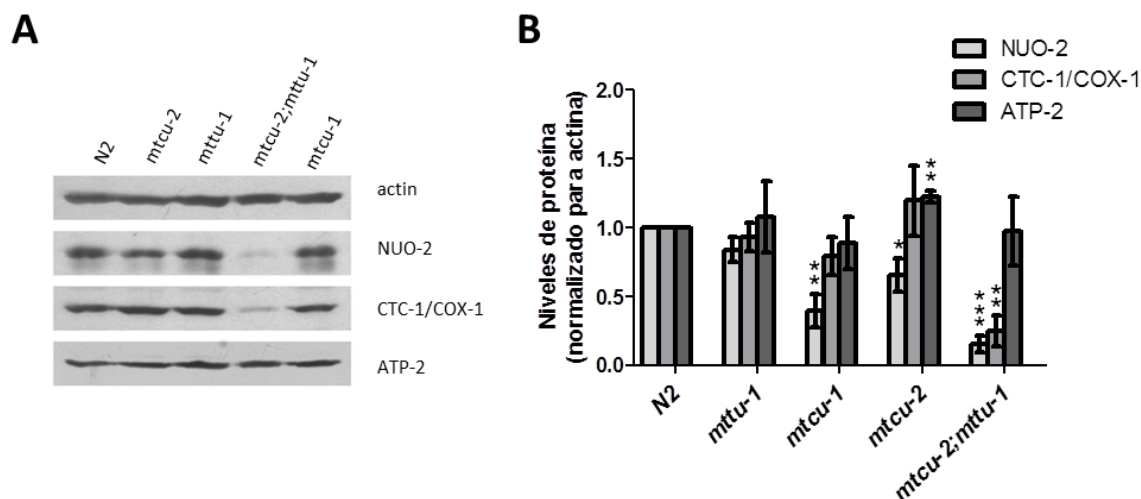


Figura R12. Niveles estacionarios de las subunidades NUO-2, CTC-1 y ATP-2 de los complejos I, IV y V, respectivamente, de la fosforilación oxidativa. (A) Transferencia Western representativa de extractos de gusanos completos de la cepa silvestre (N2), mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y mutante doble *mtcu-2;mttu-1* a 20°C. Se indican las subunidades OXPHOS detectadas con los anticuerpos correspondientes y la actina, usada como control de carga. (B) Cuantificación de los niveles estacionarios de NUO-2 (complejo I), CTC/COX-1 (complejo IV) y ATP-2 (complejo V) en las cepas salvaje (N2) y mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-2;mttu-1* a 20°C. El nivel de expresión de las proteínas analizadas en tres experimentos independientes fue cuantificado por densitometría y los valores medios fueron normalizados frente a actina y a la cepa salvaje. *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.0001

A continuación, se estudiaron los niveles de potencial de membrana mitocondrial ya que proporcionan información del estado funcional de la mitocondria. Un correcto gradiente electroquímico de protones de la membrana interna mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la integridad mitocondrial y, consecuentemente, de otros aspectos funcionales, como la síntesis de ATP, el importe y exporte de metabolitos, la homeostasis del calcio y el transporte de proteínas. Defectos en el sistema OXPHOS suelen afectar el potencial de membrana mitocondrial, puesto que los complejos I, III y IV están implicados en el bombeo de protones al espacio intermembrana mitocondrial, lo que mantiene el correcto potencial de membrana. Así pues, para evaluar si las mutaciones en *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* afectan al potencial de membrana, los gusanos salvajes y mutantes se tiñen con etil éster perclorato de tetrametilrodamina (TMRE). TMRE es un indicador fluorescente del potencial de membrana

mitocondrial ya que la internalización de este catión lipofílico depende directamente del potencial de membrana (Farkas et al. 1989; Loew et al. 1993). La fluorescencia de TMRE en todo el gusano fue cuantificada y reveló un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial en los mutantes simples *mttu-1* y *mtcu-2* y un descenso aún más acusado, cercano al 50%, en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* (figura R13A). El potencial de membrana se evaluó también con MitoTracker Red, con propiedades similares a TMRE, y se obtuvieron resultados muy parecidos (figura R13B).

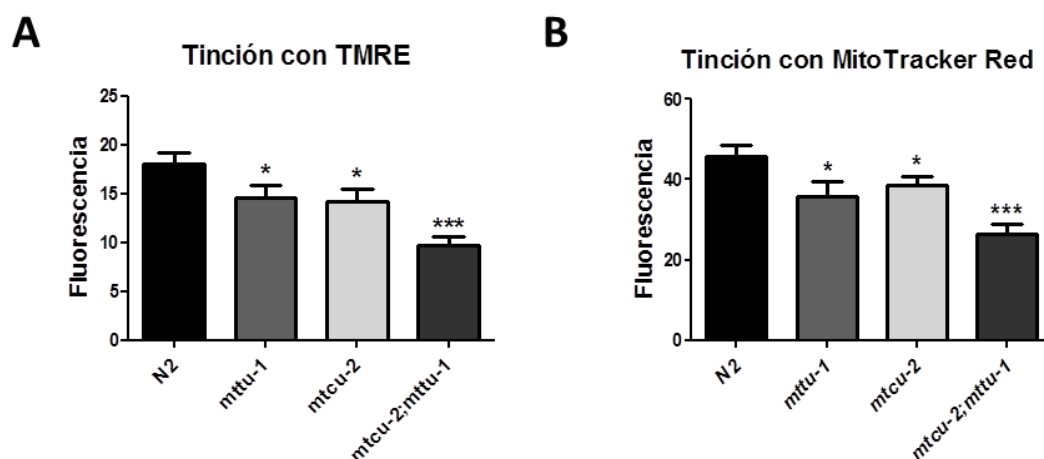


Figura R13. Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1* y *mtcu-2* y el mutante doble *mtcu-2;mttu-1* mediante la tinción *in vivo* con (A) TMRE y (B) MitoTracker Red. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

La relación AMP/ATP informa del estado energético celular, por lo que fue el parámetro que se decidió analizar a continuación. Se siguió el protocolo descrito en Materiales y métodos para determinar los niveles de AMP y ATP mediante HPLC a partir de una muestra de 100 gusanos. Se observó que la relación AMP/ATP no variaba entre la cepa salvaje y todos los simples mutantes (*mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*) ni existían diferencias con el doble mutante *mtcu-1;mtcu-2*, mientras que aumentaba 5 veces en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* (figura R14B). Este último dato indica que los niveles de ATP están severamente reducidos en la cepa *mtcu-2;mttu-1*, lo que estaría de acuerdo con una gran afectación de los complejos I y IV, tal como sugiere la drástica reducción en los niveles de NUO-2 y CTC-1/COX-1 observados en esta cepa (figura R12).

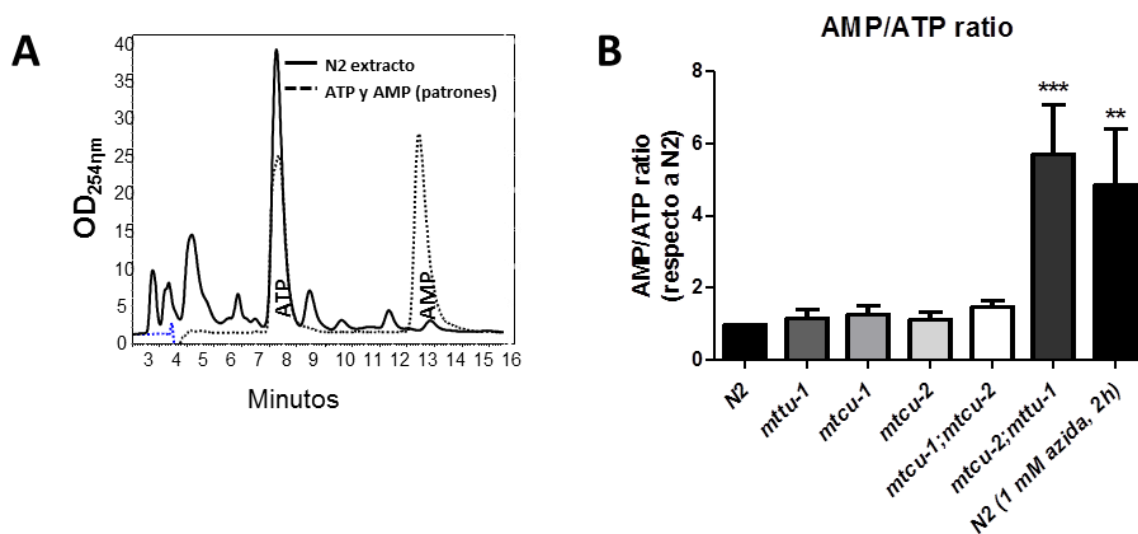


Figura R14. Determinación de la relación AMP/ATP en extractos de la cepa salvaje (N2), los simples mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y los dobles mutantes *mtcu-1;mtcu-2* y *mtcu-2;mttu-1* por HPLC. (A) Cromatograma representativo de los niveles de ATP y AMP en la cepa silvestre. Se muestra también el patrón de migración de los controles comerciales AMP y ATP. (B) Representación de las relaciones AMP/ATP determinadas a partir del análisis por HPLC de los extractos de las cepas indicadas. También se ha calculado la relación AMP/ATP en una cepa salvaje tratada durante 2h con 1mM de acida sódica, un inhibidor de complejo IV usado en este ensayo como control positivo. ** $p < 0.005$ y * $p < 0.0008$**

Cabe destacar que tanto el incremento en la ratio AMP/ATP como la disminución del potencial de membrana mitocondrial no pueden atribuirse a un menor contenido genético mitocondrial, ya que la determinación de la ratio mtDNA/nDNA no reveló diferencias significativas entre los mutantes y la cepa salvaje (figura R15).

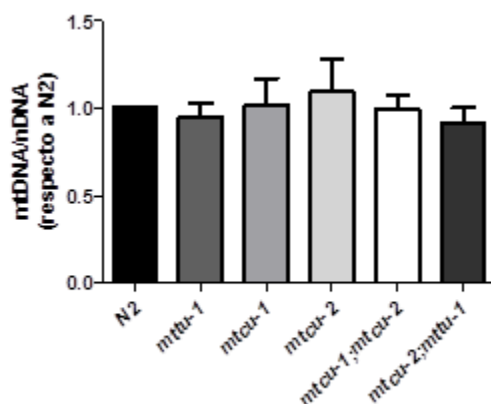


Figura R15. Cuantificación de la ratio mtDNA/nDNA por PCR cuantitativa en la cepa N2 y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y los mutantes dobles *mtcu-1;mtcu-2* y *mtcu-2;mttu-1*.

El efecto sinérgico de las mutaciones *mtcu-2* y *mttu-1* en los niveles estacionarios de NUO-2 y CTC-1/COX-1 y el descenso de los niveles estacionarios de la subunidad NUO-2 en los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* junto con el descenso del potencial de membrana observado en los mutantes simples *mttu-1* y *mtcu-2* sugieren que el funcionamiento del sistema OXPHOS está alterado en los mutantes simples, incluyendo *mttu-1*, a pesar de no exhibir cambios en los niveles de las tres proteínas OXPHOS examinadas. No obstante, la ratio AMP/ATP normal que presentan todos los mutantes simples sugiere que debe existir algún tipo de mecanismo compensatorio, presumiblemente a través de la activación de complejo II. Es posible que el complejo I pueda estar más afectado por las mutaciones (de hecho, es así en el modelo celular de silenciamiento estable de *GTPBP3* anteriormente mencionado) y que la entrada de equivalentes de reducción (en forma de $FADH_2$) a través de complejo II compense tal deficiencia en relación al transporte de electrones pero no respecto al potencial de membrana, dado que este complejo, a diferencia de los complejos I, III y IV, no bombea protones al espacio intermembrana durante su funcionamiento. A este respecto, es interesante señalar que la proteína UCP-4, la única ortóloga en *C. elegans* de las proteínas desacopladoras humanas (UCP1-5), regula el metabolismo relacionado con la función del complejo II al mediar el transporte de succinato a la mitocondria (Pfeiffer et al. 2011). Además, se ha demostrado que su homóloga humana UCP4 interacciona con el complejo II en células de neuroblastoma y aumenta su actividad (Ho et al. 2012). Finalmente, UCP-4 está implicada en el

metabolismo de los ácidos grasos, ya que su inactivación por RNAi aumenta la β -oxidación y la acumulación de lípidos (Ji et al. 2012). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha descrito que los niveles de mRNA de UCP2 se encuentran aumentados en las células silenciadas permanentemente para GTPBP3 (la homóloga humana de MTCU-1), presumiblemente como parte de un mecanismo compensatorio del defecto en el complejo I (Martínez-Zamora et al. 2015). La proteína UCP2 modula el funcionamiento del ciclo de Krebs al exportar fuera de la mitocondria intermediarios como malato y oxalacetato, limitando el catabolismo del piruvato y promoviendo la oxidación de sustratos alternativos como los ácidos grasos y la glutamina (Kukat et al. 2014; Vozza et al. 2014). Los datos de Martínez-Zamora y colaboradores sugieren que la inducción de UCP2, al promover un cambio en el funcionamiento del ciclo de Krebs, favorece el flujo de electrones a través del complejo II y/o flavoproteínas de la cadena de transporte, compensando así el defecto del complejo I (Martínez-Zamora et al. 2015). Por todos estos motivos, en este trabajo decidimos medir los niveles de mRNA de *ucp-4* en las cepas salvaje y en las mutantes. En la figura R16 se observa que los niveles de mRNA de *ucp-4* están aumentados un 50% en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* y cerca de 3 veces en el mutante *mttu-1*.

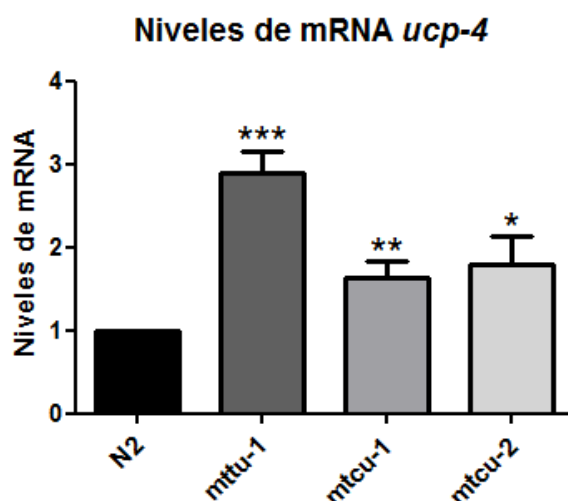


Figura R16. Cuantificación de los niveles de mRNA de *ucp-4* en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, por PCR cuantitativa a partir de un extracto de RNA total. Los niveles de mRNA de *ucp-4* se normalizan respecto a *act-1* y la cepa salvaje (N2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.002$ y *** $p < 0.0001$

Estos datos sugieren que las mutaciones estudiadas provocan un cambio metabólico que afecta al ciclo de Krebs y al funcionamiento del sistema OXPHOS mediante la sobreactivación de complejo II para mantener la producción de ATP a niveles constitutivos.

Por otra parte, la disminución de los niveles estacionarios de la proteína NUO-2, codificada por el genoma nuclear, en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* sugiere que hay una alteración en la traducción o el ensamblaje de algunas de las subunidades del complejo I. Como consecuencia, la pérdida de la homeostasis del proteoma mitocondrial (por acumulación de proteínas mal plegadas o de mala calidad, por degradación de proteínas que no llegan a ensamblarse al haber déficit de algunas codificadas por el mtDNA, o por degradación de proteínas intramitocondriales solubles, por ejemplo del ciclo de Krebs, a consecuencia de los cambios en el metabolismo mitocondrial promovidos por la alteración del funcionamiento del sistema OXPHOS) podría aumentar la proteostasis mitocondrial y los niveles de chaperonas mitocondriales, es decir, podría activar el mecanismo conocido como UPR^{mt} (Haynes et al. 2007; Haynes and Ron 2010; Taylor and Dillin 2011; Jensen and Jasper 2014). De hecho, en células humanas o murinas deficitarias en MTO1 (homóloga humana de MTCU-2) se ha detectado un incremento de proteasas mitocondriales, especialmente de ClpP, relacionadas con la degradación intramitocondrial de proteínas y la generación de péptidos señalizadores que activan la respuesta UPR^{mt} y la síntesis de chaperonas implicadas en el plegamiento de proteínas mitocondriales (Haynes and Ron 2010; Tischner et al. 2015). Por todo ello, abordé el estudio de los niveles de mRNA de las chaperonas mitocondriales implicadas en la respuesta UPR^{mt} en *C. elegans*, denominadas *hsp-6* y *hsp-60*. Curiosamente, todos los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* tienen menores niveles de mensajero de *hsp-6* respecto a la cepa salvaje (figura R17). Sin embargo, el comportamiento de los mutantes difiere en lo que se refiere a la expresión de *hsp-60* ya que estaban incrementados, respecto a la cepa silvestre, en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* pero disminuidos en el mutante *mttu-1* (figura R17).

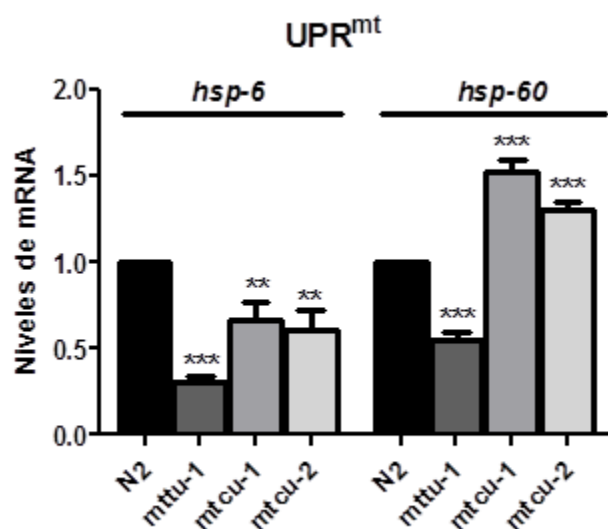


Figura R17. Cuantificación de los niveles de mensajero de *hsp-6* y *hsp-60* en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*. Los niveles de mRNA de *hsp-6* y *hsp-60* se normalizan respecto a *act-1* y la cepa salvaje (N2). ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$

Este resultado implica que los procesos compensatorios que se estimulan en el mutante simple *mttu-1* y en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* podrían ser parcialmente diferentes.

6. Estudio de la expresión de genes implicados en diferentes rutas metabólicas en los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*

Considerando los altos niveles de UCP-4 en los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, el papel asignado a esta proteína en el funcionamiento del complejo II y la relación entre la degradación de intermediarios del ciclo del TCA con la inducción de la respuesta UPR^{mt} (Haynes et al. 2010; Pfeiffer et al. 2011; Ho et al. 2012), decidimos estudiar la expresión de genes implicados en distintas rutas metabólicas que convergen en el ciclo de Krebs, como son la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos y la oxidación de la glutamina para dilucidar el cambio metabólico que puede haberse producido en cada uno de los mutantes.

Se han cuantificado los niveles de mRNA de tres genes implicados en la ruta de la glicólisis (*pfk-1.1*, *fgt-1* y *ldh-1*), que es la vía encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener

energía. El piruvato producido por esta vía entra en la mitocondria para incorporarse al ciclo del TCA y generar equivalentes de reducción en forma de NADH y FADH₂ que se introducen en el sistema OXPHOS a través de complejo I y II, respectivamente. *pfk-1.1* codifica para la enzima fosfofructoquinasa, una enzima clave para la regulación de la glicólisis pues al consumir ATP para producir fructosa bifosfato confiere irreversibilidad a la ruta, mientras que *fgt-1* codifica para un transportador transmembrana de glucosa y *ldh-1* codifica para la enzima lactato deshidrogenasa, que es responsable de obtener lactato a partir de piruvato en el citoplasma. Los datos revelaron que la expresión de *pfk-1.1* y *ldh-1* está significativamente reducida en el mutante *mttu-1* (más de un 60%) y en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (alrededor de un 50%), mientras que la expresión de *fgt-1* es similar a la encontrada en la cepa silvestre (figura R18). En conjunto, estos datos apuntan a que la glicólisis está reducida en los tres mutantes.

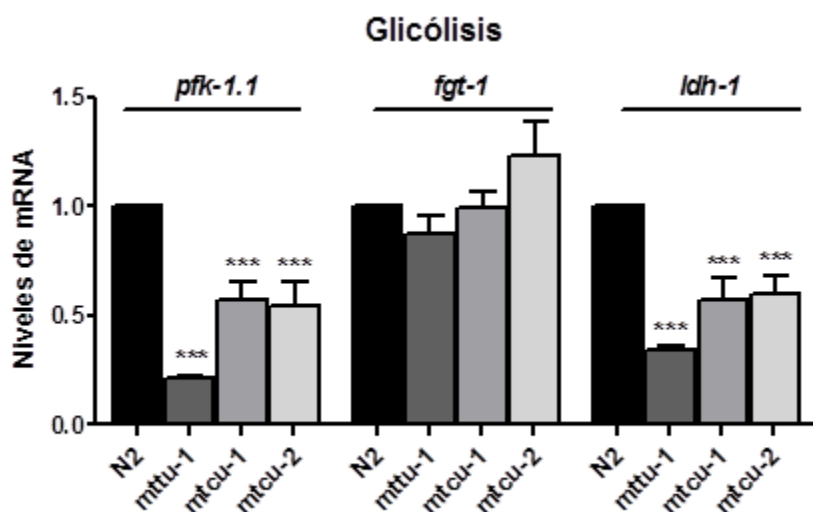


Figura R18. Cuantificación de los niveles de mensajero de *pfk-1.1*, *fgt-1* y *ldh-1* en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*. Los niveles de mRNA de *pfk-1.1*, *fgt-1* y *ldh-1* se normalizan respecto a *act-1* y la cepa salvaje (N2). ***p<0.0001

La ruta de oxidación de ácidos grasos ha sido estudiada mediante la cuantificación del mRNA de dos enzimas implicadas en diferentes puntos de la misma, *acs-17* y *acd-12*. En esta ruta, los ácidos grasos de cadena par son degradados mediante una cadena de reacciones que separa fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxilo de la molécula, liberando así una molécula de acetil CoA que entra en el ciclo de Krebs. El gen *acs-17* codifica para un miembro de la

familia de las acyl-CoA sintetetas de cadena larga (implicadas en la activación de la oxidación de ácidos grasos, un paso previo y necesario a la oxidación), mientras que *acdh-12* codifica para una acyl-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga, implicada en el primer paso de la oxidación. La expresión de ambos genes está reducida en los mutantes (figura R19), sobre todo en la cepa *mttu-1* en la que los niveles de mRNA de *acs-17* se reducen un 75% y los de *acdh-12* más de un 60%. En los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* los niveles de *acs-17* y *acdh-12* se reducen un 50 y un 25% aproximadamente. En consecuencia, parece que la oxidación de los ácidos grasos también está reducida en los mutantes que son objeto de este estudio.

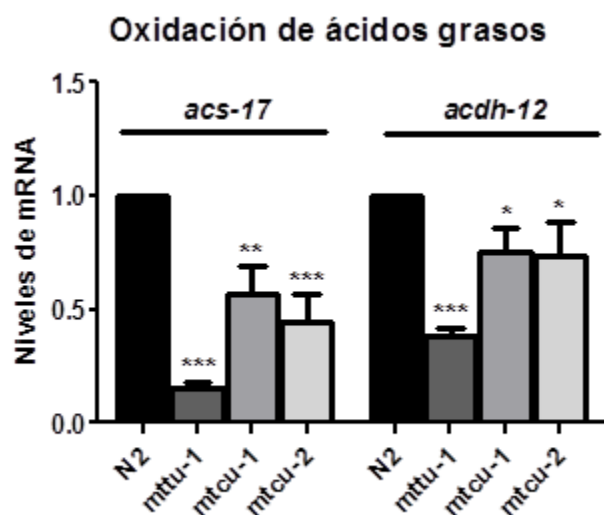


Figura R19. Cuantificación de los niveles de mRNA de *acs-17* y *acdh-12*, que transcriben proteínas directamente implicadas en la vía de la oxidación de ácidos grasos, en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*. Los niveles de mensajero de *acs-17* y *acdh-12* se normalizan respecto a *act-1* y la cepa salvaje (N2). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$

Finalmente, se han estudiado los niveles de mensajero de *glna-1*, que codifica una proteína homóloga de las enzimas humanas GLS1 y GLS2 y que se piensa tiene actividad glutaminasa en *C. elegans*. Esta actividad hidroliza el grupo amino de la glutamina, produciendo amonio y glutamato, el cual puede dar lugar, posteriormente, a oxoglutarato, un intermediario del ciclo del TCA. En este caso, encontré que los niveles de mensajero estaban incrementados en los mutantes en relación con la cepa silvestre (figura R20). Concretamente, los niveles de *glna-1*

estaban incrementados, aproximadamente, un 50% en el mutante *mttu-1* y un 25 y 50% en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, respectivamente. Estos resultados sugieren que, en los mutantes, se ha producido una reprogramación en el funcionamiento del ciclo del TCA por lo que se requiere la activación de una ruta anaplerótica, basada en la oxidación de la glutamina, para mantener el funcionamiento del ciclo del TCA.

Glutaminasa (niveles de mRNA *glna-1*)

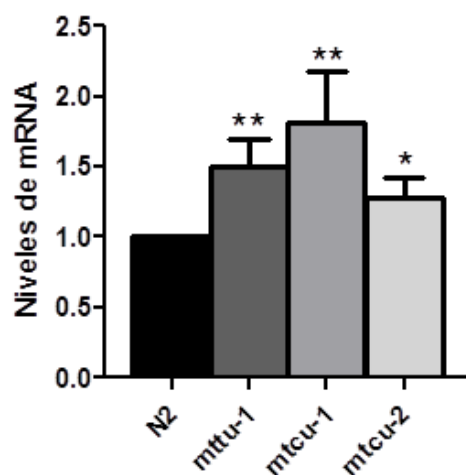


Figura R20. Expresión de *glna-1* en la cepa salvaje y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*. Los niveles de mensajero de *glna-1* se normalizan respecto a *act-1* y la cepa salvaje (N2). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$

7. Estudio fenotípico de los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y del doble mutante *mtcu-1;mtcu-2*

La falta de modificación de la uridina de tambaleo debida a la ausencia o mutación de las proteínas homólogas a MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 en *E. coli*, *S. cerevisiae* y humanos produce diversos fenotipos en cada organismo con alteraciones en la síntesis mitocondrial de proteínas y en el funcionamiento del sistema OXPHOS en eucariotas (ver apartado 2.3 de la introducción). En numerosos estudios sobre *C. elegans* se ha relacionado la disfunción mitocondrial con anormalidades en fertilidad, desarrollo y longevidad (Tsang et al. 2001; Ventura et al. 2006; Rea et

al. 2007). Por ello, en este trabajo hemos estudiado tales aspectos en las cepas de *C. elegans* portadoras de mutaciones *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*.

7.1. Estudio de la fertilidad en los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*

La fertilidad se determinó por el número de descendientes de un hermafrodita por autofertilización a 20 y 25°C. A 20°C (figura R21A), la descendencia que produjo el mutante simple *mttu-1* se redujo en un 35% respecto a la de la cepa salvaje N2, ya que 40 hermafroditas del mutante *mttu-1* tuvieron una media de 195±18 descendientes y los mismos hermafroditas de la cepa salvaje tuvieron una media de 299±5 gusanos por hermafrodita. Los 40 hermafroditas de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* tuvieron una media de 239±7 y 264±5 descendientes, respectivamente, lo que muestra una reducción en su fertilidad del 20 y 12%, respectivamente. El doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* mostró una reducción de su fertilidad del 19% (243±7 descendientes), similar a la observada para los simples mutantes.

A 25°C (figura R21B), una reducción estándar de la descendencia de la cepa salvaje N2 fue observada ya que, a esta temperatura, tuvieron 243±7 gusanos de media. Particularmente interesante fue la drástica reducción de un 82% en la descendencia del simple mutante *mttu-1* a una media de 44±14 descendientes por hermafrodita, y la observación de que algunos gusanos fueron completamente estériles. Estos datos indican que la inactivación de *mttu-1* confiere termosensibilidad al carácter de fertilidad, ya que la reducción de descendientes fue más acusada a 25°C que a 20°C. En contraste, no se observó un comportamiento marcadamente termosensible en la fertilidad de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* ni del doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* puesto que su fertilidad a 25°C, en comparación con la cepa salvaje, disminuyó en un 27% (a 177±6 gusanos), 23% (a 187±10 descendientes) y 30% (a 168±7 nematodos), respectivamente.

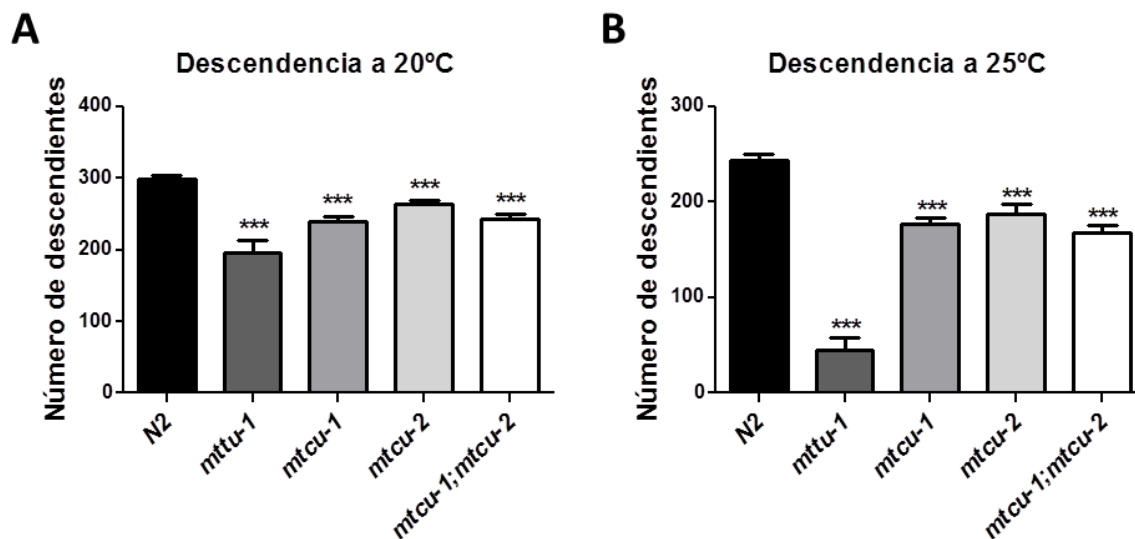


Figura R21. Fertilidad de los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*. Medida del número de descendientes de los mutantes indicados a (A) 20°C y (B) 25°C. *** $p < 0.0001$

7.2. Estudio de la longitud del ciclo reproductivo en los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*

A continuación, se cuantificó la longitud del ciclo reproductivo, es decir, se contabilizó el tiempo transcurrido entre que son huevos recién puestos hasta que éstos se desarrollan en adultos y ponen el primer huevo. Tanto el ciclo reproductivo de la cepa salvaje como el de los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* y el del doble mutante *mtcu-1;mtcu-2* duró aproximadamente 68 h a 20°C y 55 h a 25°C (figura R22A y R22B). Sin embargo, el ciclo reproductivo del mutante *mttu-1* se alargó 10 horas a 20°C y 14 horas a 25°C, por lo que se puede concluir que la mutación *mttu-1* también confiere un fenotipo termosensible a la duración del ciclo reproductivo.

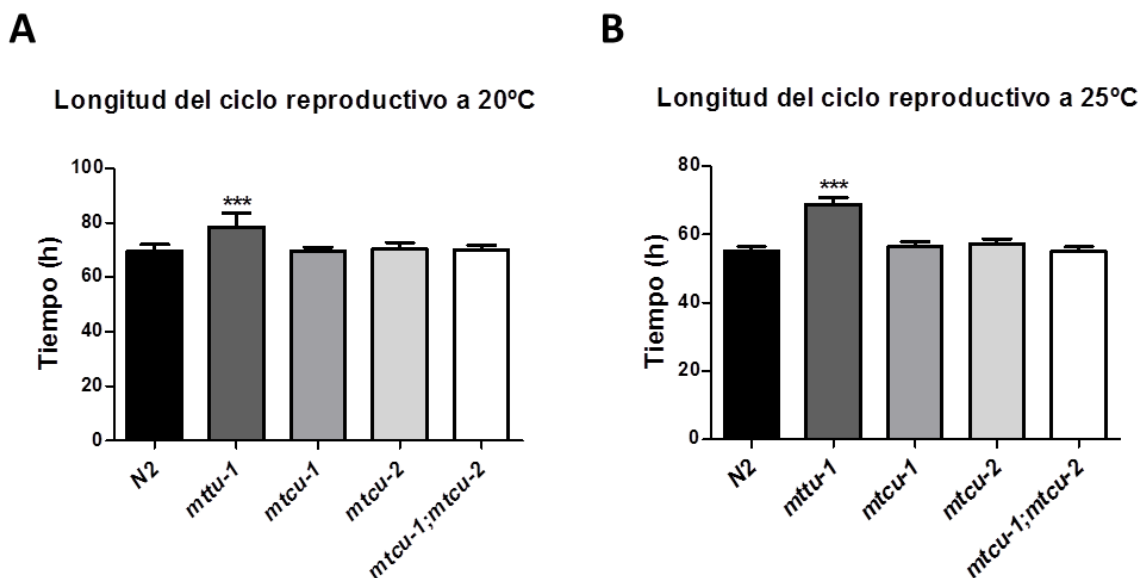


Figura R22. Duración del ciclo reproductivo en los mutantes *mttu-1*, *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mtcu-1;mtcu-2*. Se muestra la longitud del ciclo reproductivo a (A) 20°C y (B) 25°C. *** $p < 0.0001$

Todos estos datos indican que la inactivación de MTTU-1 tiene un mayor efecto en la fertilidad y el ciclo reproductivo que la inactivación de MTCU-1 y/o MTCU-2, confirmando, además, termosensibilidad a estos caracteres fenotípicos.

8. La ausencia simultánea de MTTU-1 y MTCU-1 o MTCU-2 produce esterilidad y problemas en el desarrollo de *C. elegans*

Tanto en *E. coli* como en levadura, la inactivación simultánea de los homólogos *mnmA* y *mnmE* o *mnmG* produce letalidad sintética bajo condiciones de crecimiento específicas (Umeda et al. 2005; Wang et al. 2010; Armengod et al. 2014). Con la finalidad de conocer si en *C. elegans* la combinación de mutaciones en MTTU-1 y MTCU-1 o MTCU-2 también presenta un efecto sinérgico, se construyeron los dobles mutantes *mtcu-1;mttu-1* y *mtcu-2;mttu-1* (descripción en el apartado 3.5 de Resultados y 2.4 de Materiales y Métodos). Tal como se ha mencionado anteriormente, los dobles mutantes *mtcu-1;mttu-1* y *mtcu-2;mttu-1* fueron estériles, lo que nos indica que en *C. elegans*, al igual que en *E. coli* y *S. cerevisiae*, la combinación de mutaciones afectando la modificación de la U_{34} en la posición 2 y 5 produce letalidad sintética. Dado que los

dos dobles mutantes *mtcu-1;mttu-1* y *mtcu-2;mttu-1* presentan el mismo fenotipo, decidimos construir un mutante balanceado con el marcador fenotípico nT1g que nos facilitara la realización de estudios más detallados. Concretamente, construimos el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* balanceado con nT1g (*mtcu-2;mttu-1/nT1g*), en el que la mutación *mtcu-2* está en homocigosis mientras que el gen *mttu-1* está delecionado en una de las copias y en versión silvestre (ligada al marcador fluorescente nT1g) en la otra copia. Escogimos realizar los cruces con la cepa salvaje *mtcu-2* ya que la deleción que contiene afecta sólo a este gen, puesto que la deleción del *mtcu-1* implica tanto al gen *mtcu-1* como al gen F39B2.5 y los fenotipos usando *mtcu-1* podrían confundir al no poder asociarlos únicamente a la inactivación de *mtcu-1*. De esta manera, y de este punto en adelante, al hacer referencia a la cepa *mtcu-2;mttu-1* ésta provendrá de la descendencia de *mtcu-2;mttu-1/nT1g* en la que ambas mutaciones, *mtcu-2* y *mttu-1* estén en homocigosis.

Un análisis fenotípico más exhaustivo de *mtcu-2;mttu-1* revela que la mayoría de los huevos homocigotos generados por el mutante *mtcu-2;mttu-1/nT1g* tiene problemas en el desarrollo pues no llegan a eclosionar y, la fracción que eclosiona da lugar a adultos hermafroditas estériles. Probablemente, los defectos en el desarrollo en los huevos que llegan a eclosionar y progresar a adultos son parcialmente subsanados por la herencia de carga materna de RNAs y proteínas, ya que la madre conserva un alelo salvaje del gen *mttu-1*. De hecho, el silenciamiento del gen *mtcu-2* en el mutante *mttu-1* por alimentación con RNAi reveló diversos fenotipos: un drástico descenso del número de descendientes a 75 ± 10 huevos, una letalidad embrionaria severa (ya que más del 50% de los huevos puestos no eclosionaron) y una detención del desarrollo en estadios larvarios tempranos (L1-L3) de aquellos descendientes que llegaron a eclosionar (figura R23A y R23B). También se observó que ninguno de estos descendientes llegó a estadio adulto.

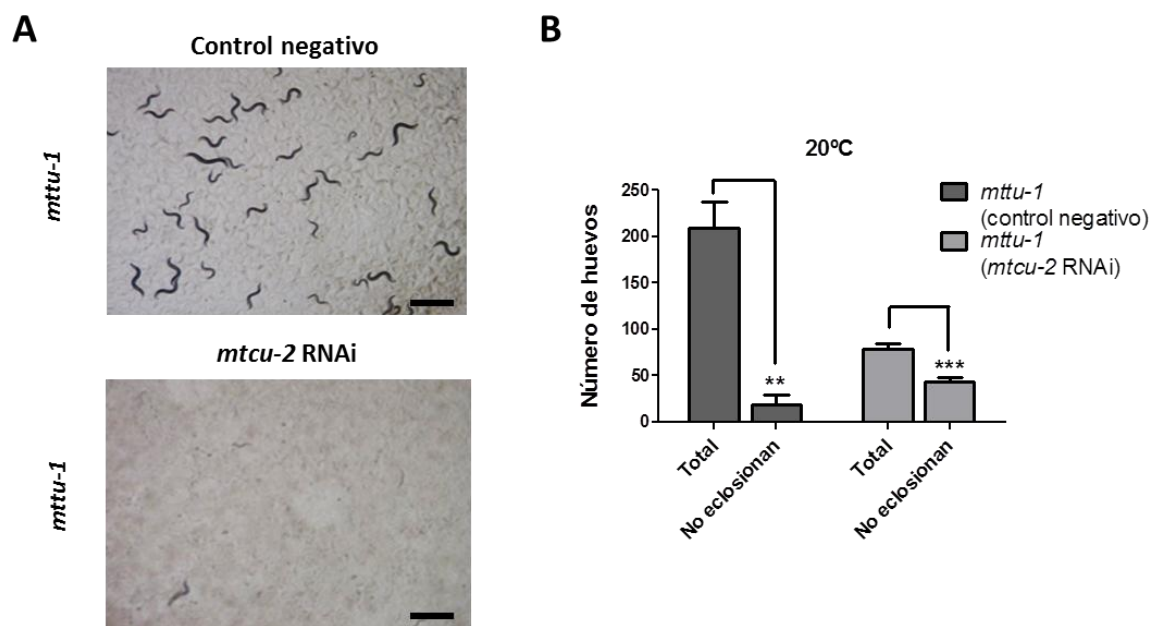


Figura R23. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce esterilidad, letalidad embrionaria y defectos en el desarrollo de *C. elegans*. (A) El silenciamiento de *mtcu-2* en el mutante *mttu-1* a 20°C (panel inferior) produce letalidad embrionaria y defectos en el desarrollo, puesto que los gusanos detienen su desarrollo en estadios larvarios tempranos (L1-L2). (B) Cuantificación de los huevos y del porcentaje que eclosiona en los mutantes *mttu-1* (control negativo de silenciamiento) y *mttu-1* silenciado para *mtcu-2*. ** $p < 0.004$ y *** $p < 0.0001$

Este resultado sugiere un papel esencial de los genes *mttu-1* y *mtcu-2* en el desarrollo y crecimiento de *C. elegans*, además de apoyar la idea de que la progresión en el desarrollo del doble mutante *mtcu-2;mttu-1* depende de la carga materna recibida de tRNAs mitocondriales modificados y proteínas modificadoras de los mismos. Por otra parte, se cruzaron machos salvajes con hermafroditas doble mutantes *mtcu-2;mttu-1* y observamos que este cruce no restauró la fertilidad, lo que sugiere que la esterilidad de este mutante es dependiente de propiedades de los oocitos.

Para conocer con mayor profundidad las razones de la esterilidad, se examinó en detalle la línea germinal del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*. Para ello, se diseccionaron gónadas de gusanos salvajes y mutantes *mtcu-2;mttu-1* en estadio adulto de 1 día y se analizaron por microscopía de contraste de fase (DIC) y fluorescencia, tras la tinción con DAPI. El desarrollo de las gónadas

somáticas fue normal hasta el estadio L3. Sin embargo, a partir del estadio L4 se observaron defectos en la línea germinal, ya que las gónadas tenían menos células germinales que la cepa salvaje y un menor tamaño (comparar figuras R24A-D y E-F). Como se puede apreciar en las figuras R24 A-C y E, es necesario tomar dos fotografías para incluir toda la gónada salvaje, mientras que sólo es necesaria una para captar toda la gónada doble mutante. Además, las gónadas del mutante doble *mtcu-2;mttu-1* carecían de espermateca (esperma) (comparar figuras R24C-D y R24E-F) y de oocitos maduros (comparar figuras R24G-H y R24I-J). La razón más probable es que exista una reducción en la proliferación de las células precursoras germinales diploides, efecto que ocurre a partir del estadio L3. Sin embargo, no es el único defecto, ya que las gónadas no están completamente vacías, por lo que es posible que las células germinales formadas no maduren correctamente para dar oocitos. De la tinción con DAPI queda claro que muchas de las células germinales en el doble mutante quedan detenidas en el estadio de 6 bivalentes (figura R24H y R24J). Esto podría indicar un problema en el desarrollo de los oocitos en la metafase I de la meiosis o, alternativamente, que las células progresen precozmente a metafase II, el estadio en el cual los oocitos maduros se detienen antes de la fertilización.

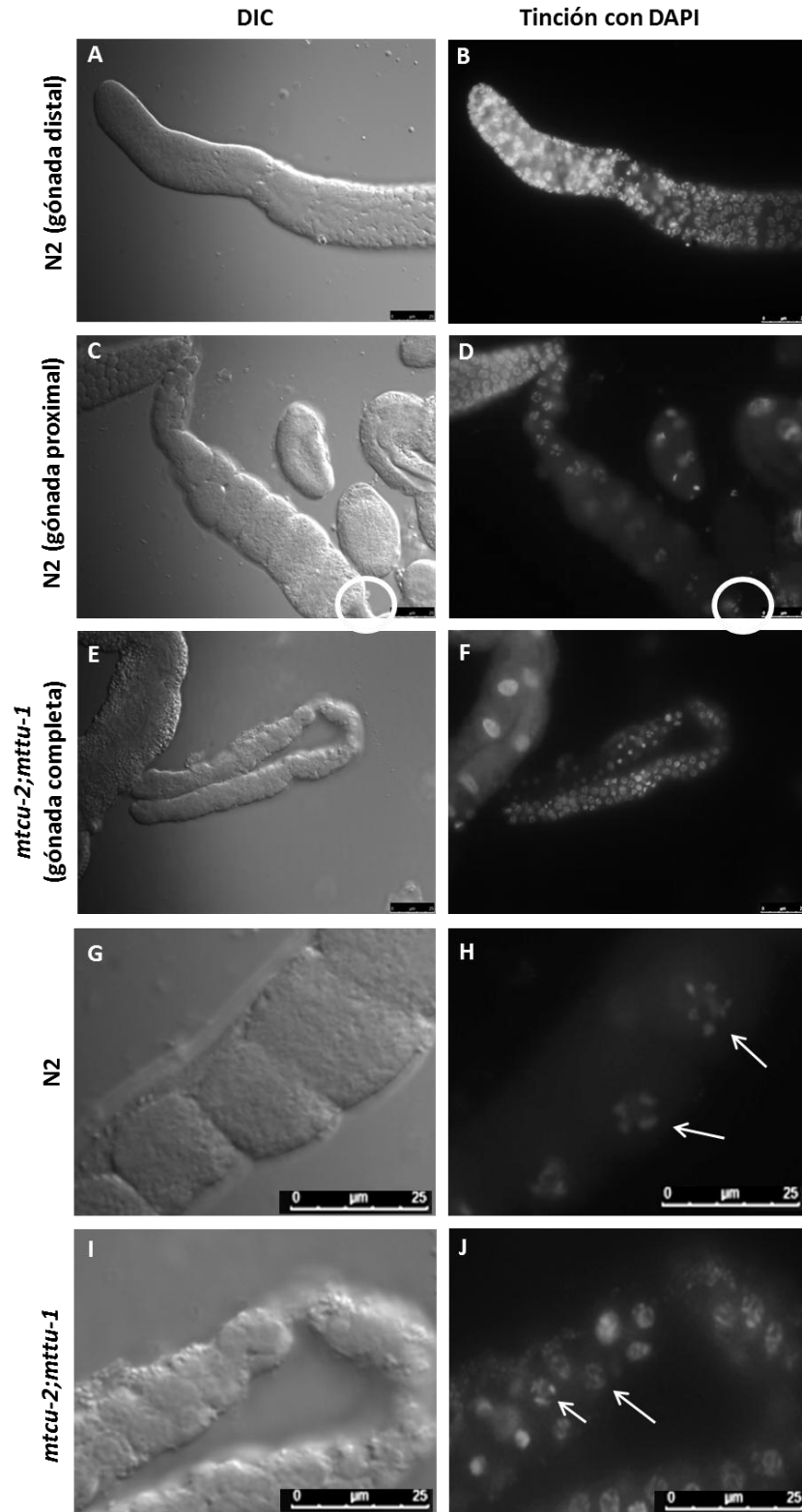


Figura R24. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 produce defectos en las gónadas de *C. elegans*. (A, B, C y D) Gónada distal y proximal de la cepa N2 obtenida con DIC (A y C) y con microscopía de

fluorescencia tras una tinción con DAPI (B y D). En las imágenes C y D se ha marcado el lugar correspondiente al inicio de la espermateca con un círculo blanco. (E y F) Gónada del mutante *mtcu-2;mttu-1* obtenida con DIC (E) y con microscopía de fluorescencia tras una tinción con DAPI (F). (G y H) Detalle de la región proximal de las células germinales de la cepa salvaje (N2) obtenida con DIC (G) y con microscopía de fluorescencia tras una tinción con DAPI (H). (I y J) Detalle de la región proximal de las células germinales de la cepa *mtcu-2;mttu-1*. Las flechas blancas indican núcleos de células en estadio 6 bivalente. Escala: 25 μ m. Todas las imágenes están tomadas con la misma magnitud.

9. La inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* alarga la vida media en *C. elegans*

Una fertilidad reducida y defectos en la maduración y proliferación de la línea germinal están habitualmente asociados a una mayor longevidad (Hsin and Kenyon 1999; Partridge et al. 2005; Kenyon 2010; McCormick et al. 2010). Por ese motivo, estudiamos la vida media de los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* y del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*. La supervivencia fue estudiada a 25°C hasta que todos los gusanos murieron. Como se observa en la figura R25A, el efecto de las mutaciones simples en la vida media de los gusanos fue trivial, incluso en el caso del mutante simple *mttu-1* cuya fertilidad a esta temperatura fue muy reducida (ver figura R21). Por el contrario, la vida media del doble mutante, que es completamente estéril, resultó ser significativamente mayor (figura R25B, tabla R3). Estos resultados indican que la inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* promueve longevidad en *C. elegans*.

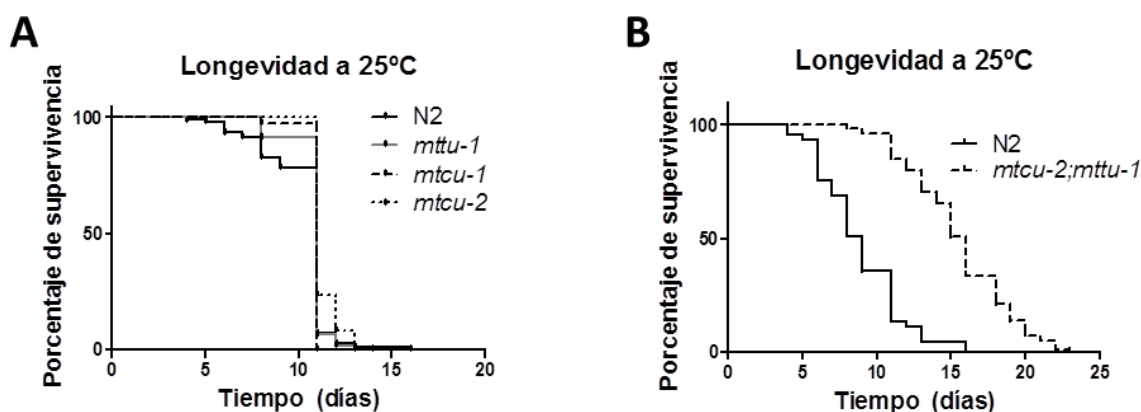


Figura R25. La inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 promueve longevidad en *C. elegans*. (A) Supervivencia de la cepa silvestre y los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*. (B) Supervivencia del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*. Los ensayos se realizaron a 25°C. El ensayo se realizó en placas FUDR-. Se

repitió en placas FUDR+ con idénticos resultados (datos no mostrados). Los datos estadísticos están en la tabla R3.

Para comprobar si la esterilidad exhibida por el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* es responsable del aumento en la vida media, se construyeron los dobles mutantes *mttu-1;rrf-1* y *mttu-1;ppw-2* y se analizó el efecto que resulta al inhibir *mtcu-2* en ellos por alimentación con RNAi. El gen *rrf-1* codifica para una homóloga de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) requerida para el procesamiento de los genes diana del sistema de RNAi en algunos tejidos somáticos (como tejido muscular, gónada somática y algunas regiones de la hipodermis) pero no en tejido germinal ni en el intestino, de manera que el mutante de delección *rrf-1(pk1417)* es capaz de permitir el silenciamiento por RNAi en línea germinal y el intestino pero no en los tejidos somáticos nombrados (Sijen et al. 2001; Kumsta and Hansen 2012). PPW-2 es una proteína perteneciente a la familia argonauta que está implicada en el silenciamiento permanente de los transposones y en el mecanismo de co-supresión en el genoma de las células germinales de *C. elegans* (por el que una región de la cromatina adyacente a un transposón permanece compactada y la expresión de los genes de esa región reprimida) (Vastenhouw et al. 2003; Robert et al. 2005); el mutante portador de la mutación *ppw-2(pk1673)* es, por tanto, defectivo en el silenciamiento permanente de transposones repetitivos en la línea germinal. Resumiendo, las mutaciones en *rrf-1* y *ppw-2* limitan el silenciamiento a ciertos tejidos de *C. elegans* (línea germinal, intestino y parte de la hipodermis) o a un entorno genético determinado en el tejido germinal, respectivamente.

Como se muestra en la figura R26A, el silenciamiento de *mtcu-2* en *mttu-1;rrf-1* aumenta su longevidad debido a la inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* en las células germinales e intestinales. La figura R26B muestra que el silenciamiento de *mtcu-2* en *mttu-1;ppw-2* no aumenta la longevidad de esta cepa, a pesar de que *mtcu-2* ha sido silenciado completamente en todos los tejidos. De este resultado se deduce que el silenciamiento permanente de los transposones y la co-supresión génica en los tejidos germinales crean un patrón genético adecuado en la línea germinal para disparar las vías que provocan longevidad en *C. elegans*. En consecuencia, la longevidad de este doble mutante parece ser un efecto “cell-non-autonomous” (el efecto de la mutación se produce en una célula o tejido diferente del portador de la mutación) disparado por la inactivación de ambos genes en la línea germinal e intestino. Es decir, la ausencia de MTTU-1 y MTCU-2 en el tejido germinal (con un patrón genético adecuado) dispara una señalización desde

este mismo tejido que se extiende a los tejidos somáticos para producir un aumento en la vida media del organismo completo.

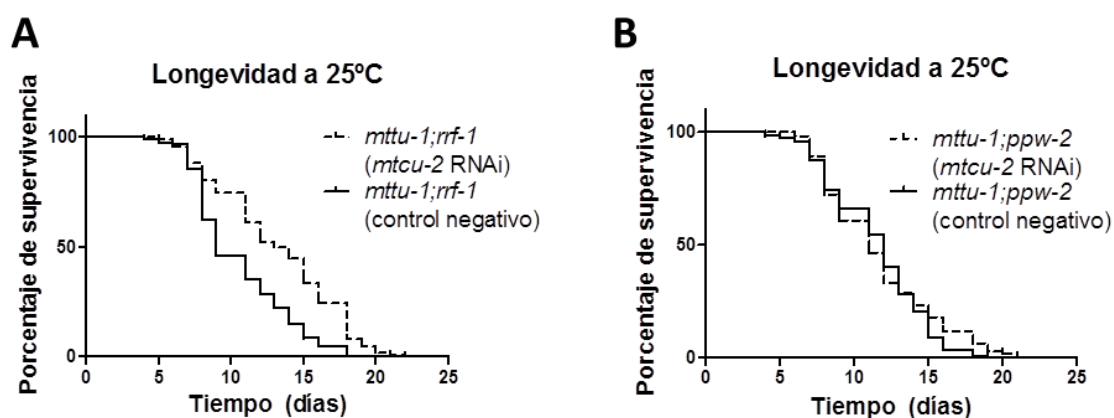


Figura R26. El silenciamiento específico de *mtcu-2* en la línea germinal e intestino del mutante *mttu-1* promueve longevidad a 25°C. (A) Silenciamiento de *mtcu-2* en un mutante *mttu-1; rrf-1*. (B) Silenciamiento de *mtcu-2* en un mutante *mttu-1; ppw-2*. Los ensayos se realizaron a 25°C y el silenciamiento se inició en el estadio L4 para no afectar al desarrollo larvario. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

10. La inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* en la línea somática o germinal causa defectos en el desarrollo o esterilidad, respectivamente

Tal como se ha comentado anteriormente, el silenciamiento del gen *mtcu-2* en todo el organismo de *C. elegans* de una cepa mutante *mttu-1* produce una drástica reducción de la fertilidad, letalidad embrionaria y arresto del desarrollo (figura R23). Con el fin de determinar los tejidos a través de los que ocurren los problemas en el desarrollo causados por la inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2*, estudiamos la descendencia de los mutantes *mttu-1; rrf-1* y *mttu-1; ppw-2* silenciados para *mtcu-2* desde el estadio L4 y observamos que la descendencia del mutante *mttu-1; rrf-1* silenciado para *mtcu-2*, en la cual el silenciamiento de *mtcu-2* ocurre mayoritariamente en la línea germinal y en el intestino, fue capaz de desarrollarse correctamente hasta el estadio adulto, en el cual el 90% de los gusanos fueron estériles (figura R27A). Estos resultados indican que la inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* en el tejido germinal a partir del estadio L4 no afecta el desarrollo de los huevos y larvas, mientras que tienen un efecto “cell-

autonomous” (el efecto de la inactivación se produce en el mismo tejido o la misma célula portadora de la mutación) en el desarrollo de la línea germinal.

Por el contrario, cuando *mtcu-2* es silenciado en la línea somática y germinal en un entorno genético defectivo en silenciamiento de transposones (conseguido al utilizar el mutante *mttu-1;ppw-2*) se observa que un gran número de huevos permanecen sin eclosionar y la descendencia capaz de eclosionar detiene su desarrollo en estadios larvarios tempranos (desde L1 a L3) (figura R27B). Este resultado es muy similar al observado tras el silenciamiento del gen *mtcu-2* en el mutante *mttu-1* (figura R23). Estos datos indican que la inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* en las células somáticas tiene un efecto “cell-autonomous” durante los estadios tempranos de desarrollo de *C. elegans* y, por tanto, que el entorno genético de la línea germinal no influye en el desarrollo somático de este nematodo.

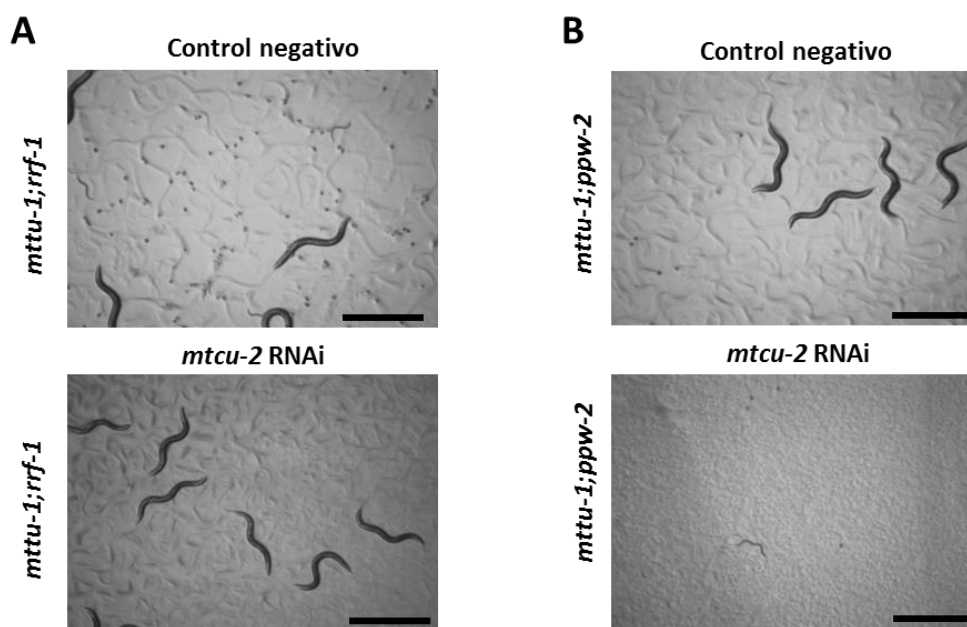


Figura R27. El silenciamiento de *mtcu-2* en el tejido somático de un mutante *mttu-1* induce defectos en el desarrollo de *C. elegans*, mientras que su inactivación en tejido germinal e intestino provoca esterilidad a 25°C. (A) La descendencia del mutante *mttu-1; rrf-1* silenciado para *mtcu-2* desde estadio L4 es capaz de desarrollarse a adulto, aunque el 90% de la descendencia resultó estéril. (B) La descendencia de *mttu-1; ppw-2* silenciado para *mtcu-2* detiene el crecimiento de *C. elegans* en el estadio embrionario o larvario temprano debido a la inactivación simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 en el tejido somático. Escala: 1 mm.

11. Estudio de las rutas de señalización implicadas en la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*

Tal como se ha mencionado en la introducción, los principales genes relacionados con longevidad en *C. elegans* se encuentran implicados en diversas rutas de señalización entre las que existen solapamientos: (1) vía de la insulina, (2) vía mediada por TOR, (3) esterilidad o defectos en línea germinal relacionados o no con la señalización hormonal y (4) estrés mitocondrial. Con la finalidad de conocer qué ruta o rutas están activadas por la ausencia simultánea de MTTU-1 y MTCU-2 en línea germinal y, por tanto, están directamente implicadas en la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*, procedí a silenciar diversos genes diana de cada una de estas vías por alimentación con RNAi para estudiar la modulación que producen en la vida media de la cepa salvaje y del doble mutante *mtcu-2;mttu-1* a 25°C.

11.1. Señalización por insulina

La ruta de señalización por insulina es un regulador central del metabolismo, de la resistencia a estrés y del desarrollo, pero también de la longevidad en eucariotas, ya que su desregulación produce una prolongación en la vida media de diversos organismos como gusanos o moscas mediada por la activación del factor de transcripción DAF-16 (Murphy and Hu 2013). La inactivación de DAF-2 por mutaciones o RNAi, considerado como el iniciador de esta vía de señalización, aumenta la longevidad en *C. elegans* (figura I16) (Dillin et al. 2002; Murphy and Hu 2013). En este trabajo, se ha silenciado el gen *daf-2* por alimentación con RNAi en la cepas salvaje y doble mutante *mtcu-2;mttu-1* a partir del estadio L4. El silenciamiento de *daf-2* en la cepa salvaje produjo un aumento en la vida media y máxima de los gusanos, como era esperado (figura R28). Una extensión similar en la vida media fue también detectada al silenciar *daf-2* en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* (figura R28). Hay, por lo tanto, un efecto aditivo. Esta observación sugiere que la ruta de señalización por insulina, al menos su etapa inicial controlada por *daf-2*, no participa activamente en el incremento de la vida media del mutante doble *mtcu-2;mttu-1*, sino que actúa en paralelo con la ruta activada conjuntamente por las mutaciones *mtcu-2* y *mttu-1*. La diferencia en la significación en los dos test estadísticos utilizados habitualmente para evaluar la

supervivencia (Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon) es debida a características intrínsecas de los análisis estadísticos; mientras que el test Gehan-Breslow-Wilcoxon es más sensible a las diferencias tempranas entre las supervivencias de ambos grupos (i. e. N2 y N2 silenciado para *daf-2*), el test Log-rank Mantel-Cox es más sensible a las diferencias que ocurren a tiempos más tardíos. Esto explica la diferente significación encontrada al analizar la cepa salvaje por los dos tests (tabla R3).

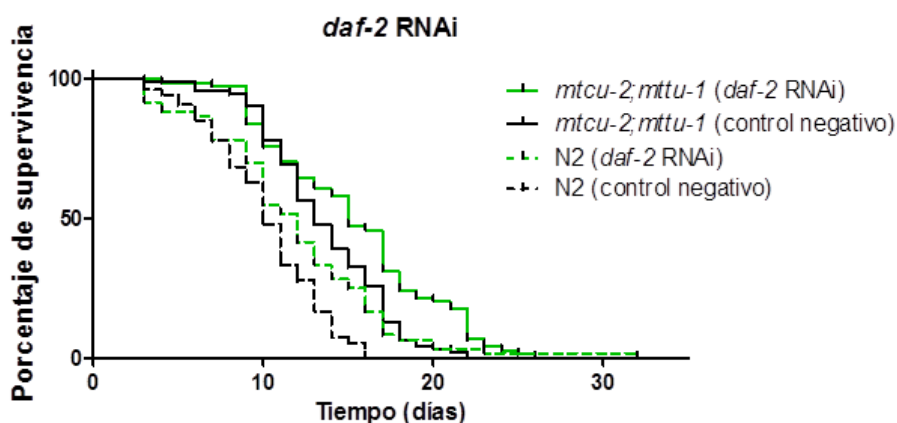


Figura R28. Efecto del silenciamiento de *daf-2* sobre la longevidad de las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1* a 25°C. Silenciamiento de *daf-2* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

11.2. Ruta mediada por TOR (o restricción calórica)

La ruta TOR (target of rapamycin) controla el crecimiento y la reproducción en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos y factores de crecimiento del medio, es decir, actúa como un sensor de nutrientes y dirige la respuesta metabólica frente a una restricción dietética que puede repercutir en la longevidad en *C. elegans* y otros organismos. TOR existe en dos complejos (TORC1 y TORC2) que median diferentes actividades metabólicas y cada uno de estos complejos contiene diversos co-activadores, destacando DAF-15/Raptor para TORC1 y RICT-1/Rictor para TORC2. En este trabajo hemos silenciado cada uno de los co-activadores, *daf-15* y *rict-1*, en la cepa salvaje y en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1*.

Previamente en la literatura se ha descrito que el doble silenciamiento de *daf-15*/Raptor y *let-363*/TOR resulta en una extensión de la longevidad en *C. elegans* (Ching et al. 2010) y que los mutantes heterocigotos de *daf-15(m81)* también son más longevos (Jia et al. 2004). Estos datos no coinciden con el resultado obtenido en esta tesis en el que el silenciamiento de *daf-15* no afectó a la longevidad de la cepa salvaje ni a la del doble mutante (figura R29A, tabla R3). Es posible que el silenciador utilizado en nuestro caso no haya funcionado correctamente o que la eficiencia del silenciamiento no haya sido suficiente para producir un efecto fenotípico al mantener unos niveles basales de mRNA de *daf-15* como para que éste pueda llevar a cabo su función o, alternativamente, que sea necesaria la inactivación simultánea de *let-363*/TOR para observar la extensión de la vida media.

Por otra parte, el silenciamiento de *rict-1* aumentó la vida media tanto de la cepa salvaje como de la del doble mutante, aunque no así la vida máxima que únicamente aumentó en el silenciamiento de *rict-1* en la cepa salvaje (figura R29B). Debe mencionarse que el efecto en la longevidad de mutaciones en *rict-1* es dependiente de la cepa bacteriana utilizada como alimentación, habiéndose descrito una mayor longevidad en los mutantes *rict-1(mg451)* alimentados con la cepa HT115, la misma utilizada en nuestros ensayos de silenciamiento, y una reducción en su vida media cuando son alimentados con la bacteria OP50 (Soukas 2009).

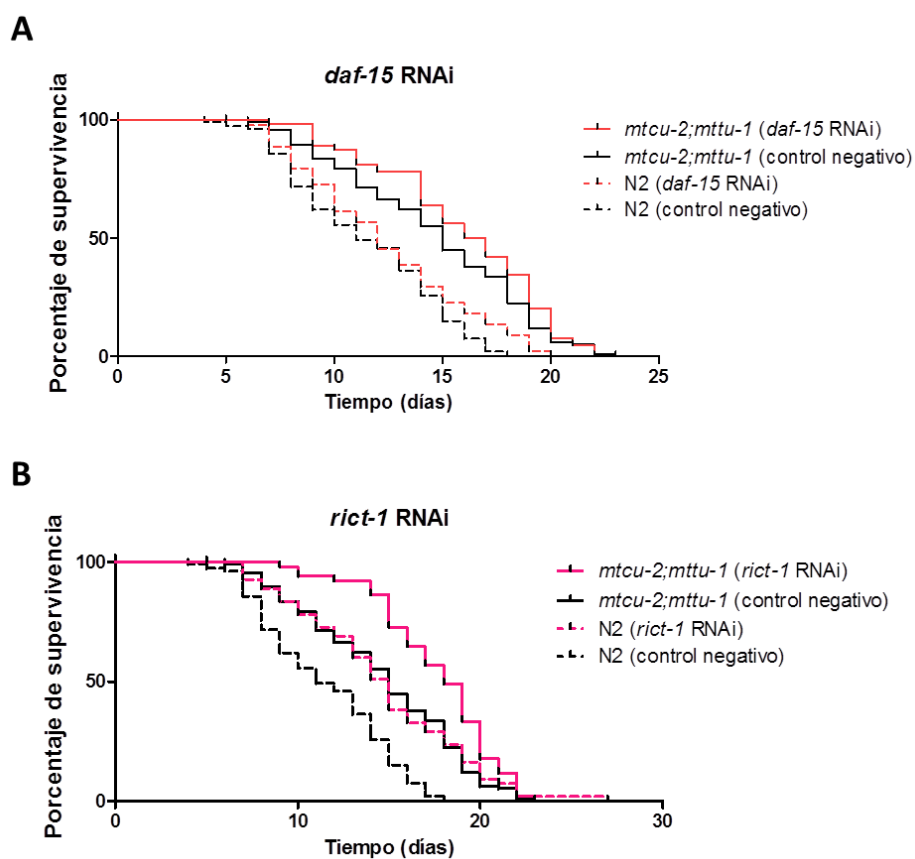


Figura R29. Efecto del silenciamiento de *daf-15* o *rict-1* sobre la supervivencia de las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1* a 25°C. (A) Silenciamiento de *daf-15* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. (B) Silenciamiento de *rict-1* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

Debido a que el silenciamiento de *daf-15* y *rict-1* en la cepa *mtcu-2;mttu-1* produjo una respuesta de supervivencia similar a la observada en la cepa salvaje, se puede concluir que la vía mediada por TOR no parece estar directamente relacionada con la ruta de longevidad activada en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1*.

11.3. Señalización por línea germinal mediada por una respuesta hormonal

Según hemos visto en la introducción, el incremento de la longevidad por la ablación de la línea germinal depende de la translocación al núcleo de DAF-16 en las células intestinales, lo que

sugiere que la regulación de la longevidad debe incluir señales transmisibles a través de tejidos y otras contribuciones de diferentes genes. Uno de estos genes es *kri-1* que participa en la localización nuclear de DAF-16 en animales que carecen de línea germinal, aunque el mecanismo por el cual favorece esa translocación no está resuelto (Berman and Kenyon 2006). Por otra parte, la señalización a través de esteroides también se ha relacionado con el aumento de la longevidad en animales que carecen de línea germinal (Hsin and Kenyon 1999; Jia et al. 2002; Mukhopadhyay and Tissenbaum 2006). Dos de los componentes clave de esta vía son DAF-9 y DAF-12, ambos requeridos para la localización nuclear de DAF-16, aunque sus funciones pueden estar separadas, ya que DAF-12 puede actuar independientemente de DAF-16, sugiriendo que puede activar algunos de los genes diana de DAF-16. Además, se debe tener en cuenta que DAF-9 y DAF-12 son capaces de inducir otros procesos metabólicos además de la longevidad, como son la entrada en el estado dauer o la inducción del ciclo reproductivo (Dumas et al. 2013; Wang et al. 2015)

En este trabajo, se han silenciado *kri-1*, *daf-9* y *daf-12* en la cepa salvaje y mutante *mtcu-2;mttu-1* para estudiar la relación de la longevidad de este doble mutante con tales vías.

Datos publicados informan de que el silenciamiento de *kri-1* en la cepa salvaje no provoca ninguna variación en su vida media, y que reduce su longevidad si el mutante carece de línea germinal y su vía de señalización depende de *kri-1* (Berman and Kenyon 2006). En este caso, el silenciamiento de *kri-1* no produjo ningún cambio en la supervivencia de las cepas salvaje ni doble mutante (figura R30A), indicando que la extensión de la longevidad en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* presenta características diferentes a la producida por la eliminación de la línea germinal.

Se ha visto que los mutantes *daf-9* son más longevos cuando crecen a 15°C, sin embargo, a temperaturas entre 20 y 25°C estos mutantes presentan una reducción en su vida media (Jia et al. 2002; Gerisch et al. 2007). Diversos mutantes *daf-12* presentan efectos opuestos respecto al fenotipo de longevidad: algunos de los mutantes *daf-12* disminuyen su vida media y otros mutantes extienden su longevidad (más aún al combinarse con mutaciones *daf-2*) (Fisher and Lithgow 2006). Nuestros datos muestran que el silenciamiento de *daf-9* a 25°C en la cepa salvaje reduce la supervivencia (figura R30B). Sin embargo, el silenciamiento de *daf-9* en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* la amplía (figura R30B), sugiriendo que en este mutante hay activada una ruta de longevidad que resulta favorecida con el silenciamiento de *daf-9*. En contraste, el silenciamiento de *daf-12* en la cepa salvaje no afecta a la supervivencia (figura R30C), sugiriendo que el ácido dafacrónico sintetizado por *daf-9* puede ejercer su función positiva, independientemente de DAF-

12 o, alternativamente, que la proteína DAF-12 que queda tras el silenciamiento permite un nivel de señalización adecuado para mantener la supervivencia. Sin embargo, en las condiciones impuestas por la inactivación simultánea de *mtcu-2* y *mttu-1* (doble mutante), el silenciamiento de *daf-12* facilita que la ruta de longevidad activada en el doble mutante esté favorecida (figura R30C). Cabe señalar que, en el doble mutante, el silenciamiento independiente de *daf-9* y *daf-12* tiene el mismo efecto sugiriendo que, en este mutante, el bloqueo de la ruta de señalización controlada por *daf-9* y *daf-12* favorece el funcionamiento de la ruta de longevidad que está activada en el mutante.

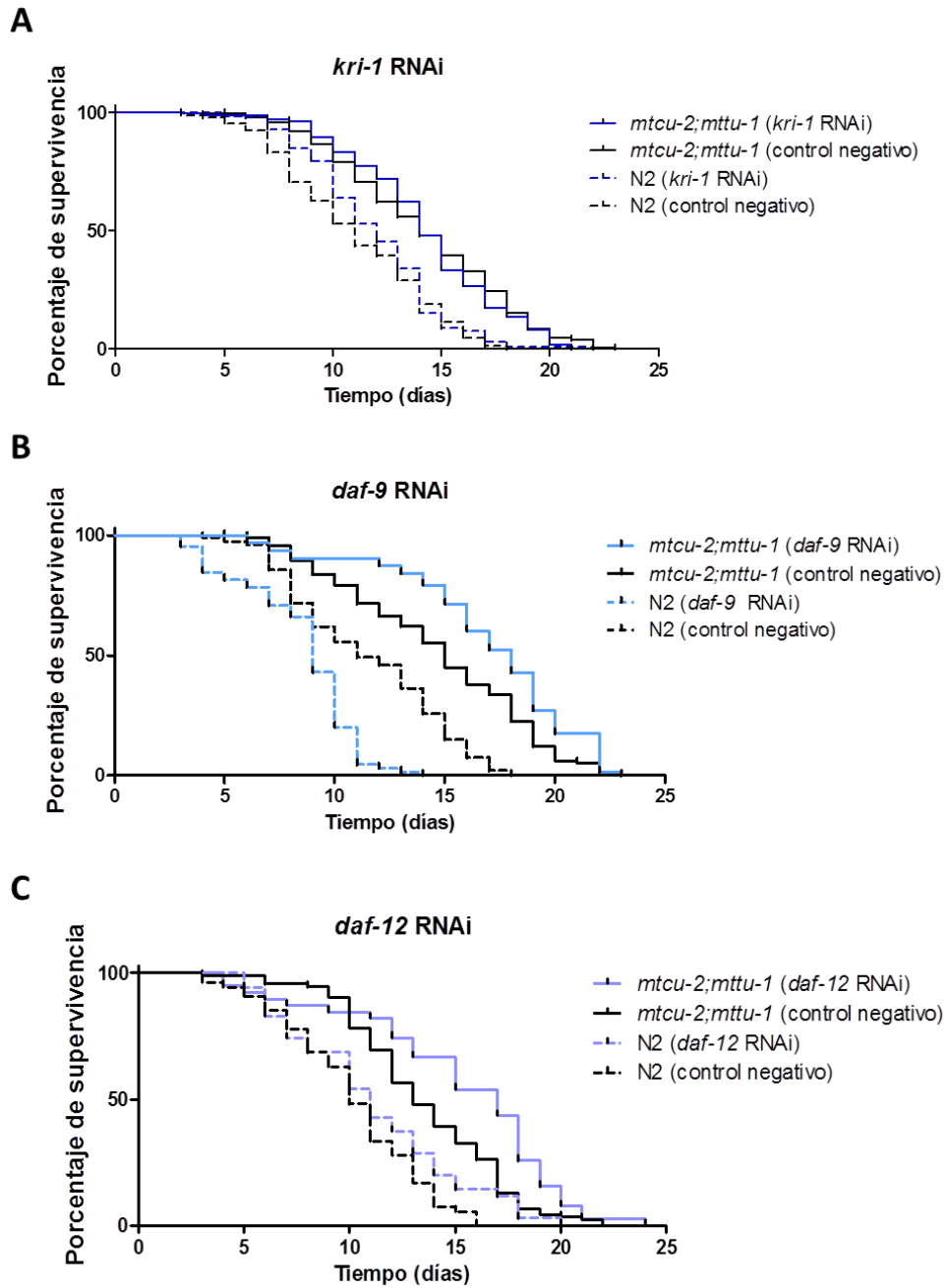


Figura R30. Efecto del silenciamiento independiente de *kri-1*, *daf-9* y *daf-12* en la supervivencia de la cepa *mtcu-2;mttu-1* a 25°C. (A) Silenciamiento de *kri-1* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. (B) Silenciamiento de *daf-9* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. (C) Silenciamiento de *daf-12* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

La respuesta diferencial de la cepa N2 y *mtcu-2;mttu-1* al mismo tipo de silenciamiento (*daf-9* y *daf-12*) sugiere que DAF-9 y DAF-12 y, por tanto, la ruta hormonal está implicada en la regulación de la supervivencia del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*.

11.4. Señalización mitocondrial

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la mitocondria juega un papel fundamental en la producción de ATP, en el metabolismo y la señalización. Parte de su función señalizadora se ejerce precisamente a través de la producción de ATP y la proteína AMPK (AMP-activated kinase) que se activa cuando hay un incremento en la ratio AMP/ATP, es decir niveles de ATP bajos en relación a los niveles de AMP. AMPK es un sensor del estado energético celular que, además de regular procesos celulares destinados a mantener la homeostasis energética, participa en la extensión de la longevidad como respuesta a inanición (Curtis et al. 2006; Artal Sanz and Tavernarakis 2009; Hardie 2011; Fukuyama et al. 2012; Lapierre and Hansen 2012; Yuan et al. 2013; Ulgherait et al. 2014). AAK-1 y AAK-2 son dos subunidades α -catalíticas de la proteína AMPK y regulan sus actividades (Apfeld et al. 2004). Como se ha mencionado en la introducción, una de las funciones de AMPK es la fosforilación de DAF-16 para favorecer su translocación al núcleo y, por tanto, su activación. Siendo DAF-16 un activador transcripcional de genes efectores que favorecen la extensión de la vida media, AMPK, a través de sus subunidades catalíticas, se desvela como otra vía de regulación de la longevidad en *C. elegans*. En esta Tesis, dado que en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* observamos un incremento de unas 5-veces en la ratio AMP/ATP (figura R14B), se han silenciado independientemente los genes *aak-1* y *aak-2* en la cepa salvaje N2 y en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* para estudiar las consecuencias sobre la longevidad. El silenciamiento de *aak-1* en la cepa salvaje provoca un ligero aumento en la vida media, aunque no en la vida máxima (*p-valor=0,04) (figura R31A). Curiosamente, el silenciamiento de *aak-1* en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* parece tener un aumento mayor que en la cepa salvaje (**p-valor=0,0001), sugiriendo que en este doble mutante pueden estar actuando simultáneamente una ruta de envejecimiento activada por el silenciamiento de *aak-1* pero independiente de la inactivación de *mtcu-2* y *mttu-1* y otra ruta dependiente de la inactivación de estos genes que está favorecida por el silenciamiento de *aak-1* (figura R31A). Por otra parte, el silenciamiento de *aak-2* en la cepa salvaje aumenta discretamente la longevidad a 25°C (figura R31B), lo que contrasta con

datos previos de otros autores en los que cepas con mutaciones en *aak-2* disminuían la vida media del organismo (Apfeld et al. 2004; Curtis et al. 2006). Desconocemos el motivo de esta contradicción, pero estos datos nos sugieren que la temperatura del ensayo, en nuestro caso 25°C, podría ser la responsable de las diferencias. Por otra parte, la naturaleza del ensayo también podría afectar, ya que la influencia sobre el metabolismo y la señalización que tienen las mutaciones knock-out sobre *C. elegans* es diferente a la que pueda tener un ensayo de silenciamiento. La inactivación por RNAi de *aak-2* en el mutante *mtcu-2;mttu-1* únicamente tiene un efecto positivo en la longevidad durante los primeros 15 días de silenciamiento, ya que finalmente no se detectan cambios significativos en su supervivencia al analizar la curva completa (figura R31B).

En conjunto, nuestros datos sugieren que AMPK participa en la regulación de la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1* a través de un mecanismo que implica, al menos, a la subunidad AAK-1, ya que el silenciamiento de *aak-2* para *mtcu-2;mttu-1* no ha ofrecido un resultado concluyente.

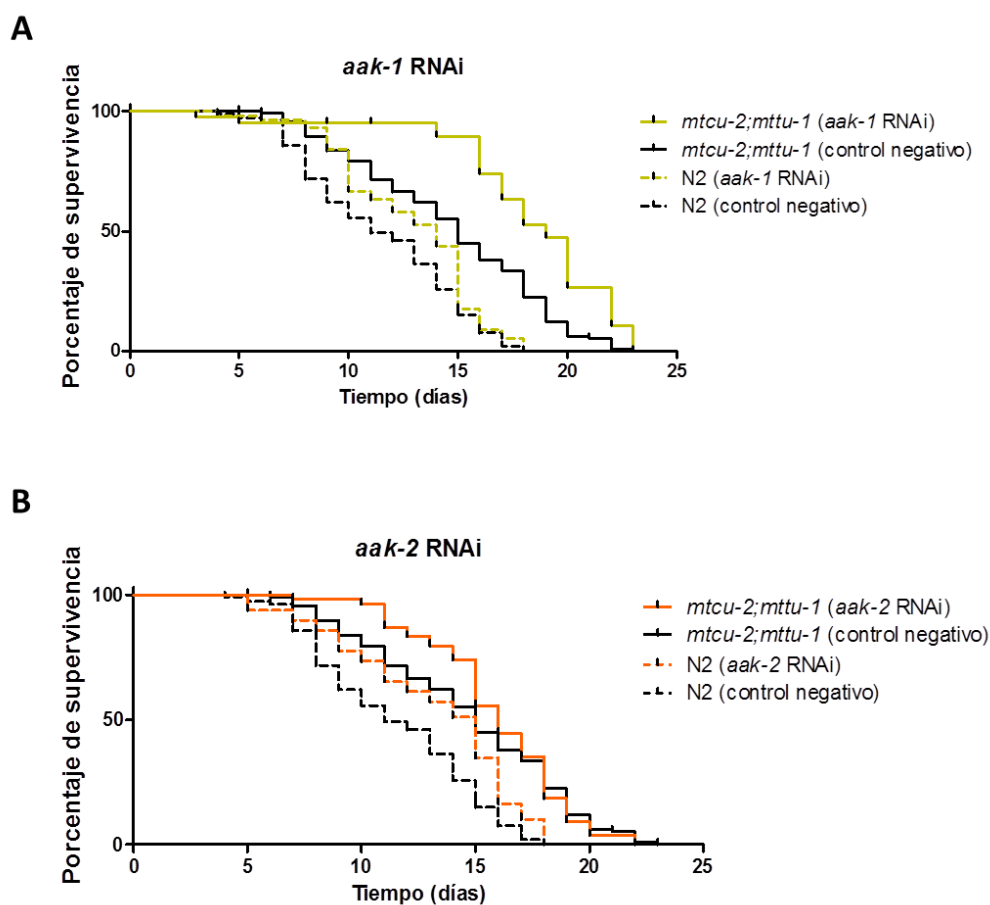


Figura R31. Efecto del silenciamiento independiente de *aak-1* y *aak-2* en la supervivencia de la cepa *mtcu-2;mttu-1* a 25°C. (A) Silenciamiento de *aak-1* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. (B) Silenciamiento de *aak-2* en las cepas N2 y *mtcu-2;mttu-1*. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

La mitocondria puede también regular la longevidad de *C. elegans* a través de la respuesta UPR^{mt} pues se ha observado que, paradójicamente, la disfunción mitocondrial extiende la longevidad (Jensen and Jasper 2014). A este respecto, se ha sugerido que la activación de UPR^{mt} tendría efectos protectores que redundarían en el beneficio de la longevidad. Como ya se ha comentado en la introducción, la inducción de las chaperonas *hsp-6* y *hsp-60* se toma como un marcador de la inducción de la respuesta UPR^{mt}. Aunque el nivel de *hsp-6* está reducido en los simples mutantes (figura R17), no sabemos qué ocurre en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* pues su infertilidad nos ha limitado la obtención de cantidades adecuadas de mRNAs para abordar un

detallado análisis transcriptómico. Por ello, decidimos analizar qué efecto tenía para la longevidad del doble mutante el silenciamiento de *hsp-6*. Como se observa en la figura R32, el silenciamiento de *hsp-6* provocó un aumento en la vida media tanto en la cepa salvaje como en el doble mutante. Estos resultados sugieren que la ausencia de esta chaperona podría promover la acción de proteasas mitocondriales, implicadas en la respuesta UPR^{mt} que promoviesen la activación de genes nucleares relacionados con la actividad o que aumentasen los niveles de la chaperona *hsp-60*, compañera de *hsp-6*, la cual intentaría suplir su falta. En cualquier caso, dado que el efecto del silenciamiento de *hsp-6* es similar en el doble mutante y en la cepa salvaje, no parece que la ruta de longevidad activada en el doble mutante esté afectada por el silenciamiento de *hsp-6*.

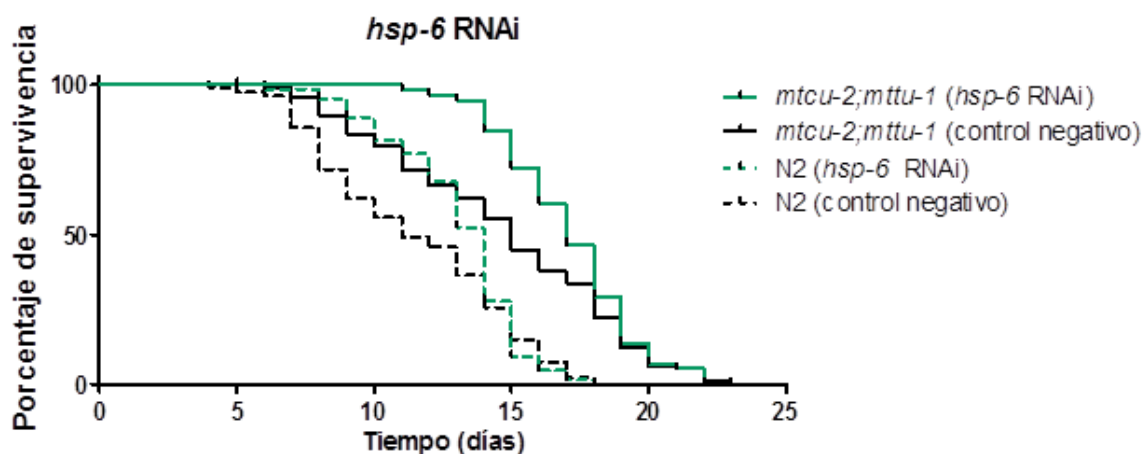


Figura R32. Efecto del silenciamiento de *hsp-6* en la supervivencia de N2 y *mtcu-2;mttu-1* a 25°C. Los datos estadísticos están en la tabla R3.

Resultados

Tabla R3. Datos estadísticos de los ensayos de silenciamiento y longevidad.

Cepa	RNAi	Vida media (días)	Vida máxima (días)	Muertes/ Total	Log-rank (Test Mantel Cox)	Test Gehan-Breslow-Wilcoxon
N2	-	11	16	153/167		
<i>mttu-1</i>	-	11	13	112/125	ns	ns
<i>mtcu-1</i>	-	11	13	104/118	ns	ns
<i>mtcu-2</i>	-	11	14	109/118	ns	ns
N2	-	9	16	43/45		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	-	16	23	77/81	***p=0,0001	***p=0,0001
<i>mttu-1;rf-1</i>	<i>mtcu-2</i>	13	22	98/110	***p=0,0001	***p=0,0001
	Control negativo	9	18	95/109		
<i>mttu-1;ppw-2</i>	<i>mtcu-2</i>	11	21	102/112	ns	ns
	Control negativo	12	19	113/121		
N2	<i>daf-2</i>	12	32	58/60	**p=0,006	ns
	Control negativo	10	16	51/54		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>daf-2</i>	15	26	68/74	***p=0,0008	*p=0,0427
	Control negativo	13	22	87/92		
N2	<i>daf-15</i>	12	20	73/81	ns	ns
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>daf-15</i>	16	22	64/79	ns	ns
	Control negativo	15	23	116/134		
N2	<i>ric-1</i>	15	27	65/72	***p=0,0001	***p=0,0001
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>ric-1</i>	18	23	51/68	***p=0,0003	***p=0,0001
	Control negativo	15	23	116/134		
N2	<i>daf-9</i>	9	14	65/65	***p=0,0001	***p=0,0001
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>daf-9</i>	18	23	63/63	***p=0,0008	***p=0,0007
	Control negativo	15	23	116/134		
N2	<i>daf-12</i>	11	20	35/40	ns	ns
	Control negativo	10	16	51/54		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>daf-12</i>	17	24	39/40	**p=0,0027	**p=0,0077
	Control negativo	13	22	81/92		
N2	<i>kri-1</i>	11	22	91/111	ns	ns
	Control negativo	12	18	148/167		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>kri-1</i>	14	21	129/132	ns	ns
	Control negativo	14	23	208/226		
N2	<i>aak-1</i>	14	18	56/57	*p=0,0476	*p=0,017
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>aak-1</i>	19	23	42/48	***p=0,0001	***p=0,0001
	Control negativo	15	23	116/134		
N2	<i>aak-2</i>	15	18	49/49	**p=0,0042	*p=0,0118
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>aak-2</i>	16	22	54/59	ns	ns
	Control negativo	15	23	116/134		
N2	<i>hsp-6</i>	14	18	65/66	ns	**p=0,0085
	Control negativo	11	18	94/113		
<i>mtcu-2;mttu-1</i>	<i>hsp-6</i>	17	22	58/63	*p=0,04	***p=0,0009
	Control negativo	15	23	116/134		

Discusión

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

Albert Einstein

Mutaciones en los genes humanos *MTU1*, *GTPBP3* y *MTO1* causan enfermedades OXPHOS cuyo mecanismo molecular permanece desconocido (Zeharia et al. 2009; Ghezzi et al. 2012; Kopajtich et al. 2014). En esta Tesis doctoral se ha abordado el estudio de los genes de *C. elegans* *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, identificados como los homólogos de *MTU1*, *GTPBP3* y *MTO1*, respectivamente, y se han descrito las consecuencias de su inactivación en este organismo modelo.

Los datos aquí presentados indican que los transcritos de los genes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* incluyen la secuencia señal que dirige a las correspondientes proteínas a la mitocondria, ya que su expresión heteróloga en levadura, como proteínas recombinantes fusionadas a GFP, revela su localización mitocondrial.

Trabajos previos han demostrado que las homólogas de MTTU-1, en levadura y humanos, y de MTCU-1 y MTCU-2 en *S. cerevisiae*, modifican los mt-tRNAs de sus respectivos organismos. Por lo tanto, estas proteínas eucarióticas, derivadas evolutivamente de la bacteria ancestral endosimbiótica que originó las actuales mitocondrias, ejecutan la misma función que sus homólogas, bien caracterizadas, de *E. coli*: la modificación de la U₃₄ de diversos tRNAs (Armengod et al. 2012; Armengod et al. 2015). Sin embargo, la identificación precisa del nucleósido (derivado de uridina) formado por las proteínas eucarióticas es complicada debido a las cantidades de tRNA requeridas por las técnicas actuales. Sólo en *S. cerevisiae* y *A. suum*, por las relativas facilidades que proporcionan para obtener cantidades suficientes de mt-tRNAs, se han podido identificar los derivados de uridina presentes en la posición 34 de los mt-tRNAs que son sustrato de las mencionadas enzimas (Sakurai et al. 2005; Umeda et al. 2005). En los mt-tRNAs humanos, se ha podido demostrar que la U₃₄ está tiolada por MTU1 mediante el uso de geles APM aunque el nucleósido preciso (supuestamente $\tau\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$) no ha podido ser revelado con esta técnica (Zeharia et al. 2009). Por otra parte, nuestro grupo ha utilizado recientemente el ensayo basado en la susceptibilidad de la digestión por angiogenina para demostrar que GTPBP3 es la responsable de la modificación en posición 5 de la U₃₄ en los mt-tRNAs humanos. Esta estrategia tampoco informa

de la naturaleza precisa de la modificación pero es útil para valorar la presencia de la misma (Martínez-Zamora et al. 2015).

En esta Tesis he descrito un procedimiento desarrollado en colaboración con el Prof. Dedon, basado en espectrometría de masas y, actualmente, en fase de optimización que previsiblemente nos permitirá conocer con exactitud las modificaciones de la U_{34} de los mt-tRNAs de *C. elegans* y saber si son las mismas que las descritas en *A. suum* ($cmnm^5s^2U$, $cmnm^5U$) o hay alguna que haya pasado desapercibida. La consecución de un método que permita la identificación y cuantificación de los nucleósidos presentes en los mt-tRNAs es importante, no solo para conocer los nucleósidos característicos de los mt-tRNAs de diferentes organismos, sino, también, para el diagnóstico de enfermedades asociadas con déficits de la modificación de los mt-tRNAs. Además, es importante para valorar cómo diferentes estados fisiológicos o patológicos (incluyendo situaciones de estrés y enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial como Alzheimer y Parkinson) repercuten en la modificación de los tRNAs y viceversa. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el estrés oxidativo producido por mutaciones MELAS (en el mt-tRNA^{Leu}(UUR)) activa una vía de señalización retrógrada que promueve la inducción de miR-9/9*, un microRNA que regula negativamente la expresión post-transcripcional de MTU1, GTPBP3 y MTO1, agravando así los síntomas de la enfermedad (Meseguer et al. 2014). Esto demuestra que una regulación a la baja de las enzimas modificadoras provocada por estrés oxidativo modula los síntomas de una enfermedad. Por ello, determinar el grado de modificación de los mt-tRNAs en enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial es importante para evaluar su contribución al fenotipo.

La puesta a punto del mencionado procedimiento no es una tarea fácil y, por ello, en esta Tesis he utilizado las dos estrategias “indirectas” mencionadas más arriba (geles APM y ensayo de angiogenina) para demostrar que las proteínas MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 de *C. elegans* controlan la modificación de la U_{34} en un subgrupo de mt-tRNAs. Hay que resaltar que, aunque la presencia de los nucleósidos $cmnm^5U$ y $cmnm^5s^2U$ se detectó en *A. suum*, las dificultades para hacer genética con este organismo han impedido obtener mutantes para demostrar qué genes están implicados en la síntesis de dichos nucleósidos. El uso de *C. elegans* nos ha permitido, por lo tanto, avanzar en este terreno y demostrar que MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 ejecutan un papel similar al de sus homólogas en *E. coli*, levadura y humanos, aunque MTTU-1 difiere de sus homólogas en los mt-tRNAs que reconoce. De hecho, el perfil de tiolación del mt-tRNA^{Leu} obtenido de un mutante *mttu-1* en un gel APM, indica que la proteína MTTU-1 es responsable de la tiolación

en la posición 2 de la U₃₄ de este mt-tRNA (figura R9A), mientras que el correspondiente tRNA^{Leu} en *E. coli* y mt-tRNA^{Leu} de levadura y humanos no está tiolado (Suzuki and Suzuki 2014; Armengod et al. 2015). Además, MTTU-1 no es capaz de reconocer el tRNA que descodifica Gln (figura R9B) mientras que el tRNA correspondiente en *E. coli* y mitocondrias de levadura y humanos sí que está tiolado por las homólogas de MTTU-1 (Suzuki and Suzuki 2014; Armengod et al. 2015). Estos datos sugieren que la capacidad de las proteínas de la familia MnmA/MTU1/MTTU-1 para reconocer los tRNAs substratos depende de las propiedades de éstos. La especial estructura de los mt-tRNAs de nematodos puede ser un elemento de identificación clave para la proteína MTTU-1.

En *A. suum*, mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Trp} están tiolados en la U₃₄, pero mt-tRNA^{Lys}, mt-tRNA^{Gln} y mt-tRNA^{Glu} no lo están (Sakurai et al. 2005). Nuestros datos indican que mt-tRNA^{Leu} está prácticamente tiolado en su totalidad (ya que en el gel APM se aprecia que la mayoría del tRNA migra de forma retrasada), mientras que el mt-tRNA^{Gln} no tiene s²U₃₄ (figura R9). Estos datos sugieren que MTTU-1 tiene el mismo patrón de reconocimiento de mt-tRNAs en *C. elegans* y *A. suum*.

Por otra parte, la ligeramente mayor sensibilidad frente a angiogenina del mt-tRNA^{Leu} procedente de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (figura R10) es probablemente debida a la ausencia de la modificación cmnm en la posición 5 de la U₃₄, lo que sugiere que ambas proteínas, MTCU-1 y MTCU-2, catalizan la síntesis de este grupo. Hay que reconocer, sin embargo, que la eficiencia del ensayo de angiogenina para determinar el estado de modificación de la U₃₄ es inferior a la observada con los tRNAs de *E. coli* y mt-tRNAs humanos (Martínez-Zamora et al. 2015). La causa principal de la deficiente digestión de los mt-tRNAs de *C. elegans* podría ser su peculiar estructura secundaria, ya que carecen del brazo T o D habitual de las estructuras secundarias de los tRNAs canónicos (Wolstenholme et al. 1987; Okimoto et al. 1992; Salinas-Giege et al. 2015).

Nuestros datos sugieren que tanto la inactivación de *mtcu-1* como la de *mtcu-2* confiere algo más de sensibilidad al mt-tRNA^{Leu} frente a la digestión por angiogenina (figura R10) y que, por tanto, ambos genes son conjuntamente responsables de la modificación en la posición 5 de la U₃₄, tal como ya se ha visto con sus homólogos en *E. coli* y levadura (Colby et al. 1998; Cabedo et al. 1999; Scrima et al. 2005; Umeda et al. 2005; Yim et al. 2006; Moukadiri et al. 2009; Wang et al. 2010). Además, en esta Tesis hemos visto que el fenotipo de las cepas *mtcu-1* y *mtcu-2* es similar en cuanto al defecto OXPHOS (figura R12, R13 y R14), y a la fertilidad (figura R21). Por tanto, es razonable concluir que MTCU-1 y MTCU-2 se comportan igual que sus homólogas procariontas y

formarán un complejo enzimático responsable de la incorporación del grupo cmnm^5 a la U_{34} , según el esquema que propusimos en nuestra hipótesis de partida (figura R8).

Nuestros datos también sugieren independencia de MTTU-1 respecto a la acción de MTCU-1 y MTCU-2, ya que la inactivación de MTCU-1 o MTCU-2 no interfiere en la tiolación del mt-tRNA^{Leu} (figura R9). Es decir, este mt-tRNA es modificado en la posición 2 de la U_{34} aunque la posición 5 no esté modificada. En este aspecto, hay coincidencia en la forma de actuar de MTTU-1 respecto a sus homólogas en *E. coli* y levadura pues éstas también actúan independientemente de las homólogas de MTCU-1 y MTCU-2 (Elseviers et al. 1984; Sullivan et al. 1985; Umeda et al. 2005).

Cabe destacar que las mutaciones *mttu-1* y *mtcu-1/mtcu-2* promueven la alteración de los niveles de mt-tRNA^{Leu} y mt-tRNA^{Gln}, ya que los análisis Northern claramente indican que hay una acumulación de estos mt-tRNAs en las cepas *mtcu-1* o *mtcu-2* y una disminución de su nivel en la cepa *mttu-1* (figura R11). Estos datos sugieren que la ausencia de la modificación introducida por MTCU-1 y MTCU-2 activa una señalización retrógrada al núcleo que resulta en un aumento de la transcripción del genoma mitocondrial o que promueve la estabilización de ciertos transcritos de este genoma, como sería el caso de los mt-tRNAs. En cambio, la disminución de los niveles de ambos mt-tRNAs en la cepa *mttu-1* (que no puede atribuirse a un número menor de copias de mt-DNA; figura R15) sugiere que hay una señalización retrógrada de signo opuesto a la que sucedería para los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, ya que observamos una disminución tanto en un mt-tRNA que es sustrato de MTTU-1 (mt-tRNA^{Leu}) como de un tRNA que no lo es (mt-tRNA^{Gln}). Este comportamiento diferencial de los mutantes *mtcu-1/mtcu-2* y *mttu-1* revela que el déficit de las modificaciones en las posiciones 5 y 2 de la U_{34} promueve respuestas celulares diferentes como, efectivamente, encontramos al examinar otros caracteres fenotípicos (ver más abajo). La acumulación de mt-tRNAs en las cepas *mtcu-1* y *mtcu-2* podría relacionarse con un mecanismo destinado a compensar el déficit de la modificación cmnm^5 ya que en levadura y *E. coli* se ha demostrado que la sobreexpresión de ciertos tRNAs puede compensar algunos fenotipos causados por mutaciones que afectan a la modificación de la U_{34} (Brégeon et al. 2001; Esberg et al. 2006; Bjork et al. 2007; Leidel et al. 2008).

En esta Tesis, también hemos estudiado las consecuencias que la ausencia de modificación de la U_{34} tiene en el fenotipo de *C. elegans*. A pesar de que los tres simples mutantes, *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*, presentan una tendencia similar en cuanto a una gran parte de los rasgos fenotípicos analizados, es posible diferenciar los efectos de *mttu-1*, por un lado, de los de *mtcu-1* y *mtcu-2*, por otro. La cepa *mttu-1* presenta un fenotipo más grave en cuanto a fertilidad (más reducida) y ciclo reproductivo (más largo), exhibiendo, además, estos dos rasgos una clara termosensibilidad (figura R21 y R22). Curiosamente, al examinar la acumulación de determinadas subunidades OXPHOS, detectamos una disminución de la correspondiente al complejo I en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* pero no encontramos cambios significativos en las subunidades OXPHOS examinadas en el mutante *mttu-1* (figura R12). Sin embargo, esto no significa que no haya un problema en el funcionamiento del sistema OXPHOS en *mttu-1* pues podría ocurrir que aunque el nivel cuantitativo de las proteínas examinadas no varíe, la actividad de las mismas sí que estuviera afectada debido a una incorporación errónea de aminoácidos durante la traducción mitocondrial. De hecho, al comparar el potencial de membrana mitocondrial en los tres mutantes simples encontramos que está igualmente afectado (figura R13), lo que sugiere que el bombeo de protones al espacio intermembrana promovido por alguno(s) de los complejos responsables del mismo (complejos I, III y IV) no está funcionando correctamente. En conjunto, estos resultados sugieren que las señales activadas por el déficit de MTTU-1 pueden ser diferentes a las provocadas por el déficit de MTCU-1 o MTCU-2, teniendo también unas consecuencias diferentes a nivel de organismo (i.e. fertilidad y ciclo reproductivo). Pistas que sustentan estas diferencias pueden encontrarse en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial, dada la estrecha relación que hay entre el funcionamiento del sistema OXPHOS y el ciclo TCA, y la respuesta al estrés que supone una disfunción del sistema OXPHOS. Analizamos estas pistas a continuación.

Debido a que las 12 proteínas codificadas por el mtDNA de *C. elegans* pertenecen al sistema OXPHOS, es lógico pensar que su síntesis puede estar afectada por la hipomodificación de la U_{34} de los mt-tRNAs, lo que puede derivar en una perturbación del ensamblaje de los complejos OXPHOS y del funcionamiento de la ETC. Por este motivo, hemos estudiado los niveles estacionarios de algunas subunidades de los complejos I, IV y V por transferencia Western. Nuestro estudio muestra que las deleciones en *mtcu-1* y *mtcu-2* tienen consecuencias directas en la

síntesis o el ensamblaje del complejo I, puesto que se detecta una reducción significativa de los niveles estacionarios de NUO-2 (NADH Ubiquinone Oxidoreductase). Al ser ésta una subunidad del complejo I codificada por el núcleo y no por la mitocondria, cabe preguntarse por qué la falta de MTCU-1 o MTCU-2 provoca la disminución de NUO-2 y, sin embargo, no afecta los niveles de la proteína CTC-1 (subunidad del complejo IV) codificada por el mtDNA, teóricamente más susceptible de ser directamente afectada por la hipomodificación de los mt-tRNAs. Se sabe que en *E. coli*, la inactivación de las homólogas de MTCU-1 y MTCU-2 promueve cambios en la pauta de lectura de mRNAs debido a “deslizamientos” del ribosoma en regiones con características que requieren el uso de tRNAs modificados para su correcta lectura (Brégeon et al. 2001; Urbonavicius et al. 2001). De las 12 proteínas OXPHOS codificadas por el mtDNA, 7 pertenecen al CI, lo que podría explicar que este complejo sea el más afectado en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*. Además, la expresión de algunas de estas subunidades podría ser más sensible a la hipomodificación de los mt-tRNAs si contuvieran las “señales internas” que promueven el “deslizamiento” del ribosoma y el cambio en la pauta de lectura y cuyas características (en los mt-tRNAs) son, desgraciadamente, poco conocidas (Temperley et al. 2010). La síntesis defectuosa de subunidades del complejo I codificadas por el mtDNA podría interferir con el ensamblaje del complejo I y promover la degradación de subunidades no ensambladas. Tal podría ser el caso de NUO-2, explicando así la disminución de su nivel en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*.

Células o tejidos de pacientes con mutaciones puntuales en *MTO1* o *GTPBP3* (homólogos de *mtcu-2* y *mtcu-1*, respectivamente) muestran un déficit combinado de las actividades OXPHOS, especialmente, de los complejos I y IV (Ghezzi et al. 2012; Baruffini et al. 2013; Kopajtich et al. 2014), que ha sido asociado con un defecto en la traducción mitocondrial (Kopajtich et al. 2014; Martínez-Zamora et al. 2015; Tischner et al. 2015). Como las mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2* producen una reducción significativa en los niveles estacionarios de NUO-2 (CI), esperaríamos una pérdida de actividad del CI y una disfunción de la cadena de transporte de electrones (ETC), así como una disminución en los niveles de ATP. De hecho, así ocurre en un modelo celular en el que se silencia permanentemente *GTPBP3*, donde se aprecia una reducción del 50% en la actividad del complejo I y en los niveles de ATP (Martínez-Zamora et al. 2015). Sin embargo, la determinación de la producción de ATP en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* indica que no hay afectación en relación a la cepa salvaje (figura R14). Los niveles normales de ATP detectados en nuestros mutantes sugieren que la actividad de complejo I, supuestamente disminuida por los

bajos niveles de la subunidad NUO-2, podría estar compensada por un flujo alternativo de electrones, en la forma de FADH₂, al sistema OXPHOS a través del CII o de las ETFs (flavoproteínas de transporte de electrones), que pudiera compensar el defecto del CI y promover la síntesis de ATP; si bien el CII, al no bombear protones al espacio intermembrana (figura I4) durante su funcionamiento, no sería capaz de compensar en ese sentido el defecto del CI ni, por tanto, de normalizar el potencial de membrana mitocondrial que muestra una reducción del 25% en el mutante *mtcu-2* (figura R13).

Por otra parte, las cuantificaciones del nivel de expresión de los mensajeros de genes implicados en diferentes rutas metabólicas mitocondriales encargadas de la producción de equivalentes reducidos (NADH y FADH₂) sugieren que existe una reprogramación metabólica en los mutantes simples *mtcu-2* y *mtcu-1* que puede contribuir a activar el CII (figura D1). En estos mutantes, la vía de la glicólisis y la de la β-oxidación (que conducen a la producción de acetil-CoA – sustrato del ciclo del TCA) parecen estar reguladas negativamente, ya que detectamos una disminución en los niveles de mRNA de enzimas implicados en las mismas (*pfk-1.1* y *ldh-1* de la glicólisis y *acs-17* y *acdh-12* de la oxidación de ácidos grasos) (figuras R18 y R19). Hemos observado que, por el contrario, la expresión del gen codificante de la actividad glutaminasa está incrementada en dichos mutantes (figura R20). La degradación de la glutamina, produce amonio y glutamato, y éste último puede transformarse en 2-oxoglutarato, un intermediario del ciclo del TCA. Consecuentemente, pensamos que, en estos mutantes simples, las rutas anapleróticas como las que implican la degradación de aminoácidos, están funcionando para abastecer al ciclo del TCA con intermediarios, compensando la posible disminución del acetil-CoA procedente de la glicólisis o de la oxidación de ácidos grasos. Además, en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, encontramos una mayor expresión del mRNA de UCP-4, una proteína desacopladora relacionada con la función del CII pues importa succinato a la mitocondria (Pfeiffer et al. 2011). El succinato importado a la mitocondria por UCP-4 podría proceder del ciclo del glioxilato, activo en *C. elegans* (Liu et al. 1995), en el cual se obtiene succinato y malato a partir de isocitrato.

Recientemente, nuestro grupo ha encontrado que el silenciamiento estable de *GTPBP3* (homóloga humana de MTCU-1) en células humanas también provoca cambios en el metabolismo mitocondrial que, aunque diferentes a los encontrados en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* en esta Tesis, también afectan a las rutas de abastecimiento del ciclo del TCA como elemento clave para

proporcionar equivalentes reducidos al sistema OXPHOS (Martínez-Zamora et al. 2015). En este aspecto, ambos trabajos son pioneros en la demostración de la reprogramación metabólica inducida por la hipomodificación de la U₃₄ de los mt-tRNAs. Es, sin embargo, importante señalar que los mecanismos compensatorios activados en el modelo celular humano (células shGTPBP3) no son capaces de restablecer los niveles de ATP y que el fenotipo observado en pacientes portadores de mutaciones *GTPBP3* o *MTO1* es mucho más grave que el observado en los modelos de *C. elegans*. Por tanto, parece que el mecanismo adaptativo que se activa en el nematodo es más eficaz a la hora de asegurar un funcionamiento del sistema OXPHOS. ¿Cuáles son las diferencias? En el modelo celular humano (shGTPBP3), los datos indican que hay una activación transcripcional de genes implicados en glicólisis y β -oxidación de los ácidos grasos, un incremento de la proteína UCP2 (perteneciente a la misma familia que las proteínas UCP4 pero con diferente función) y una disminución del transportador de piruvato (Martínez-Zamora et al. 2015). La proteína UCP2 está implicada en la exportación del malato y oxalacetato fuera de la mitocondria (Vozza et al. 2014). La exportación del oxalacetato puede hacer ineficaz cualquier ruta anaplerótica que proporcione acetil-CoA (ya que éste requiere de oxalacetato para producir citrato y “cerrar” el ciclo del TCA (figura I13 y tabla I3). La disminución del transportador del piruvato, estando la glicólisis aumentada, puede conducir a la producción de lactato y acidosis láctica, característica de los pacientes con mutaciones en *GTPBP3* y *MTO1*. Además, un desacoplamiento entre glicólisis y fosforilación oxidativa como el que se observa en el modelo de las células shGTPBP3 se ha mostrado que es especialmente perjudicial para el corazón (Fillmore and Lopaschuk 2013). En consecuencia, como se ha dicho arriba, parece que la reprogramación metabólica en *C. elegans*, implicando el transporte de succinato a la mitocondria por la única proteína UCP presente en nematodos (UCP-4) y una disminución de la glicólisis, permite a los simples mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* compensar mejor los efectos de la hipomodificación de los mt-tRNAs.

Habitualmente, la disfunción mitocondrial ha sido asociada a problemas de fertilidad y detención del desarrollo (Tsang et al. 2001; Artal Sanz et al. 2003; Rea et al. 2007). Los mutantes simples *mtcu-1* y *mtcu-2* muestran una pequeña reducción en el número de descendientes (figura R21), pero los gusanos crecen con normalidad y tienen un aspecto saludable. Es, por lo tanto, posible que la activación de diversas rutas de señalización retrógrada, promotoras de un incremento en los niveles de mt-tRNAs y de los cambios en el ciclo del TCA y de la activación del

complejo II, sean también responsables del suave fenotipo (en relación a la fertilidad y el desarrollo) que presentan los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*.

Por su parte, el mutante simple *mttu-1*, que carece de la tiolación en la posición 2, presenta un fenotipo más grave, ya que la reducción en su fertilidad es más drástica que la de los simples mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* y también presenta un ciclo reproductivo más largo (figura R21 y figura R22). Ambos rasgos fenotípicos resultan termosensibles en el mutante *mttu-1* pues se agravan a 25°C, una temperatura más restrictiva. Curiosamente, en este mutante no hemos detectado alteración en los niveles estacionarios de las subunidades OXPHOS analizadas ni en los niveles estacionarios de ATP aunque sí hemos encontrado una disminución en el potencial de membrana similar a la observada en la cepa *mtcu-2* (figuras R13). En células de pacientes portadores de algunas mutaciones *MTU1* o en líneas celulares humanas silenciadas para *MTU1* tampoco se observaron alteraciones en la síntesis mitocondrial de proteínas (Sasarman et al. 2011). Sin embargo, las células de pacientes *MTU1* presentan un defecto combinado de los complejos OXPHOS y, por lo general, son las actividades de los complejos I y IV las afectadas (Zeharia et al. 2009; Schara et al. 2011), por lo que se sospecha que aunque pueda no ser visible una alteración cuantitativa de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, éstas podrían no ser funcionalmente activas al haber incorporado aminoácidos incorrectos durante su síntesis. Esta hipótesis no está comprobada experimentalmente por lo que el mecanismo molecular que subyace a la enfermedad permanece sin aclarar. En cualquier caso, dada la contribución del grupo tiol de la U₃₄ al mantenimiento de la pauta de lectura del mRNA (Urbonavicius et al. 2001), parece razonable asumir que la traducción mitocondrial estará afectada en algún grado en el mutante *mttu-1* de *C. elegans* y que esta alteración, al igual que hemos propuesto para los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, activará rutas de señalización retrógrada que tratarán de compensar la situación.

Creemos, sin embargo, que las señales retrógradas que se generan en la cepa *mttu-1* son, al menos parcialmente, diferentes a las producidas por las mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2*. Prueba de ello sería el hecho, ya mencionado, de que el nivel estacionario de los mt-tRNAs analizados esté disminuido, al contrario de lo que observamos en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (figura R11), sin que tal disminución pueda atribuirse a un menor número de copias de mtDNA (figura R15). Además, observamos que la expresión del gen *hsp-60* disminuye aproximadamente un 50% en el mutante *mttu-1*, mientras aumenta entre un 30 y un 50% en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (figura

R17). La expresión de *hsp-60*, igual que la de *hsp-6*, se ha relacionado con una mejor resistencia a situaciones de estrés (Benedetti et al. 2006; Haynes et al. 2007; Haynes and Ron 2010; Bennet et al. 2014). La expresión de *hsp-6* está regulada a la baja en los mutantes *mtcu-1*, *mtcu-2* y *mttu-1*, aunque más en este último (figura R17). El hecho de que tanto la transcripción de *hsp-6* como la de *hsp-60* esté reducida en el mutante *mttu-1* podría explicar sus fenotipos termosensibles (fertilidad y longitud del ciclo reproductivo), pues un aumento de la temperatura podría ser un estrés que *mttu-1* no podría afrontar debido precisamente a la menor expresión de tales genes, mientras que la inducción de *hsp-60* en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* les permitiría soportar mejor dicho estrés.

Las proteínas *hsp-6* y *hsp-60* están implicadas en la respuesta de “proteínas mal plegadas” mitocondrial o UPR^{mt} que está regulada por la acción de diversas proteasas mitocondriales (Haynes and Ron 2010; Jensen and Jasper 2014). Aunque las rutas de regulación y su mecanismo concreto no ha sido completamente dilucidado, parece que la acumulación de proteínas que supera la capacidad de plegamiento de las chaperonas mitocondriales permite la actividad de la proteasa ClpP y la formación de péptidos señalizadores que dan como resultado de su acción la inducción de *hsp-6* y *hsp-60*. Tal inducción es, pues, un marcador de la respuesta UPR^{mt} y es sorprendente que en mutantes en los que se espera un problema en la traducción mitocondrial de proteínas y un ensamblaje deficiente de complejos OXPHOS nos encontremos con una expresión reducida de *hsp-6*, solo compensada aparentemente por la inducción de *hsp-60* en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*. Actualmente desconocemos la razón por la que tanto *hsp-6* y *hsp-60* están regulados a la baja en la cepa *mttu-1* y experimentos adicionales deberán abordar esta cuestión en el futuro. Baste ahora la observación de este patrón diferencial en la expresión de los genes *hsp-6* y *hsp-60* para permitirnos sustentar la propuesta de que la señalización retrógrada provocada por la mutación *mttu-1* es diferente de la provocada por las mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2*.

También hemos observado en el mutante *mttu-1* un mayor incremento en la activación transcripcional de *ucp-4* (casi de 3 veces) en comparación con el incremento observado en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (aproximadamente de un 50%; figura R16). El funcionamiento del complejo II promovido por UCP-4, al igual que hemos propuesto en el caso de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, explicaría los niveles normales de ATP observados en el mutante *mttu-1* a pesar de la ligera disminución en los niveles del potencial de membrana, quizá asociada a un funcionamiento ineficiente de alguno de los complejos que bombean protones.

Si el mayor incremento en la expresión de UCP-4 en el mutante *mttu-1* implicase una desregulación en los niveles de succinato entre los compartimentos subcelulares, convendría tener presente que se ha demostrado que el succinato es un regulador de la epigenética del genoma nuclear (Salminen and Kaarniranta 2012) y, por lo tanto, sería un buen candidato a la hora de buscar explicaciones para las diferencias entre mutantes *mttu-1* y *mtcu-1* y *mtcu-2*.

Respecto a la expresión de los genes implicados en las rutas metabólicas, el comportamiento del mutante *mttu-1* sigue la pauta de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* ya que observamos una disminución en la expresión de genes de la glicólisis y oxidación de ácidos grasos, frente a un incremento en la expresión del gen implicado en glutaminólisis, si bien la disminución en la expresión de los genes glicolíticos y de la lipólisis es mayor en el mutante *mttu-1* (figura R18, R19 y R20). En consecuencia, parece que la reprogramación del ciclo del TCA en el mutante *mttu-1* va en la misma dirección que la propuesta para los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (figura D1) aunque el hecho de que la reducción en la expresión de los genes mencionados sea mayor puede tener efectos colaterales diferentes si los umbrales de expresión tienen consecuencias reguladoras, como hemos propuesto anteriormente para el succinato.

Según los datos obtenidos, concluimos que *C. elegans* es un modelo útil para estudiar enfermedades asociadas con la hipomodificación de los tRNAs mitocondriales, permitiendo estudiar las respuestas adaptativas que se disparan, las rutas de señalización subyacentes y los sistemas de retroalimentación (o círculos viciosos) que pueden generarse y contribuir al empeoramiento del fenotipo. Poco se sabe de estos procesos en humanos y es posible que no ocurran necesariamente de la misma manera que en *C. elegans*; sin embargo, los datos obtenidos con este organismo modelo pueden ayudar a comprender las reprogramaciones metabólicas que produce la hipomodificación de los mt-tRNAs y a enfocar la investigación en humanos.

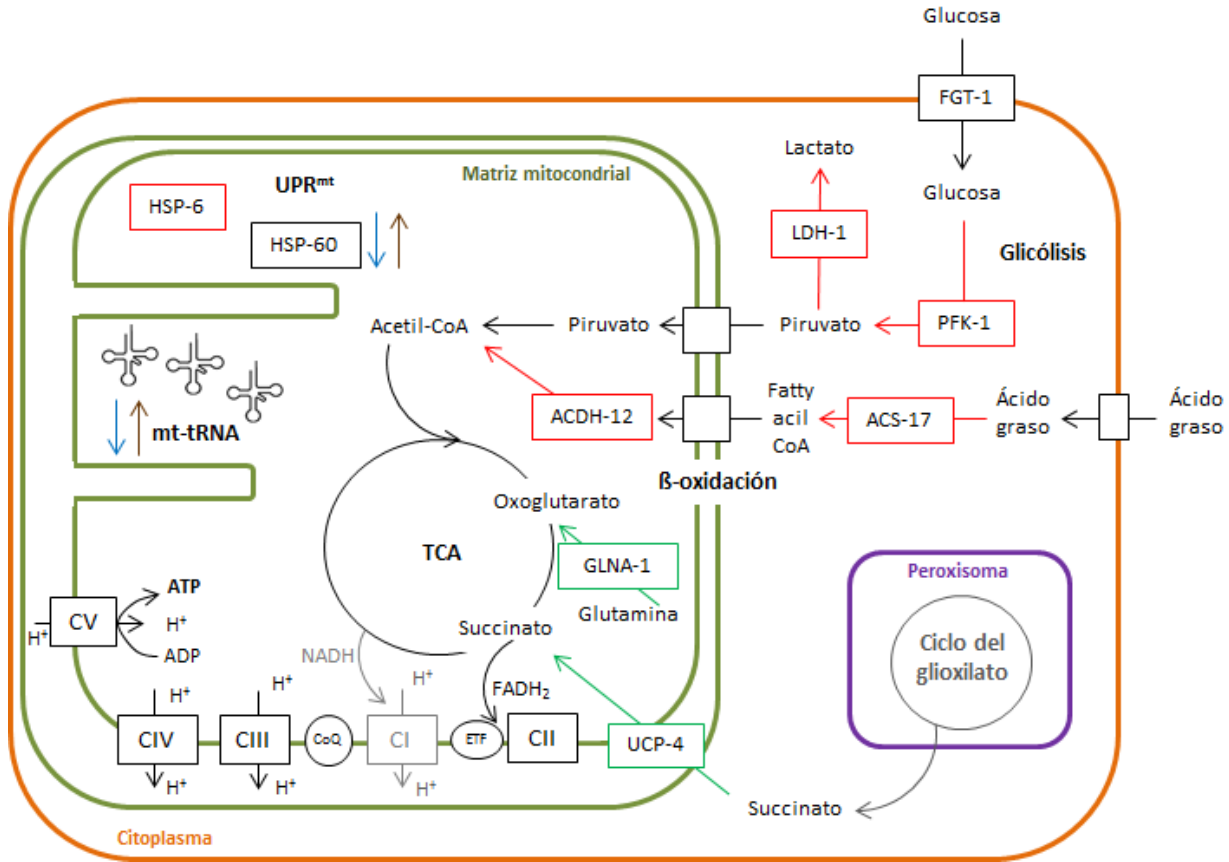


Figura D1. Metabolismo mitocondrial en los mutantes simples *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans*. En la imagen se indican las principales rutas metabólicas de la célula (glicólisis, oxidación de ácidos grasos y ciclo del TCA) y el sistema OXPHOS pero también otras respuestas mitocondriales a situaciones de estrés (respuesta UPR^{mt}, niveles de mt-tRNAs) y una vía alternativa (ciclo del glioxilato). La célula está coloreada en naranja, la mitocondria en verde y el peroxisoma en morado. En rojo se indican aquellas funciones reguladas negativamente según nuestro estudio y en verde aquellas reguladas positivamente. En gris se muestran rutas o situaciones hipotéticas (la disfunción de CI o la acción del ciclo del glioxilato). Dos flechas azules indican una respuesta propia del simple mutante *mttu-1* (la regulación a la baja de la chaperona mitocondrial *hsp-60* y los bajos niveles de mt-tRNAs). Dos flechas marrones indican la respuesta diferencial de los simples mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* (la regulación positiva de la chaperona mitocondrial *hsp-60* y la acumulación de mt-tRNAs). Ya que la entrada de electrones en la ETC se produce tanto por el complejo I como el II, en este esquema se ha representado el complejo II en el extremo de la ETC próximo a UCP-4 para indicar que la actividad del CII podría estar regulada por los niveles de UCP-4.

Interesantemente, la combinación de las mutaciones *mttu-1* y *mtcu-2* produce un efecto sinérgico que se detecta tanto a nivel molecular como del organismo completo. Así, hemos encontrado: (1) que mientras la ratio AMP/ATP no está afectada en los mutantes simples, incrementa aproximadamente 5 veces en el doble mutante (figura R14), (2) que aunque no se aprecia un efecto en los niveles estacionarios de la proteína CTC-1/COX-1 (complejo IV) en los mutantes simples, su acumulación está severamente afectada en el doble mutante (figura R12) y (3) que la inactivación simultánea de ambos genes produce letalidad (en experimentos de silenciamiento génico) y esterilidad completa (figuras R23 y R24). Este efecto sinérgico correlaciona bien con resultados obtenidos en *E. coli* y levadura donde se ha establecido que la combinación de mutaciones que inactivan los genes homólogos produce letalidad en determinadas condiciones de crecimiento (Umeda et al. 2005; Wang et al. 2010; Armengod et al. 2015). Además de los efectos sinérgicos mencionados, en el doble mutante también se aprecia una mayor afectación de rasgos fenotípicos que ya están alterados en los simples mutantes. Por ejemplo, los niveles estacionarios de la proteína NUO-2, afectados en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* pero no en el mutante *mttu-1*, y el potencial de membrana están severamente disminuidos en la cepa *mtcu-2;mttu-1* (figura R12 y R13). En conjunto, todos estos resultados indican, por primera vez en un modelo animal, que la inactivación simultánea de MTCU-2 y MTTU-1 produce una grave disfunción mitocondrial que altera profundamente las rutas de señalización a nivel celular y tisular de forma que los mecanismos adaptativos que se inducen en cada uno de los mutantes simples son claramente incapaces de garantizar la descendencia del organismo.

Según se ha mencionado con anterioridad, existen diversos estudios en *C. elegans* en los que se ha relacionado la disfunción mitocondrial con anomalías en fertilidad, desarrollo y longevidad (Tsang et al. 2001; Ventura et al. 2006; Rea et al. 2007). El doble mutante *mtcu-2;mttu-1* presenta una severa disfunción mitocondrial que resulta en letalidad embrionaria, detención del desarrollo en estadios larvarios tempranos y una esterilidad completa, ya que no es capaz de poner ningún huevo y carece tanto de oocitos maduros como de esperma (figura R24). La inactivación simultánea de *mttu-1* y *mtcu-2* en el tejido somático es la responsable de los problemas en el desarrollo del gusano en estadios tempranos y la inactivación en el tejido germinal e intestino provoca esterilidad (figura R27). Ambos efectos son “cell autonomous”, es decir, la inactivación de *mttu-1* y *mtcu-2* en el tejido somático genera dificultades en el desarrollo de los tejidos somáticos, mientras que la inactivación simultánea de ambos genes en el tejido

germinal repercute específicamente en este tejido, impidiendo el correcto desarrollo de las células germinales. Sin embargo, la mayor longevidad exhibida por el doble mutante está claramente relacionada con un efecto que se irradia desde la línea germinal e intestino al resto del organismo (figura R26).

Para investigar qué rutas participan activamente en la señalización que promueve la longevidad en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* he realizado un amplio estudio de silenciamiento por alimentación con RNAi. Según se ha indicado en la introducción, existen diversas rutas metabólicas que controlan la vida media en *C. elegans*, como son la señalización por insulina, por restricción calórica (o TOR), por línea germinal, por hormonas o esteroides y por mitocondria (Dillin et al. 2002; Jia et al. 2002; Haynes and Ron 2010; Lapierre and Hansen 2012). En un gran número de ocasiones, aunque no siempre, todas estas rutas confluyen en el factor de transcripción DAF-16, cuya translocación al núcleo regula un gran número de genes implicados en el alargamiento de la vida media (Dillin et al. 2002; Mukhopadhyay and Tissenbaum 2006; Yen et al. 2011; Lapierre and Hansen 2012). Esta translocación depende de su estado de fosforilación, mediado por quinasas de diferentes rutas de señalización y de una interacción, aún por determinar con exactitud, con receptores nucleares como DAF-12 (Jia et al. 2002; Yen et al. 2011; Dumas et al. 2013). Además, existen otras proteínas, como KRI-1, que pueden favorecer la activación de DAF-16 aunque se desconoce el mecanismo molecular que utilizan para lograrlo (Berman and Kenyon 2006). Las figuras I16, I17 e I18 de la introducción muestran como diferentes rutas de señalización de longevidad confluyen en DAF-16, resultando ser éste un factor de transcripción común de estas vías.

La ruta de activación mejor conocida de DAF-16 es la de la insulina, iniciada cuando se inhibe el receptor de insulina DAF-2. En este trabajo hemos demostrado que esta vía de señalización por insulina no está directamente implicada en la longevidad de *C. elegans* al menos desde su inicio (*daf-2*) (figura R28), como tampoco lo está la ruta mediada por TOR (figura R29). A pesar de que la respuesta UPR^{mt} tampoco parece ser responsable directa de la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1* en *C. elegans* (figura R32), sí hemos demostrado que la mitocondria participa en la señalización de la longevidad (R31). Como se ha mencionado anteriormente, la ratio AMP/ATP en el doble mutante es 5 veces superior a la de la cepa salvaje, lo que presumiblemente conducirá a la activación de la proteína sensora del estado energético celular, AMPK. La proteína

AMPK activada es capaz de fosforilar DAF-16 y así promover su translocación al núcleo donde llevará a cabo su función (Greer et al. 2007; Yen et al. 2011). Curiosamente, el silenciamiento de *aak-1* en el doble mutante extiende aún más su longevidad y tiene un efecto mayor que el producido por el silenciamiento en la cepa salvaje (figura R31). Esto sugiere que la inactivación funcional de AAK-1 facilita la expresión de una ruta de señalización que promueve la longevidad en el doble mutante. Indudablemente, la regulación de la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1* debe ser compleja, ya que la vía de señalización por hormonas (relacionada a su vez con el tejido germinal), también parece estar implicada. El silenciamiento de *daf-9* y *daf-12*, genes que codifican para proteínas de la ruta de señalización por esteroides, también contribuye a extender aún más la longevidad del doble mutante *mtcu-2;mttu-1*, produciendo un incremento sobre la misma mayor que el observado en la cepa salvaje (figura R30). Por tanto, la inactivación de AMPK (al menos de la subunidad AAK-1) o, alternativamente, la inactivación de la señalización a través de DAF-9/DAF-12 favorecen (en lugar de mermar) la longevidad del doble mutante. De esta manera, nuestros resultados indican que tanto la disfunción mitocondrial como la esterilidad están señalizando para extender la vida media del doble mutante. Es difícil aventurar el mecanismo de longevidad que subyace en este mutante pero bien podría implicar una competencia entre la señalización por AMPK y la dependiente de DAF-9/DAF-12 para translocar DAF-16 al núcleo. La inactivación de AMPK facilitaría la señalización por DAF-9/DAF-12 y viceversa, la inactivación de DAF-9/DAF-12 facilitaría la acción de AMPK. La figura D2 representa la competencia de ambas rutas como mecanismo de longevidad en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1*.

En la cepa salvaje, se ha propuesto que la línea germinal correctamente desarrollada envía señales que inhiben DAF-9 y, consecuentemente, esta proteína no puede sintetizar el ácido dafacrónico, activador de DAF-12, por lo que los efectos de esta ruta (directos o a través de DAF-16) para activar genes de longevidad quedan bloqueados (Mukhopadhyay and Tissenbaum 2006). Por tanto, la línea germinal inhibe la prolongación de la vida media (figura D2). Por su parte, una actividad mitocondrial normal, implica que hay una ratio AMP/ATP mantenida a niveles estándar (en los que hay una mayor representación de ATP que de AMP) y, consecuentemente, un determinado nivel de activación de AMPK. En esta situación, DAF-16 se encuentra “inhibido” (o fosforilado por las quinasas represoras de su actividad) y localizado en el citoplasma. En cambio, si *mtcu-2* y *mttu-1* están inactivados simultáneamente en la línea germinal, se produce esterilidad y disfunción mitocondrial en el tejido germinal, que es el tejido más rico en número de

mitocondrias. Una línea germinal inexistente o inmadura parece desbloquear la inhibición de DAF-9 que, al sintetizar el ácido dafacrónico, activa a DAF-12 (Mukhopadhyay and Tissenbaum 2006). DAF-12 puede aumentar entonces la longevidad a través de la regulación de genes efectores de manera dependiente o independiente de DAF-16. En el doble mutante *mtcu-2;mttu-1* es posible que la disfunción mitocondrial que cursa con niveles de ATP bajos, sea la causa de la inmadurez de la línea germinal. Además, cabe esperar que la elevada ratio AMP/ATP producida por la disfunción en OXPHOS en el doble mutante, active la quinasa AMPK por encima de los niveles constitutivos y ésta fosforile DAF-16, provocando su translocación al núcleo e induciendo longevidad en la cepa. La señal iniciada en el tejido germinal se debe extender a los tejidos somáticos por vías que no están claras para provocar una respuesta al unísono en todo el organismo que resulte en la extensión de su vida media. En esta hipótesis, la inactivación de *daf-9* o *daf-12* favorecería la disponibilidad de DAF-16 para ser fosforilado por AMPK e inducir una vida media más larga, mientras que la inactivación de AMPK favorecería la señalización de longevidad a través de hormonas, facilitando la acción de DAF-12 directamente o a través de DAF-16.

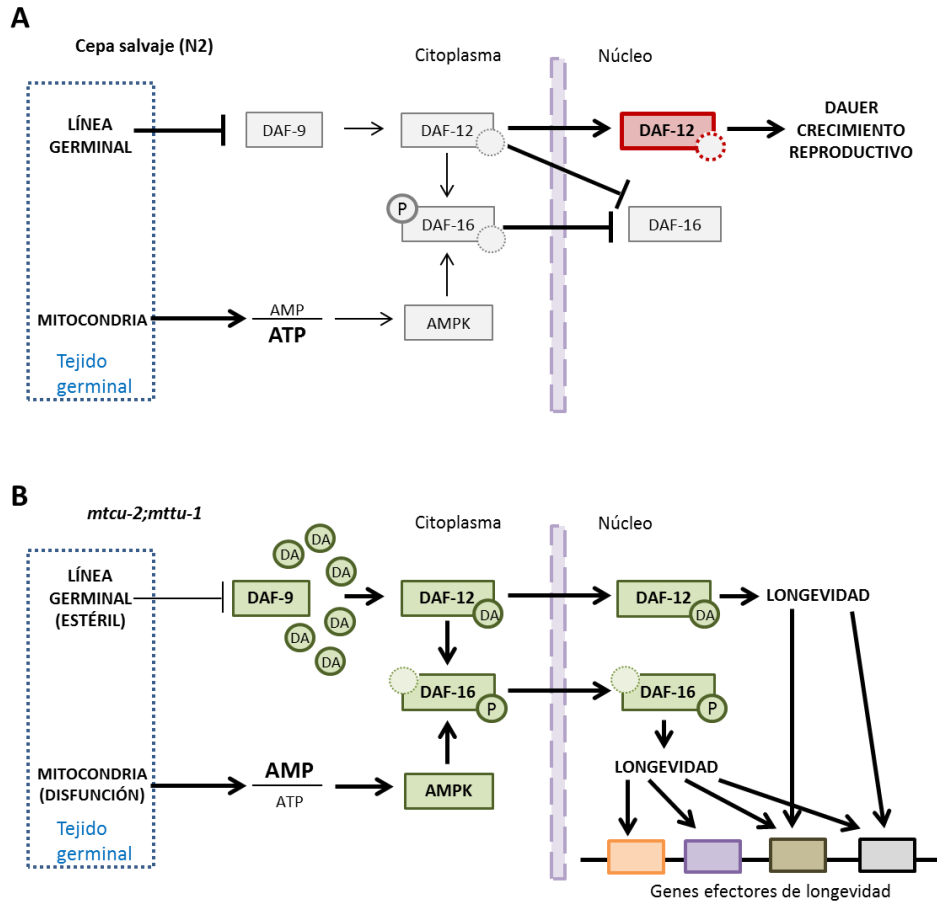


Figura D2. Hipotéticas rutas de señalización de longevidad en el doble mutante *mtcu-2;mttu-1*. La señalización se inicia en el tejido germinal (azul) y se extiende al resto del organismo. (A) En la cepa salvaje, la línea germinal envía señales que inhiben a DAF-9 de manera que no puede sintetizar el ácido dafacrónico (DA), un ligando de DAF-12. DAF-12 se encuentra, por tanto, en un estado inactivo en el que no es capaz de promover la extensión de la longevidad (dependiente o independiente de DAF-16) y, en cambio, promueve el crecimiento reproductivo y la regulación de la entrada en el estado dauer. A su vez, las mitocondrias de la cepa salvaje producen ATP con una elevada eficiencia, lo que mantiene a AMPK activado en unos niveles bajos pero constitutivos. Así, DAF-16 está fosforilado por quinasas que lo retienen en el citoplasma e inhiben su función pro-longevidad. (B) El doble mutante *mtcu-2;mttu-1* es estéril, por lo que se ha reducido el bloqueo sobre DAF-9 a través de la línea germinal y éste puede sintetizar el ácido dafacrónico (DA). DAF-12 se une entonces a su ligando (DA) y activa, por sí mismo, diversos genes efectores que resultan en una extensión de la longevidad. DAF-12 activo también puede promover la translocación de DAF-16 al núcleo. Por otra parte, la severa disfunción mitocondrial del doble mutante aumenta la ratio AMP/ATP y AMPK, una proteína sensora de esta ratio, se sobreactiva, lo que le permite fosforilar a DAF-16 y promover su

translocación al núcleo donde ejerce su función de factor de transcripción y regula genes efectores de longevidad. En gris se muestran las proteínas poco activas. En rojo las proteínas activas cuya función es distinta de la regulación de la longevidad. En verde las proteínas activas que señalizan para promover la extensión de la longevidad. En negrita se resaltan aquellas conexiones o moléculas activas en la señalización. Las flechas indican activación y las líneas terminadas en otra línea perpendicular indican inhibición.

No obstante, no podemos descartar que otros mecanismos expliquen los resultados obtenidos y la extensión de la longevidad en el doble mutante. Así, cabe la posibilidad que la inhibición de *daf-9*, *daf-12* o AMPK, todos ellos implicados tanto en metabolismo como en la extensión de la longevidad (ver los apartados 3.2, 3.4.4 y 3.4.5 de la Introducción) provoque una alteración del metabolismo que repercuta finalmente en otras vías de señalización de longevidad (como la vía de la insulina o TOR) y que éstas fueran las responsables de la extensión adicional de la vida media detectada en los ensayos de silenciamiento. Experimentos adicionales permitirán aclarar, en el futuro, estas nuevas cuestiones.

Conclusiones

*“Un investigador no tiene patria,
su trabajo es patrimonio de la humanidad”*

Mariano Barbacid

En esta Tesis se ha investigado y caracterizado el efecto molecular y fenotípico de la hipomodificación de mt-tRNAs causada por la inactivación de los genes *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. Las proteínas de *C. elegans* MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2, identificadas en este trabajo como las respectivas homólogas de las proteínas MnmA, MnmE y MnmG de bacterias y MTU1, GTPBP3 y MTO1 de humanos, localizan en mitocondria y modifican un grupo de mt-tRNAs. Nuestros datos sustentan la idea de que MTCU-1 y MTCU-2 actúan conjuntamente para modificar la U₃₄ en la posición 5 y demuestran que MTTU-1, de manera independiente, tiola la posición 2. Nuestros datos también demuestran que MTTU-1 tiene una especificidad de sustrato (mt-tRNAs) diferente a la de sus homólogas bacterianas y humanas, apoyando la idea de que la modificación que introduce MTTU-1 y sus homólogas está destinada a optimizar la conformación (y, por tanto, las funciones de los mt-tRNAs), condicionada por sus secuencias nativas.

2. Aunque los fenotipos conferidos por la inactivación independiente de *mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2* exhiben algunas tendencias generales comunes, se observan rasgos diferenciales muy claros entre el mutante *mttu-1*, por un lado, y los mutantes *mtcu-1* o *mtcu-2*, por otro.

3. Mientras que la inactivación de *mtcu-1* o *mtcu-2* promueve un incremento en los niveles estacionarios de los mt-tRNAs, la de *mttu-1* resulta en una disminución de tales niveles, disminuyendo incluso los de mt-tRNAs que no son sustrato. Dado que la transcripción del genoma mitocondrial y la biogénesis y estabilidad de los transcritos maduros resultantes depende enteramente de genes nucleares, los fenotipos descritos apoyan la propuesta de que las

mutaciones *mtcu-1* y *mtcu-2*, por un lado, y *mttu-1*, por otro, promueven señales retrógradas diferentes.

4. La relativamente suave disminución en el potencial de membrana mitocondrial exhibida por los mutantes simples (*mttu-1*, *mtcu-1* y *mtcu-2*) junto al mantenimiento de la ratio AMP/ATP sugiere que existe una disfunción parcialmente compensada del sistema OXPHOS. Tal propuesta es apoyada por la disminución del nivel estacionario de la subunidad NUO-2 del complejo I, en el caso de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*, y por la inducción, en todos los mutantes simples, de la expresión del gen *ucp-4* implicado en el importe de succinato a la mitocondria y en el funcionamiento alternativo del sistema OXPHOS a través del complejo II. En consecuencia, proponemos que la compensación de la disfunción OXPHOS causada por la hipomodificación de los mt-tRNAs en los mutantes simples ocurre a través del complejo II.

5. El análisis de expresión de genes implicados en diferentes rutas metabólicas sugiere que en los tres mutantes simples existe una regulación a la baja de la glicólisis y de la β -oxidación de los ácidos grasos mientras que hay un incremento de la glutaminólisis, indicando que la hipomodificación de la U₃₄ promueve una reprogramación metabólica por la que la fosforilación oxidativa dependería de rutas anapleróticas del ciclo del TCA basadas en la importación de succinato por UCP-4, probablemente procedente del ciclo del glioxilato, y la degradación de aminoácidos.

6. La comparación con la reprogramación metabólica observada en un modelo celular humano del defecto en el homólogo de *mtcu-1* (*GTPBP3*), y a la vista del suave fenotipo de los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2* de *C. elegans* en relación a los exhibidos por pacientes GTPBP3 y MTO1, sugiere que *C. elegans* cuenta con mejores mecanismos de adaptación que los humanos a la ausencia de modificación en la posición 5 de la U₃₄.

7. El análisis de la expresión de los genes *hsp-6* y *hsp-60*, cuya inducción se considera un marcador de la respuesta UPR^{mt}, revela una disminución en la expresión de *hsp-6* en los tres mutantes simples, mientras que la expresión de *hsp-60* disminuye en el mutante *mttu-1* pero aumenta en los mutantes *mtcu-1* y *mtcu-2*. Este comportamiento puede explicar los rasgos fenotípicos

termosensibles de la cepa *mttu-1* (fertilidad y ciclo reproductivo), más graves que los presentados por las cepas *mtcu-1* y *mtcu-2*, y sustenta la propuesta de que los dos tipos de mutaciones (*mttu-1*, por una parte, y *mtcu-1* y *mtcu-2*, por otra) generan señales retrógradas diferentes.

8. La inactivación funcional simultánea de *mttu-1* y *mtcu-1* o *mtcu-2* tiene un efecto sinérgico, causando letalidad. El doble mutante *mttu-1;mtcu-2* presenta una severa disfunción OXPHOS, con una ratio AMP/ATP 5 veces superior al control, que resulta en letalidad embrionaria, detención del desarrollo en estadios larvarios tempranos y esterilidad completa. La inactivación en tejido somático es la responsable de los problemas de desarrollo, mientras que la que acontece en el tejido germinal es la causa de la esterilidad (efectos “cell autonomous”). La mayor longevidad del doble mutante es debida a la señalización que irradia desde el tejido germinal e intestino al resto del organismo (“cell-non-autonomous”). Esta señalización está modulada por rutas dependientes de AMPK, fundamentalmente de la subunidad AAK-1, y de hormonas esteroideas (a través de las proteínas DAF-9 y DAF-12). Los datos sugieren una competencia entre ambas rutas para promover la localización nuclear del factor transcripcional DAF-16.

En resumen, este trabajo muestra por primera vez a nivel de un organismo modelo la importante reprogramación de genes del metabolismo mitocondrial en respuesta a la hipomodificación de la U₃₄ de los mt-tRNAs y revela nuevas conexiones entre rutas de señalización que activan la longevidad.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Agris PF, Vendeix FAP, Graham WD. 2007. tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* **36**: 1-13.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*.
- Altmann R. 1890. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. *Veit, Leipzig*.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon DP, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* **23**: 147.
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano P, Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes and Development* **18**: 3004-3009.
- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C. 2002. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **295**: 502-505.
- Armengod ME, Meseguer S, Villarroya M, Prado S, Moukadiri I, Ruiz-Partida R, Garzon MJ, Navarro-Gonzalez C, Martinez-Zamora A. 2014. Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of 2-codon boxes. *RNA Biol* **11**: 1495-1507.
- . 2015. Modification of the wobble uridine in bacterial and mitochondrial tRNAs reading NNA/NNG triplets of two-codon boxes. *RNA Biol*: 0.
- Armengod ME, Moukadiri I, Prado S, Ruiz-Partida R, Benitez-Paez A, Villarroya M, Lomas R, Garzon MJ, Martinez-Zamora A, Meseguer S et al. 2012. Enzymology of tRNA modification in the bacterial MnmEG pathway. *Biochimie* **94**: 1510-1520.
- Artal Sanz M, Tavernarakis N. 2009. Common aging mechanisms: energy metabolism and longevity in *Caenorhabditis elegans*.
- Artal Sanz M, Tsang WY, Willems EM, Grivell LA, Lemire BD, van der Speck H, Nijtmans LGJ. 2003. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **278**: 32091-32099.
- Atkins JF, Bjork GR. 2009. A gripping tale of ribosomal frameshifting: extragenic suppressors of frameshift mutations spotlight P-site realignment. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 178-210.
- Baruffini E, Dallabona C, Invernizzi F, Yarham JW, Melchionda L, Blakely EL, Lamantea E, Donnini C, Santra S, Vijayaraghavan S et al. 2013. MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Human mutation* **34**: 1501-1509.
- Benda C. 1898. *Arch Anal Physiol* 393-398.
- Benedetti C, Haynes CM, Yang Y, Harding HP, Ron D. 2006. Ubiquitin-Like Protein 5 Positively Regulates Chaperone Gene Expression in the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Genetics Society of America* **174**: 229-239.
- Bennet CF, Vander Wende H, Simko M, Barfield S, Choi H, Pineda VP, Kaeberlein M. 2014. Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* **24**: 3483.
- Berman JR, Kenyon C. 2006. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by *kri-1* and lipophilic-hormone signaling. *Cell* **124**: 1055-1068.

- Björk GR, Hagervall TG. 2005. Transfer tRNA modification (posting data). *Escherichia Coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington DC.
- Bjork GR, Huang B, Persson OP, Bystrom AS. 2007. A conserved modified wobble nucleoside (mcm5s2U) in lysyl-tRNA is required for viability in yeast. *RNA* **13**: 1245-1255.
- Blanco S, Dietmann S, Flores JV, Hussain S, Kutter C, Humphreys P, Lukk M, Lombard P, Treps L, Popis M et al. 2014. Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neurodevelopmental disorders. *Embo J* **33**: 2020-2039.
- Boczonadi V, Horvath R. 2014. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **48**: 77-84.
- Boczonadi V, Smith PM, Pyle A, Gomez-Duran A, Schara U, Tulinius M, Chinnery PF, Horvath R. 2013. Altered 2-thiouridylation impairs mitochondrial translation in reversible infantile respiratory chain deficiency. *Hum Mol Genet* **22**: 4602-4615.
- Bogenhagen D, Clayton DA. 1977. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* **11**: 719-727.
- Braeckman BP, Houthoofd K, Vanfleteren JR. 2009. Intermediary metabolism. in *WormBook* (ed. TCeR Community).
- Brégeon D, Colot V, Radman M, Taddei F. 2001. Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes and Development* **15**: 2295-2306.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Burke D, Dawson D, Stearns T. 2000. *Methods in Yeast Genetics*, New York.
- Cabedo H, Macian F, Villarroya M, Escudero JC, Martínez-Vicente M, Knech E, Armengod ME. 1999. The *Escherichia coli* trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *EMBO J* **18**: 7063-7076.
- Cai WM, Chionh YH, Hia F, Gu C, Kellner S, McBee ME, Ng CS, Pang YL, Prestwich EG, Lim KS et al. 2015. A platform for discovery and quantification of modified ribonucleosides in RNA: application to stress-induced reprogramming of tRNA modifications. *Methods in enzymology* **560**.
- Castelein N, Muschol M, Dhondt I, Cai H, De Vos WH, Dencher NA, Braeckman BP. 2014. Mitochondrial efficiency is increased in axenically cultured *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* **56**: 26-36.
- Claros MG, Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786.
- Clayton DA. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 453-478.
- Colby G, Wu M, Tzagoloff A. 1998. MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 27945-27952.
- Consortium CeS. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **11**: 5396.
- Cristina D, Cary M, Lunceford A, Clarke C, Kenyon C. 2009. A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* **5**: e1000450.
- Curtis R, O'Connor G, DiStefano P. 2006. Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* **5**: 119-126.

- Chan CTY, Dyavaiah M, DeMott MS, Taghizadeh K, Dedon PC, Begley TJ. 2010. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet* **6**.
- Chan CTY, Pang YL, Deng W, Ramesh Babu I, Dyavaiah M, Begley TJ, Dedon PC. 2012. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature communications* **3**.
- Chandel NS. 2014. Mitochondria as signaling organelles. *BMC biology* **12**: 34.
- Chang HW, Shtessel L, Sylva S. 2014. Collaboration between mitochondria and the nucleus is key to long life in *C. elegans*. *Free Radic Biol Med*.
- Ching TT, Paal AB, Mehta A, Zhong L, Hsu AO. 2010. drr-2 encodes a eIF4H that acts downstream of TOR in diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Aging Cell* **9**: 545-557.
- Dancy BM, Sedensky MM, Morgan PG. 2015. Mitochondrial bioenergetics and disease in *Caenorhabditis elegans*. *Front Biosci (Landmark Ed)* **20**: 198-228.
- Decoster E, Vassal A, Faye G. 1993. MSS1, a nuclear-encoded mitochondrial GTPase involved in the expression of COX1 subunit of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol* **232**: 79-88.
- Dillin A, Crawford DK, Kenyon C. 2002. Timing requirements for Insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science* **298**: 830-834.
- DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. 2013. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol* **9**: 429-444.
- Dumas KJ, Guo C, Shih HJ, Hu PJ. 2013. Influence of Steroid Hormone Signaling on Life Span Control by *Caenorhabditis elegans* Insulin-Like Signaling. *G3 Journal* **3**: 841-851.
- Durieux J, Wolff S, Dillin A. 2011. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* **144**: 79-91.
- Edgley ML, Baillie DL, Riddle DL, Rose AM. 2006. Genetic Balancers. in *WormBook* (ed. TCeR Community).
- El Yacoubi B, Bailly M, de Crécy-Lagard V. 2012. Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs. *Annu Rev Genet* **46**: 69-95.
- Elseviers D, Petruccio LA, Gallagher PJ. 1984. Novel *E. coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Res* **12**: 3521-3534.
- Emilsson V, Näslund AK, Kurland CG. 1992. Thiolation of transfer RNA in *Escherichia coli* varies with growth rate. *Nucleic Acids Res* **20**: 4499-4505.
- Esberg A, Huang B, Johansson MJO, Byström AS. 2006. Elevated Levels of Two tRNA Species Bypass the Requirement for Elongator Complex in Transcription and Exocytosis. *Mol Cell* **24**: 139-148.
- Farkas DL, Wei MD, Febroriello P, Carson JH, Loew LM. 1989. Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials. *Biophys J* **56**: 1053-1069.
- Faron M, Fletcher JR, Rasmussen JA, Long ME, Allen LA, Jones BD. 2013. The *Francisella tularensis* migR, trmE, and cphA genes contribute to *F. tularensis* pathogenicity island gene regulation and intracellular growth by modulation of the stress alarmone ppGpp. *Infect Immun* **81**: 2800-2811.
- Félix MA, Braendle C. 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* **20**: R965-R969.
- Felkai S, Ewbank JJ, Lemieux J, Labbé JC, Brown GG, Hekimi S. 1999. CLK-1 controls respiration, behaviour and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* **18**: 1783-1792.
- Fillmore N, Lopaschuk GD. 2013. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 857-865.

- Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, De Jonghe P, Lossos A, Lynch T, Mariotti C et al. 2009. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **16**: 1255-1264.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Dirver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fish J, Raule N, Attardi G. 2004. Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science* **306**: 2098-2101.
- Fisher AL, Lithgow GJ. 2006. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell* **5**: 127-138.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martínez-Campos M, Schrmann M, Ahringer J. 2000. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**: 325-330.
- Frézal L, Félix MA. 2015. *C. elegans* outside the Petri dish. *eLIFE* **4**: e05849.
- Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. 2009. Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* **583**: 437-442.
- Fukuyama M, Sakuma K, Park R, Kasuga H, Nagaya R, Atsumi Y, Shimomura Y, Takahashi S, Kajiho H, Rougvie A et al. 2012. *C. elegans* AMPKs promote survival and arrest germline development during nutrient stress. *Biology Open* **1**: 929-936.
- Gaignard P, Gonzales E, Ackermann O, Labruno P, Correia I, Therond P, Jacquemin E, Slama A. 2013. Mitochondrial Infantile Liver Disease due to TRMU Gene Mutations: Three New Cases. *JIMD reports* **11**: 117-123.
- Gehrke CW, Kuo KC. 1989. Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* **471**: 3-36.
- Gerisch B, Rottiers V, Motola DL, Cummins CL, Leherach H, Mangelsdorf DJ, Antebi A. 2007. A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5014-5019.
- Ghazi A, Henis-Korenblit S, Kenyon C. 2009. A transcription elongation factor that links signals from the reproductive system to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **5**: 9.
- Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, Invernizzi F, Melchionda L, Dallabona C, Strom TM, Parini R, Burlina AB, Meitinger T et al. 2012. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet* **90**: 1079-1087.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6715-6719.
- Gong S, Ma Z, Foster JW. 2004. The Era-like GTPase TrmE conditionally activates gadE and glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 948-961.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* **2**: 1018.1011-1018.1015.
- Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D, Gygi SP, Brunet A. 2007. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current Biology* **17**: 1646-1656.
- Grosjean H. 2009. Nucleic acids are not boring long polymers of only four types of nucleotides: a guided tour. in *DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution*, pp. 1-18. Landes Bioscience, Texas, USA.
- Guo S, Kemphues KJ. 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.

- Hagervall TG, Pomerantz SC, McCloskey JA. 1998. Reduced misreading of asparagine codons by *Escherichia coli* tRNALys with hypomodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the wobble position. *J Mol Biol* **284**: 33-42.
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* **204**: 63-113.
- Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* **25**: 1895-1908.
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D. 2007. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Developmental Cell* **13**: 467-480.
- Haynes CM, Ron D. 2010. The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis. *Journal of Cell Science* **123**: 3849-3855.
- Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D. 2010. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial unfolded protein response by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* **37**: 529-540.
- Ho PWL, Ho JWM, Tse HM, So DHF, Yiu DCW, Liu HF, Chan KH, Kung MHW, Ramsden DB, Ho SL. 2012. Uncoupling protein-4 (UCP4) increases ATP supply by interacting with mitochondrial complex II in neuroblastoma cells. *PLOS One*.
- Holt IJ, He J, Mao CC, Boyd-Kirkup JD, Martinsson P, Sembongi H, Reyes A, Spelbrink JN. 2007. Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* **7**: 311-321.
- Hsin H, Kenyon C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* **399**: 362-366.
- Hubbard EJA, Greenstein D. 2005. Introduction to the germ line. in *WormBook* (ed. TCEr Community).
- Igloi GL. 1988. Interaction of tRNAs and of phosphorothioate-substituted nucleic acids with an organomercurial. Probing the chemical environment of thiolated residues by affinity electrophoresis. *Biochemistry* **27**: 3842-3849.
- Ikeuchi Y, Shigi N, Kato J, Nishimura A, Suzuki T. 2006. Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell* **21**: 97-108.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Jansen G, Wu C, Schade B, Thomas DY, Whiteway M. 2005. Drag & drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43-51.
- Jensen MB, Jasper H. 2014. Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metabolism* **20**.
- Ji C, Guo W, Zhang M, Lu X, Ni Y, Guo X. 2012. *Caenorhabditis elegans* ucp-4 regulates fat metabolism: suppression of ucp-4 expression induced obese phenotype and caused impairment of insulin like pathway. *Gene* **491**: 158-164.
- Jia K, Albert PS, Riddle DL. 2002. DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* **129**: 221-231.
- Jia K, Chen D, Riddle DL. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131**: 3897-3906.
- Kambampati R, Lauhon CT. 2003. MnmA and IscS are required for in vitro 2-thiouridine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **42**: 1109-1117.

- Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG. 2004. The effects of complex I function and oxidative damage on lifespan and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* **125**: 455-464.
- Kemp JP, Smith PM, Pyle A, Neeve VC, Tuppen HA, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Holinski-Feder E, Abicht A et al. 2011. Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain : a journal of neurology* **134**: 183-195.
- Kenyon C. 2010. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* **1204**: 153-162.
- Kirino Y, Yasukawa T, Marjavaara SK, Jacobs HT, Holt IJ, Watanabe K, Suzuki T. 2006. Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect. *Hum Mol Genet* **15**: 897-904.
- Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. 2013. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *Embo J* **32**: 9-29.
- Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carrozzo R, Taylor RW et al. 2014. Mutations in GTPBP3 Cause a Mitochondrial Translation Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy, Lactic Acidosis, and Encephalopathy. *Am J Hum Genet* **95**: 708-720.
- Kruger MK, Pedersen S, Hagervall TG, Sorensen MA. 1998. The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons in vivo. *J Mol Biol* **284**: 621-631.
- Kühnl J, Bobik T, Procter JB, Burmeister C, Höppner J, Wilde I, Lüersen K, Torda AE, Walter RD, Liebau E. 2004. Functional analysis of the methylmalonyl-CoA epimerase from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Journal* **272**: 1465-1477.
- Kukat A, Dogan SA, Edgar D, Mourier A, Jacoby C, Maiti P, Mauer J, Becker C, Senft K, Wibom R et al. 2014. Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity. *PLoS Genet* **10**: e1004385.
- Kumsta C, Hansen M. 2012. *C. elegans* rrf-1 mutations maintain RNAi efficiency in the soma in addition to the germline. *PLoS One* **7**: e35428.
- Lapierre LR, Hansen M. 2012. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**.
- Lauhon CT. 2002. Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6820-6829.
- Lee SS, Lee RYN, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. 2002. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nature Genetics* **33**.
- Leidel S, Pedrioli PGA, Bucher T, Brost R, Costanzo M, Schmidt A, Aebersold R, Boone C, Hofmann K, Peter M. 2008. Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* **458**: 228-232.
- Lemire BD. 2005. Mitochondrial genetics. in *WormBook* (ed. TCeR Community), www.wormbook.org.
- Li D, Shibata Y, Takeshita T, Yamashita Y. 2014. A novel gene involved in the survival of *Streptococcus mutans* under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **80**: 97-103.
- Li S, Hu GF. 2012. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of cellular physiology* **227**: 2822-2826.
- Li X, Guan MX. 2002. A human mitochondrial GTP binding protein related to RNA modification may modulate phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 7701-7711.

- Li X, Li R, Lin X, Guan MX. 2002. Isolation and characterization of the putative nuclear modifier gene MTO1 involved in the pathogenesis of deafness-associated mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 27256-27264.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C. 2003. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **115**: 489-502.
- Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. 1997. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in genetics : TIG* **13**: 450-455.
- Liu F, Thatcher JD, Barral JM, Epstein HF. 1995. Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle. *Developmental Biology* **169**: 399-414.
- Loew LM, Tuft RA, Carrington W, Fay FS. 1993. Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys J* **65**: 2396-2407.
- Lu J, Esberg A, Huang B, Byström AS. 2008. *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic Acids Res* **36**: 1072-1080.
- Lu J, Huang B, Esberg A, Johansson MJO, Byström AS. 2005. The *Kluyveromyces lactis* g-toxin targets tRNA anticodons. *RNA* **11**.
- Martínez-Zamora A, Meseguer S, Esteve JM, Villarroya M, Aguado C, Enriquez JA, Knech E, Armengod ME. 2015. Defective Expression of the Mitochondrial-tRNA Modifying Enzyme GTPBP3 Triggers AMPK-Mediated Adaptive Responses Involving Complex I Assembly Factors, Uncoupling Protein 2, and the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *PLoS One* **10**: e0144273.
- McCormick M, Chen K, Ramaswamy P, Kenyon C. 2010. New genes that extend *Caenorhabditis elegans*' lifespan in response to reproductive signals. *Aging Cell* **11**: 192-202.
- Meseguer S, Martínez-Zamora A, García-Arumi E, Andreu AL, Armengod ME. 2014. The ROS-sensitive microRNA-9/9* controls the expression of mitochondrial tRNA-modifying enzymes and is involved in the molecular mechanism of MELAS syndrome. *Hum Mol Genet.*
- Miller JM. 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. in *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Mokranjac D, Neupert W. 2005. Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* **33**: 1019-1023.
- Moukadiri I, Garzon MJ, Björk GR, Armengod ME. 2014. The output of the tRNA modification pathways controlled by *Escherichia coli* MnmEG and MnmC enzymes depends on the growth conditions and the tRNA species. *Nucleic Acids Res* **42**: 2602-2623.
- Moukadiri I, Prado S, Piera J, Velazquez-Campoy A, Bjork GR, Armengod ME. 2009. Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res* **37**: 7177-7193.
- Mukhopadhyay A, Tissenbaum HA. 2006. Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*. *Trends in cell biology* **17**.
- Murfitt RR, Vogel K, Sanadi DW. 1976. Characterization of the mitochondria of the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol* **53B**: 423-430.
- Murphy CT, Hu JH. 2013. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. in *WormBook* (ed. TCeR Community), www.wormbook.org
- Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM, Haynes CM. 2012. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* **337**.

- Neupert W, Herrmann JM. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749.
- Ni Z, Lee SS. 2010. RNAi screens to identify components of gene networks that modulate aging in *Caenorhabditis elegans*. *Briefings in Functional Genomics* **9**: 53-64.
- Nicholls TJ, Rorbach J, Minczuk M. 2013. Mitochondria: mitochondrial RNA metabolism and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 845-849.
- Numata T, Ikeuchi Y, Fukai S, Suzuki T, Nureki O. 2006. Snapshots of tRNA sulphuration via an adenylated intermediate. *Nature* **442**: 419-424.
- Nunnari J, Suomalainen A. 2012. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* **148**: 1145-1159.
- Ohtsuki T, Watanabe YI. 2007. T-armless tRNAs and elongated elongation factor Tu. *Life* **59**: 68-75.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**: 470-474.
- Okimoto R, Macfarlane JL, Clary DO, Wolstenholme DR. 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* **130**: 471-498.
- Osawa T, Ito K, Inanaga H, Nureki O, Tomita K, Numata T. 2009. Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon. *Structure* **17**: 713-724.
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. 2002. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 30409-30412.
- Partridge L, Gems D, Withers DJ. 2005. Sex and death: what is the connection? *Cell* **120**: 461-472.
- Pfeiffer M, Kayzer EB, Yang X, Abramson E, Kenaston MA, Lago CU, Lo HH, Sedensky MM, Lunceford A, Clarke CF et al. 2011. *Caenorhabditis elegans* UCP4 protein controls complex II-mediated oxidative phosphorylation through succinate transport. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 37712-37720.
- Rea SL, Ventura N, Johnson TE. 2007. Relationship between mitochondrial electron transport chain dysfunction, development, and life extension in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Biology* **5**: e259.
- Rees DM, Leslie AGW, Walker JE. 2009. The Structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21597-21601.
- Reinecke F, Smeitink JA, van der Westhuizen FH. 2009. OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 1113-1121.
- Robert VJP, Sijen T, van Wolfswinkel J, Plasterk RH. 2005. Chromatin and RNAi factors protect the *C. elegans* germline against repetitive sequences. *Genes and Development* **19**: 782-787.
- Sakurai M, Ohtsuki T, Suzuki T, Watanabe K. 2005. Unusual usage of wobble modifications in mitochondrial tRNAs of the nematode *Ascaris suum*. *FEBS Lett* **579**: 2767-2772.
- Salinas-Giege T, Giege R, Giege P. 2015. tRNA biology in mitochondria. *Int J Mol Sci* **16**: 4518-4559.
- Salminen A, Kaarniranta K. 2012. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Research Reviews* **11**: 230-241.
- Sasarman F, Antonicka H, Horvath R, Shoubridge EA. 2011. The 2-thiouridylase function of the human MTU1 (TRMU) enzyme is dispensable for mitochondrial translation. *Hum Mol Genet* **20**: 4634-4643.
- Saxena SK, Rybak SM, Davey RT, Jr., Youle RJ, Ackerman EJ. 1992. Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *J Biol Chem* **267**: 21982-21986.
- Scrima A, Vetter IR, Armengod ME, Wittinghofer A. 2005. The structure of the TrmE GTP-binding protein and its implications for tRNA modification. *EMBO J* **24**: 23-33.
- Schaefer M, Pollex T, Hanna K. 2010. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes and Development* **24**: 1590-1595.

- Schara U, von Kleist-Retzow JC, Lainka E, Gerner P, Pyle A, Smith PM, Lochmuller H, Czermin B, Abicht A, Holinski-Feder E et al. 2011. Acute liver failure with subsequent cirrhosis as the primary manifestation of TRMU mutations. *J Inherit Metab Dis* **34**: 197-201.
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 655-667.
- Schultz BE, Chan SI. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 23-65.
- Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, Ohkubo T, Yoshimura S, Nakazawa H, Hartman PS, Ishii N. 2001. A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276**: 41553-41558.
- Shippy DC, Eakley NM, Bochsler PN, Fadl AA. 2011. Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene. *Microbial Pathogenesis* **50**: 303-313.
- Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC. 1988. Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **155**: 1360-1365.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RHA, Fire A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476.
- Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT. 2006. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab* **3**: 9-13.
- Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. 2010. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**: 737385.
- Soukas AA. 2009. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* **23**: 496-511.
- Stiernagle T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. in *WormBook* (ed. TCer community).
- Stocchi V, Cucchiari L, Magnani M, Chiarantini L, Palma P, Crescentini G. 1985. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. *Anal Biochem* **146**: 118-124.
- Su D, Chan CTY, Gu C, Lim KS, Chionh YH, McBee ME, Russell BS, Ramesh Babu I, Begley TJ, Dedon PC. 2014. Quantitative analysis of tRNA modifications by HPLC-coupled mass spectrometry. *Nat Protoc* **9**: 828-841.
- Sullivan MA, Cannon JD, Webb FH, Bock RM. 1985. Antisuppressor mutation in *Escherichia coli* defective in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Journal of Bacteriology* **161**: 368-376.
- Suzuki T, Nagao A. 2011. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 376-386.
- Suzuki T, Suzuki T. 2014. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Res* **42**.
- Suzuki Y, Yoshimoto-Nakagawa K, Maruyama K, Suyama A, Sugano S. 1997. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end enriched cDNA library. *Gene* **200**: 149-156.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC. 1998. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**: 430-431.
- Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* **24**: 180-183.

- Taylor RC, Dillin A. 2011. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: 1-17.
- Temperley R, Richter R, Dennerlein S, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. 2010. Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science* **327**: 301.
- Timmons L, Court DL, Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112.
- Timmons L, Fire A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **393**: 481-485.
- Tischner C, Hofer A, Wulff V, Stepek J, Dumitru I, Becker L, Haack T, Kremer L, Datta AN, Sperl W et al. 2015. MTO1 mediates tissue specificity of OXPHOS defects via tRNA modification and translation optimization, which can be bypassed by dietary intervention. *Hum Mol Genet* **24**: 2247-2266.
- Tsang WY, Lemire BD. 2002. Mitochondrial genome content is regulated during nematode development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**: 8-16.
- . 2003. The role of mitochondria in the life of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica* **1638**: 91-105.
- Tsang WY, Sayles LC, Grad LI, Pilgrim DB, Lemire BD. 2001. Mitochondrial respiration chain deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in developmental arrest and increased life span. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 32240-32246.
- Tully LA, Levin BC. 2000. Human mitochondrial genetics. *Biotechnol Genet Eng Rev* **17**: 147-177.
- Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. 2010. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 113-128.
- Ulgherait M, Rana A, Rera M, Graniel J, Walker DW. 2014. AMPK modulates tissue and organismal aging in a non-cell-autonomous manner. *Cell Rep* **8**: 1767-1780.
- Umeda N, Suzuki T, Yukawa M, Ohya Y, Shindo H, Watanabe K, Suzuki T. 2005. Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 1613-1624.
- Urbonavicius J, Qian Q, Durand JMB, Hagervall TG, Björk GR. 2001. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *The EMBO Journal* **20**: 4863-4873.
- Vastenhouw NL, Fischer SEJ, Robert VJP, Thijssen KL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Plasterk RHA. 2003. A genome-wide screen identifies 27 genes involved in transposon silencing in *C. elegans*. *Current Biology* **13**: 1311-1316.
- Ventura N, Rea SL, Testi R. 2006. Long-lived *C. elegans* Mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. *Experimental Gerontology* **41**: 974-991.
- von Meyenburg K, Jorgensen BB, Nielsen J, Hansen FG. 1982. Promoters of the atp operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations. *Mol Gen Genet* **188**: 240-248.
- Vozza A, Parisi G, De Leonardi F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, Marmo R, Calcagnile VM, Palmieri L, Ricquier D et al. 2014. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 960-965.
- Wadsworth WG, Riddle DL. 1989. Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **132**: 167-173.
- Wang X, Yan Q, Guan M-X. 2010. Combination of the Loss of cmnm5U34 with the Lack of s2U34 Modifications of tRNALys, tRNAGlu, and tRNAGln Altered Mitochondrial Biogenesis and Respiration. *Journal of Molecular Biology* **395**: 1038-1048.

- Wang Y, Bogenhagen DF. 2006. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **281**: 25791-25802.
- Wang Z, Stoltzfus J, You YJ, Ranjit N, Tang H, Xie Y, Lok JB, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. 2015. The nuclear receptor DAF-12 regulates nutrient metabolism and reproductive growth in nematodes. *PLoS Genet* **3**: e1005027.
- Watanabe YI, Suematsu T, Ohtsuki T. 2014. Losing the stem-loop structure from metazoan mitochondrial tRNAs and co-evolution of interacting factors. *Frontiers in genetics* **5**.
- Watanabe YI, Tsurui H, Ueda T, Furushima R, Takamiya S, Kita K, Nishikawa K, Watanabe K. 1994. Primary-Order and Higher-Order Structures of Nematode (*Ascaris-Suum*) Mitochondrial Transfer-Rnas Lacking Either the T-Stem or D-Stem. *J Biol Chem* **269**: 22902-22906.
- Westhof E, Yusupov M, Yusupova G. 2014. Recognition of Watson-Crick base pairs: constraints and limits due to geometric selection and tautomerism. *F1000Prime Rep* **6**: 19.
- Whelan SP, Zuckerbraun BS. 2013. Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 351613.
- Wolstenholme DR, Macfarlane JL, Okimoto R, Clary DO, Wahleithner JA. 1987. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 1324 - 1328.
- Wong A, Boutis P, Hekimi S. 1995. Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect development and behavioral timing. *Genetics* **139**: 1247-1259.
- Yan Q, Li X, Faye G, Guan MX. 2005. Mutations in MTO2 related to tRNA modification impair mitochondrial gene expression and protein synthesis in the presence of a paromomycin resistance mutation in mitochondrial 15 S rRNA. *J Biol Chem* **280**: 29151-29157.
- Yang W, Hekimi S. 2010. Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **9**: 433-447.
- Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K. 2000. Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem* **275**: 4251-4257.
- Yen K, Narasimhan SD, Tissenbaum HA. 2011. DAF-16/Forkhead Box O Transcription Factor: Many paths to a single Fork(head) in the road. *Antioxidants & Redox signaling* **14**.
- Yim L, Moukadiri I, Bjork GR, Armengod ME. 2006. Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **34**: 5892-5905.
- Ylikallio E, Suomalainen A. 2012. Mechanism of mitochondrial diseases. *Ann Med* **44**: 41-59.
- Yokoyama S, Watanabe T, Muraio K, Ishikura H, Yamaizumi Z, Nishimura S, Miyazawa T. 1985. Molecular mechanism of codon recognition by tRNA species with modified uridine in the first position of the anticodon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4905-4909.
- Yuan HX, Xiong Y, Guan KL. 2013. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Mol Cell* **49**: 379-387.
- Zeharia A, Shaag A, Pappo O, Mager-Heckel AM, Saada A, Beinart M, Karicheva O, Mandel H, Ofek N, Segel R et al. 2009. Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *Am J Hum Genet* **85**: 401-407.
- Zeviani M, Di Donato S. 2004. Mitochondrial disorders. *Brain : a journal of neurology* **127**: 2153-2172.

Bibliografía

Zhang W, Zhao Z, Zhang B, Wu XG, Ren ZG, Zhang LQ. 2014. Posttranscriptional regulation of 2,4-diacetylphloroglucinol production by GidA and TrmE in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3972-3981.

Anexos

Anexo I. Listado de reactivos utilizados en este trabajo

REACTIVOS	CASA COMERCIAL
Para electroforesis de DNA, RNA y proteínas	
Acrilamida-bisacrilamida 19:1 (40%, p/v)	Amresco
Acrilamida-bisacrilamida 29:1 (40%, p/v)	Amresco
Agarosa	Pronadisa
SDS	USB
Urea	Merck
APS	Bio-Rad
TEMED	Merck
Marcador de masa molecular para RNA	BioDynamics Laboratory Inc
Marcador de masa molecular para proteína	Fermentas
GelRed Stain	Biotium
Extracción de RNA total o pequeño a partir de cultivos de <i>C. elegans</i>	
Trizol	Invitrogen
NucleoSpin miRNA	Macherey-Nagel
Extracción de RNA pequeño a partir de mitocondrias de <i>C. elegans</i>	
Nucleobond	AX500
Extracción de mitocondrias de <i>C. elegans</i>	
Perlas de vidrio	Sigma
Digestión de RNA	
Nucleasa P1	Sigma
Fosfatasa alcalina	Sigma
Benzonasa	Sigma
Para PCR	
Oligonucleótidos	Sigma
dNTPs	Invitrogen
DNA polimerasa (Taq Expand High Fidelity)	Roche
Para PCR cuantitativa (qRT-PCR)	
SYBR Green Mix	Applied Biosystems

Anexos

Transcriptasa inversa	Applied Biosystems
Inhibidor de RNAsas	Applied BioSystems
Cebadores	Sigma
Para transferencia Western	
Membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Amersham Biosciences
Papel Whatman	Fisher Scientific
Anticuerpos	
Anti-NDUFS3 (MS112)	MitoSciences
Anti-MT-CO1 (MS404)	MitoSciences
Anti-ATP sintasa	Proporcionado por Ewin Knecht
Ab8227	Abcam
Para transferencia Northern	
Membrana de Nylon	Mannheim Boehringer
Tampón de hibridación Dig Easy Hyb	Roche
Anticuerpo anti-digoxigenina	Roche
CDP-Star	Roche
Para ensayo de actividad endonucleasa	
Angiogenina	VITRO S.A.
Para cuantificación del potencial de membrana	
TMRE	Sigma
MitoTracker Red	Thermo-Fisher
Caracterización de las gónadas de <i>C. elegans</i>	
Levamisole	VWR
DAPI	Thermo-Fisher
Paraformaldehído	Sigma
Prolong Gold	Thermo-Fisher
Para cultivo líquido de <i>C. elegans</i>	
Nistatina	Sigma

Anexo II. Listado de equipos utilizados en este trabajo.

INSTRUMENTACIÓN CIENTÍFICA	CASA COMERCIAL
Para electroforesis de DNA	
Cubetas	Owl
Fuentes eléctricas	Amersham
Transiluminador Multiimage Light Cabinet	Alpha Innotec
Para análisis por PCR	
Termocicladores PTC-100 y PTC-150	MJ Research
PCR cuantitativa (Step One Real-Time PCR System)	Applied Biosystems
Electroforesis de proteínas	
Cubeta Hoefer SE-260	GE Healthcare
Fuentes eléctricas	Amersham
Transferencia de proteínas y RNA	
Tanque de transferencia húmeda	Bio-Rad
Equipo transferencia semi-seca	BioRad
Centrífugas	
RC-58	Sorvall
5415R	Eppendorf
Avanti J25	Beckman
Avanti J20XD	Beckman
Sonicador	
Labsonic	Braun
Espectrofotómetros	
Unicam UV-Visible	Hellios-λ
Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies
Incubadores	
Incubador-agitador ISF-1-W	Küner
Estufas	
Estufa	Memmet

Anexos

Estereomicroscopio	
Estereomicroscopio MZ1500	Nikon
Cámara Nikon Digital Sight DS-L1	Nikon
Microscopios	
Leica DM LB	Leica
LEICA DM 6000B	Leica
Deltapix CCD	Deltapix
HPLC	
Elite LaChrom	VWR Hitachi
Columna Develosil C30	Phenomenex
Synergi fusion 5U	Synergi
Espectrometría de masas	
HPLC (1290 uHPLC)	Agilent
Mass Spec 6490 ESI-QQQ	Agilent
Hypersil GOLD aQ column 100 x 2.1 mm, 1.9 µm	ThermoScientific

Anexo III. BLAST (NCBI) de las proteínas homólogas en *C. elegans* utilizando MnmA, MnmE y MnmG de *E. coli*, MTU1, MSS1 y MTO1 de *S. cerevisiae* y MTU1, GTPBP3 y MTO1 de *H. sapiens* como “query”. A continuación, se muestran los resultados del BLAST con cada una de ellas. Se observan las secuencias que han producido alineamientos significativos en el proteoma de *C. elegans* y el alineamiento con la más significativa, que resulta ser su homóloga.

BLAST de MnmA (*E. coli*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Protein B0035.16 [Caenorhabditis elegans]	264	264	96%	2e-84	40%	NP_502120.1
Protein GMPS-1, isoform c [Caenorhabditis elegans]	44.7	44.7	49%	7e-05	25%	NP_001076631.1
Protein GMPS-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	44.3	44.3	49%	8e-05	25%	NP_001022257.2
Protein GMPS-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	44.3	44.3	49%	8e-05	25%	NP_001022256.2
Protein F35E2.5 [Caenorhabditis elegans]	29.3	29.3	11%	4.3	32%	NP_492992.1
Protein C49A9.3 [Caenorhabditis elegans]	28.5	28.5	14%	6.4	42%	NP_500936.2

Protein B0035.16 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: **ref|NP_502120.1|** Length: 375 Number of Matches: 1
Range 1: 3 to 368

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
264 bits(674)	2e-84()	Compositional matrix adjust.	149/371(40%)	218/371(58%)	22/371(5%)	
Features:						
Query	7	KVIVGMSGGVDSVSAWLLQQQGYQVEGLFMKNWE-EDDGEEYCTAAADLADAQAVCDKL	65			
Sbjct	3	RVVIGMSGGVDSAVSAFLKRRGFDVIGLHMINWDVQEEGTSCHPRSKDESARNVCDRL	62			
Query	66	GIELHTVNFAAEYWDNVFELFLAEYKAGRTPNPDIILCNKEIKFKAFLEFAAEDLGADYIA	125			
Sbjct	63	NIPFHTVNFVKEYWNDVFLKFLFENYKNGRTTVPDIDCNQSIKFDVFKIAREKFNADFIA	122			
Query	126	TGHYV-----RRADV D G K S R L L R G L D S N K D Q S Y F L Y T L S H E Q I A Q S L F P V G E L E K P Q	177			
Sbjct	123	TGHYATNFGDFQQNAKDSDEIRLFSGKDPLKDQTFFLCTVNQEQLKRAMFPLGSLQKSE	182			
Query	178	VRKIAEDLGLV-TAKKKDSTGICFIGERK-FREFLGRYLP AQPGKIITVDGDEIGEHOGL	235			
Sbjct	183	VKRIAEEQGFQEVAKKPESMGICFIGKKRFSDFLDEYIEPKPGRILLKNGSEIGNHHGI	242			
Query	236	MYHTLGQRKGLGIGGT--KEGTEEPWYVVDKDVENNILVVAQGHEHPRLMSVGLIAQQLH	293			
Sbjct	243	HQFTIGKR----INGKYLEARSHLGFVSHIHSDTGDIACEGSHHPDLYASRFLINHPK	298			
Query	294	WVDR-EPFTGTMRCTVKTRYRQTD--IPCTVKALDDRIEIVIFDEPVAAVTPGQSAVFYN	350			
Sbjct	299	WIRTFDPFNRISSNNFLCRIQRTHPPIPC-VAEKQEQLSVIPRLALRATAPGQMCVFYN	357			
Query	351	GEV-CLGGGII 360				
Sbjct	358	TKNECLGGGEI 368				

BLAST de MTU1 (*S. cerevisiae*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTTU-1 [Caenorhabditis elegans]	160	160	91%	3e-44	30%	NP_502120.1
SUP-35 [Caenorhabditis elegans]	28.5	28.5	18%	8.6	26%	NP_499432.1
NEKL-4 [Caenorhabditis elegans]	28.9	28.9	26%	9.3	23%	NP_498178.3

MTTU-1 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_502120.1| Length: 375 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)
Range 1: 4 to 371

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
160 bits(404)	3e-44()	Compositional matrix adjust.	118/390(30%)	178/390(45%)	30/390(7%)	

Features:

Query	29	VIVAMSSGVDSVAAALFAGEFPNTRGVYMQNWSSESQSLDDPGKEPC-YERDWRDVNRVA	87
		V++ MS GVDS+V+A L + G++M NW + + G C +D D V	
Sbjct	4	VVIGMSGGVDSAVSAFLKKRGRFDVIGLHMINWD----VQEEGTSCHPRSKDES DARNVC	59
Query	88	KHLNIRVDKVNFEQDYWIDVFEPMLRGYSEGSTPNPDIGCNKFVKFGKLRWLDEKYGTG	147
		LNI VNF ++YW DVF L Y G T PDI CN+ +KF + EK+	
Sbjct	60	DRLNIPFHTVNFVKEYWNVFLKFLYKNGRRTTVPDIDCNQSIKFDVVFHFKIAREKFNAD	119
Query	148	NYWLVTGHYARV-----MQEMNGKGLFHLRSIYRPKDQSYYSQINSTVLSLLPIGH	202
		++ TGHYA Q L KDQ+++L +N L + P+G	
Sbjct	120	--FIATGHYATTNFGDFQQNAKDSDEIRLFSGKDPLKDQTFFLCTVNQEQLKRAMFPLGS	177
Query	203	LTKPEVRDLAKYAGL-PTAEKPDSOGICFVNNSQHGKFNFLKHYLPSSPGDIITVDPOS	261
		L K EV+ +A+ G A+KP+S GICF+ + +F +FL Y+ PG I+ ++	
Sbjct	178	LQKSEVKRIAEQGFQEVAKKPESMGICFIGKKK--RFSDFLDEYIEPKPGRILL---KN	232
Query	262	GAKTTWGRHDGLWSYTIGQKVGISMPQADPNYQGTWVSEKLRDTNEILIVRGRDNPALY	321
		G++ G H G+ +TIG+++ +A + +FVS DT +I+ G +P LY	
Sbjct	233	GSEI--GNHHGIHQFTIGKRINGKYLEARSHL--GFFVSHIHSDTGDIIACEGSHHPDLY	288
Query	322	SDTMRIENFSSLGPREDTINAFQNTGALTLQFRSLQVPVQIKSCKLNRSADNLDITIHLA	381
		+ I N D N + L + + P+ C + L + LA	
Sbjct	289	ASRFLI-NHPKWIRTFDPFNRISSNNFLC-RIQRTHPPI---PCVAEKQEQLSVIPRLA	343
Query	382	SKQRAITPGQSCCLY-IDDRVLGSGPISHV	410
		RA PGQ C Y + LG G I ++	
Sbjct	344	--LRATAPGQMCVFYNTKNECLGGGEIMNI	371

BLAST de MTU1 (*H. sapiens*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTTU-1 [Caenorhabditis elegans]	268	268	90%	6e-85	40%	NP_502120.1
Y71H2AM.20, isoform a [Caenorhabditis elegans]	31.6	31.6	24%	1.1	22%	NP_497617.1
GMPS-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	31.6	31.6	16%	1.3	31%	NP_001022257.2
GMPS-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	31.6	31.6	16%	1.3	31%	NP_001022256.2
GMPS-1, isoform c [Caenorhabditis elegans]	31.2	31.2	16%	1.5	31%	NP_001076631.1
protein C44E4.1a [imported] - Caenorhabditis elegans	31.2	31.2	23%	1.7	25%	D87757
PME-4 [Caenorhabditis elegans]	29.3	29.3	9%	5.4	31%	NP_501496.2
Y80D3A.8 [Caenorhabditis elegans]	29.3	29.3	14%	6.9	33%	NP_507691.2

MTTU-1 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: [ref|NP_502120.1|](#) Length: 375 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)
range 1: 4 to 371

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
268 bits(684)	6e-85()	Compositional matrix adjust.	157/388(40%)	210/388(54%)	28/388(7%)	
Features:						
Query 7	VVCALSGGVDSAVAALLRRRGGYQVTGVFMKNWDSLDEHGV--CTADKDCEDAYRVCQIL					64
Sbjct 4	VV +SGGVDSAV+A LL++RG+ V G+ M NMD + E G C KD DA VC L					62
Query 65	DIPFHQVSYVKEYWNDVFSDFLNEYEKGRTPNPDIVCNKHKIFSCFFHYAVDNLGADAIA					124
Sbjct 63	+IPFH V++VKEYWNDVF FL Y+ GRT PDI CN+ IKF F A + AD IA					122
Query 125	TGHYARTSLEDEEVFEQKHVKKPEGLFRNRFEVRNAVKLLQAADSFKDQTFFLSQVSDQA					184
Sbjct 123	TGHYA T+ D F+ + + ++L D KDQTFFL V+Q+					167
Query 185	LRRITFPLGGLTKEFVKKIAAENRLHHVLQKKESMGMCFIGKRN-FEHFLQYLQPRPGH					243
Sbjct 168	L+R +FPLG L K VK+IA E V +K ESMG+CFIGK+ F FL +Y++P+PG					227
Query 244	FISIEDNKVLGTHKGMFLYTLGQRANIGGLRE---PWYVVEKDSVKGDVFPVAPRTDHPA					299
Sbjct 228	I +++ +G H G +T+G+R N L ++V S GD+ + HP					286
Query 300	LYRDLRLRSRVHWIAEPPAALVRDKMMECHFRFRHQMALVPCVLTLLNQDGTVMVTAVQA					359
Sbjct 287	LYASRFLINHPKWIRTFDPFNRISSNNFLC--RIQRTHPPIPCVAE-KQEQLSVIPRLA					343
Query 360	VRALATGQFAVFYKG-DECLGSGKILRL 386					
Sbjct 344	+RA A GQ VFY +ECLG G+I+ +					
	LRATAPGQMCVFYNTKNECLGGGEIMNI 371					

BLAST de MnmE (*E. coli*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]	169	169	98%	1e-46	28%	NP_493573.1
Y67D2.4, isoform a [Caenorhabditis elegans]	41.2	41.2	18%	0.001	34%	NP_001122738.1
NST-1 [Caenorhabditis elegans]	40.0	40.0	13%	0.003	31%	NP_495749.1
M01E5.2 [Caenorhabditis elegans]	39.3	39.3	33%	0.004	29%	NP_493334.1
C53H9.2, isoform d [Caenorhabditis elegans]	39.3	39.3	12%	0.004	43%	NP_001293427.1
C53H9.2, isoform a [Caenorhabditis elegans]	39.7	39.7	12%	0.004	43%	NP_740787.2
T07A9.9, isoform b [Caenorhabditis elegans]	38.1	38.1	33%	0.012	27%	NP_741289.1
T07A9.9, isoform a [Caenorhabditis elegans]	37.7	37.7	33%	0.017	27%	NP_741288.1
rab-7 [Caenorhabditis elegans]	35.8	35.8	29%	0.039	26%	AFP33150.1
RAB-7 [Caenorhabditis elegans]	35.4	35.4	29%	0.042	26%	NP_496549.1
SSR-2 [Caenorhabditis elegans]	35.0	35.0	29%	0.080	26%	NP_508490.3
C28E6.12 [Caenorhabditis elegans]	33.9	33.9	18%	0.22	30%	NP_498042.1
NGP-1, isoform c [Caenorhabditis elegans]	33.1	33.1	8%	0.40	41%	NP_001021621.1

MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_493573.1| Length: 439 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)
Range 1: 3 to 439

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
169 bits(427)	1e-46()	Compositional matrix adjust.	129/460(28%)	224/460(48%)	34/460(7%)	
Features:						
Query 6	TIVAQATPPGRGGVILRISGFKAREVAETV-LGKLPKPRYADYLPFKDADGSVLDQGIA	64				
Sbjct 3	TI A ++ + + R+SG ++ V + K+ KP+ Y D++ ++D+ +A	62				
Query 65	LWFPGPSFTGEDVLELQGHGGPVILDLLKRLITIPGLRIARPGEFSEAFNLNDKLDLA	124				
Sbjct 63	++ PGP +FTGED E HG + + I +R A+ GEF+ RAF N KL ++	122				
Query 125	VYLPGPKFTGEDTAEFFLHGSQAVAVKFAFASCLAGIQNVREAKRGEFTRRAFHNGLSIS	122				
Query 125	QAEAIADLIDASSEQAARSALNSLQAFSA--RVNHLVEALTHLRIYVE----AAIDFPD	178				
Sbjct 123	+ I LI + +E+ +A ++G A L++ L+ L + ++ ++ +	182				
Query 179	EVRGIDRLIKSRTEKERNAAFQMRGGVRAIEIRKQLIQILSKLFIIDFGEHVNLELRE	182				
Query 179	EEIDFLSDGKIEAQLNDVIADLDVRAEARQGSLLREGMKVVIAGRPNAGKSSLLNALAG	238				
Sbjct 183	+ D +I +LN +I D R G+ +V+ GRPN+GKSS+LN LA	232				
Query 239	AQQDV---SEILHELNRMIKAWDGAERAQR-----GLDIVLYGRPNKSSILNQLAH	232				
Query 239	REAAIVTDIAGTTRDVLREHIHIDGMLPHIIDTAGLREASDEV-ERIGIERAWQEIEQAD	297				
Sbjct 233	+ AIV+ I GTTRD L I I+G+ + DTAG+R+ +++V E GI RA + I+ AD	292				
Query 298	DDVAIVSSIPGTTTDSLETIIQINGVRCRLTDTAGVRQKTNDVIEAEGIRRAQKRIQSAD	292				
Query 298	RVLFMVDGTTTDAVDPAEIWPFIARLPALPITVVRNKADITGETLGMSEVNGHALIRL	357				
Sbjct 293	+ +VD T D I + + + + +NK+D++ + + +	350				
Query 358	IICVVVDPQFTSDDVDESILNDVEVMRREARVIAKNKSDLSLKYPKLP--SNFTTVST	350				
Query 358	SARTGEGVDVLRNHLKQSMGFDTNMEGGFLARRRHQLALEQAAEHLQOGKAQLLGAWAGE	417				
Sbjct 351	+A T G L+N L + + D E +L A+ L++ +L A	399				
Query 418	NATTDGTGCKQLQNCLEIVD-DLCPEASYLL-----DADLLRRCSEFELESAVTCN	399				
Query 418	---LLAEELRLAQQNLSEITGEFTSDDLGRIFSSFCIGK 454					
Sbjct 400	++ L +A + + E+T ++ +L IFS FCIGK 439					
Query 418	DAAIMCSHLEVALEQIGELTEGIVTESVLDGIFSKFCIGK 439					

BLAST de MSS1 (*S. cerevisiae*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]	228	228	92%	6e-68	32%	NP_493573.1
ARL-3 [Caenorhabditis elegans]	45.1	45.1	33%	3e-05	26%	NP_497037.1
T07A9.9, isoform b [Caenorhabditis elegans]	45.1	45.1	30%	1e-04	30%	NP_741289.1
T07A9.9, isoform a [Caenorhabditis elegans]	45.1	45.1	30%	1e-04	30%	NP_741288.1
M01E5.2 [Caenorhabditis elegans]	42.0	42.0	31%	7e-04	27%	NP_493334.1
E02H1.2 [Caenorhabditis elegans]	42.0	42.0	10%	7e-04	40%	NP_496060.1
NST-1 [Caenorhabditis elegans]	41.6	41.6	26%	0.001	25%	NP_495749.1
C02F5.3 [Caenorhabditis elegans]	37.4	37.4	20%	0.022	29%	NP_498808.2
RAB-11.2, isoform a [Caenorhabditis elegans]	35.8	35.8	11%	0.036	38%	NP_001251691.1
C53H9.2, isoform d [Caenorhabditis elegans]	36.2	36.2	10%	0.045	37%	NP_001293427.1
hypothetical protein W04G5.2 - Caenorhabditis elegans	35.4	35.4	11%	0.050	38%	T26168
C53H9.2, isoform a [Caenorhabditis elegans]	36.2	36.2	10%	0.052	37%	NP_740787.2
T28D6.8, isoform a [Caenorhabditis elegans]	35.0	35.0	20%	0.100	28%	NP_001255126.1
RAB-7 [Caenorhabditis elegans]	33.9	33.9	30%	0.18	24%	NP_496549.1
NGP-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	34.7	34.7	11%	0.18	33%	NP_492276.2

MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_493573.1| Length: 439 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 3 to 439

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
228 bits(582)	6e-68()	Compositional matrix adjust.	158/493(32%)	252/493(51%)	60/493(12%)	
Features:						
Query	38	TIYALSTPANQTSIAIAIRISGTHAKYIYNRLVDSSTVPIRKAILRNIYSPSSCSVKPH	97			
		TI+ALS+ SAIA+ R+SG S ++P +R+ R ++ P +				
Sbjct	3	TIFALSS-GTLP SAIAMFRVSG-----SQSLPVLRLQSRKRVNPKTKMYTKL	49			
Query	98	DQKESKILLDTSLLLYFQAPYSFTGEDVLELHVHGGKAVVNSILKAIGSLHDRSSGKDIR	157			
		ESKI+ D ++ +Y P +FTGED E +HG +AV + + +				
Sbjct	50	YDSESKII-DEAMAVYLP GPKTFTGEDTAEFFLHG SQAVAVK FASCLAGI-----QNV R	102			
Query	158	FALPGDFSRRRAFQNGKFDLTQLEGIKDLIDSETESORRSALSSFNGDNKILFENWRETII	217			
		A G+F+RRAF NGK ++++ GI LI S TE +R +A G + + R + +I				
Sbjct	103	EAKRGEFTRRAFHNGLKLSISEVRGIDRLIKSRTEKERNAAFQMRGGVRAI--EIRKQLI	160			
Query	218	ENMAQLTAIIDFADDNSQEI----QNTDEIFHNVEKNIICLRDQIVTFMQKVEKSTILQN	273			
		+ +++L IIDF + + E+ Q+ EI H + +++++ E++ Q				
Sbjct	161	QILSKLFVIIDFGEHVNLELREAAQDVSEILHEL-----NRMIKAMDGAERA---QR	209			
Query	274	GIKLVLLGAPNVGKSSLVNSLTNDDISIVSDIPGTTTRDSIDAMINVNGYKVIICDTAGIR	333			
		G+ +VL G PN GKSS++N L +DD++IVS IPGTTTRDS++ +I +NG + + DTAG+R				
Sbjct	210	GLDIVLYGRPN SGKSSILNQLAHDVVAIVSSIPGTTTRDSLETIIQINGVRCRLDTAGVR	269			
Query	334	EKSSDKIEMLGIDRAKKKSVQSDLCLFIVDPTDLSKLLPEDILAHLSSTFGNKRRIIVV	393			
		+K++D IE GI RA+K+ +D+ +VDP S E IL + R+II				
Sbjct	270	QKTNVIEAEGIRRAQKRIQSADIIICVVDPQFTSDDVSESILNDVEVMRNREARVIAK	329			
Query	394	NKSDLVSDDEMTKVLNKLQTRLGSKYPILSVSCKTKEGIESLISTLTSNFESLSQSADA	453			
		NKSD L+ +L S + +S + T G + L + L + L +				
Sbjct	330	NKSD-----LSLKYKLP SNFTTVSTNATDTGCKQLQNLG EIVDDLCP EA---	376			
Query	454	SPVIVSKRVSEILKNDVLYGLEEFFKSKDFHNDIVLATENLRYASDGI AKITGQAIGIEE	513			
		S +L D+L +S ND + +L A + I ++T + I E				
Sbjct	377	-----SYLLDADLLRRC SFELES AVT CNDAAIMCSHLEVALEQIGELT-EGIVTES	426			
Query	514	ILDSVFSKFCIGK 526				
		+LD +FSKFCIGK				
Sbjct	427	VLDGIFSKFCIGK 439				

BLAST de GTPBP3 (*H. sapiens*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]	207	207	93%	3e-80	33%	NP_493573.1
NST-1 [Caenorhabditis elegans]	42.0	42.0	9%	8e-04	37%	NP_495749.1
F46B6.4 [Caenorhabditis elegans]	40.8	40.8	35%	0.002	25%	NP_505523.1
protein C26E6.12 [imported] - Caenorhabditis elegans	39.3	39.3	28%	0.007	26%	H88444
C26E6.12 [Caenorhabditis elegans]	38.5	38.5	23%	0.010	27%	NP_498042.1
C53H9.2, isoform d [Caenorhabditis elegans]	34.7	64.3	31%	0.17	22%	NP_001293427.1
NGP-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	34.7	34.7	7%	0.18	46%	NP_492276.2
NGP-1, isoform c [Caenorhabditis elegans]	34.3	34.3	7%	0.20	46%	NP_001021621.1
NGP-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	34.3	34.3	7%	0.22	46%	NP_492275.2
C53H9.2, isoform a [Caenorhabditis elegans]	34.3	64.3	37%	0.25	22%	NP_740787.2
C02F5.3 [Caenorhabditis elegans]	33.5	33.5	9%	0.35	37%	NP_498808.2
T07A9.9, isoform b [Caenorhabditis elegans]	33.5	33.5	31%	0.42	27%	NP_741289.1
T07A9.9, isoform a [Caenorhabditis elegans]	33.1	33.1	31%	0.56	27%	NP_741288.1
D1079.1 [Caenorhabditis elegans]	32.0	32.0	12%	0.91	31%	NP_508758.2

MTCU-1 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_493573.1| Length: 439 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)
Range 1: 2 to 439

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
207 bits(528)	3e-60()	Compositional matrix adjust.	165/497(33%)	237/497(47%)	65/497(13%)	
Features:						
Query	34	ATIFALSSGQRCGIAVIRTS	SGPASGHALRILT-----	APRDLPLARHASLRL	SDPRSG	88
Sbjct	2	+TIFALSSG	IA+ R SG S LR L+	P+ + +	L D S	54
Query	89	EPLDRALVLFPGPQSFTGED	CVFHVHGGPAVVS	GVQLQALGVS	PGLRPAEAGEFTRRAF	148
Sbjct	55	+ +D A+ ++ PGP++FTGED	EF +HG AV	L + +R A+	GEFTRRAF	114
Query	149	ANGKLNLTVEGLADLIHAETE	AQRRLQRLD	GELGHL	CRGWAETLTKALAHVEAYIDF	208
Sbjct	115	NGKL+++EV G+ LI + TE +R	A Q+ G G	+ L + L+ +	IDF	172
Query	209	HNGKLSISEVRGIDRLIKSR	TEKERNAAFGQMRG--	GVRAIEIRKQLIQILSKL	FVIIDF	268
Sbjct	173	GEDDNLEEGVLEQGGSTW	WMGRKTPHISQRLPSLSLS	ACLSPADIEVRALQVALGAH	GE NLE R+ + L L+ R ++ GA	205
Query	269	GEHVNLE-----LREA	QQDVSEILHELN-----	RMIAKAWDGAE		328
Sbjct	206	LRDARRGQRLRS	GVHVVTGPPNAGKSS	LVNLLSRKPV	SIVSPEPGTTRDVL	ETPVDLAG
Query	329	R QR G+ +V+ G PM+GKSS	+N L+ V+IVS	PGTTRD	LET + + G	257
Sbjct	258	-----RAQR---GLD	IVLYGRPN	SGKSSILNQLA	HDDVAIVSSIPGTT	RDSLETIIQING
Query	388	FPVLLSDTAGLREGVGPV	-EQEGVRRARERLEQ	ADLILAML	DASDLASPSSCNFLATVVA	387
Sbjct	316	L+DTAG+R+ V E EG+RRA	+R++ AD+I ++D +	+ L V		315
Query	448	VRCRLDTAGVRQK	TNDVIEAEGIRRAQKR	IQSADII	CVVDPQFTSDDDVES	ILNDV--
Sbjct	316	SVGAQSPSDSSQRL	LLLVLNKSDLLS	PEGPGPDP	PPHLLLSCLT	GEGLDGLLEALRKEL
Query	507	---EVMRNREARV	IIAKNKSDL-----	SLKYPKLP	SN-FTTVSTNATT	DGCKQLQNCL
Sbjct	366	AAVCGDPSTDP	PLLTRARHQHHL	QGLDALG	HYKQSKDL	LALAAEALRVARGHL
Query	508	GEIVDDLCP	EASYLDA---DLL	RRCSFELES	AVTCNDAAIMCSH	LEVALEQIGELTEGI
Sbjct	423	GTEEILDII	FQDFCVGK	524		
Query	423	TE +LD IF	FC+GK	439		
Sbjct	423	VTESVLDG	IFSKFCIGK	439		

BLAST de MnmG (*E. coli*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]	480	480	98%	6e-161	41%	NP_496169.1
M04B2.4 [Caenorhabditis elegans]	32.3	32.3	13%	0.96	24%	NP_502171.1
ZYG-12, isoform c [Caenorhabditis elegans]	32.3	32.3	15%	1.2	29%	NP_001293520.1
ZYG-12, isoform b [Caenorhabditis elegans]	32.3	32.3	15%	1.2	29%	NP_001293519.1
ZYG-12, isoform d [Caenorhabditis elegans]	32.3	32.3	15%	1.3	29%	NP_001293521.1
F37C4.6, isoform a [Caenorhabditis elegans]	32.0	32.0	5%	1.3	41%	NP_500428.1
ZYG-12, isoform a [Caenorhabditis elegans]	32.0	32.0	15%	1.4	29%	NP_001293518.1
Y53F4B.27, isoform a [Caenorhabditis elegans]	30.8	30.8	8%	2.9	28%	NP_001022467.1
F40G12.7 [Caenorhabditis elegans]	30.0	30.0	7%	3.2	28%	NP_506534.1
Y53F4B.27, isoform b [Caenorhabditis elegans]	30.8	30.8	8%	3.4	28%	NP_001022468.1
C15B12.8 [Caenorhabditis elegans]	30.4	30.4	4%	3.4	45%	NP_741814.2

MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_496169.1| Length: 638 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)

Range 1: 18 to 637

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
480 bits(1235)	6e-161()	Compositional matrix adjust.	262/637(41%)	389/637(61%)	32/637(5%)	

Features:

Query	8	DVIIIGGGHAGTEAAMAAARMGQOTLLLT	67
Sbjct	18	DVIIVGGHAG E+A AAAR G T+L+T N +T+G+MSCNP+ GGIGKGHL++EVDAL	77
Query	68	GLMAKAIQAGIQFRILNASKGPAVRATRAQADRVLYRQAVRTALENQPNLMIFQQAVED	127
Sbjct	78	GLCARICDKSAITYQALNRAQGPVAVLGLRAQIDRKLKLYTQMONEINSTKRLEIGEVEAE	137
Query	128	LIVENDRVVGAVTQMGLKFRKAVVLTGTFDLGKIHLGDNYSGGRAGDPPSIPLSRRL	187
Sbjct	138	LLVENGKIVGIRMMNETVIRTCKVVITGTFFLRAQIQGMKTPAGRIGEKSSDRLESSEF	197
Query	188	RELPLRVGRKLTGTTPRIDARTIDFSVLAQQHGD-NPMPVFSFMGNAS--QHPQQVPCYI	244
Sbjct	198	LKHGFEFGRLRTGTTPRLMKDSINFSKFERVAPDRTPIP-FSFLTKNVWISYEDQLPTYL	256
Query	245	THTNEKTHDVIRSNLDRSPMYAGVIEGVPRYCPSEDKVMRFADRNOHQIFLEPEGLTS	304
Sbjct	257	GHTNDEVCRIGNENMHEN--YQVASETSPRYCPSLESKLLRFP-KLHHRFLLEHEGLDS	313
Query	305	NEIYPNGISTSLPFDVQMIVRSMQGMENAKIVRPGYAEYDFDPRDLKPTLESKFIQG	364
Sbjct	314	PHIYPQGMSLTFKPEVQTQLLRAIPGLENVEIFQPGYGVQYDFVNPQKLRLETRKVEG	373
Query	365	LFFAGQINGTTGYEEAAAQGLLAGLNAARLSADKEGWAPARSQAYLGVVDDDLCTLGTE	424
Sbjct	374	MFLAGQINGTTGYEEAAAQGVVAGINASARAQNEPGMEVSRTEGYIGVLIDDLTSLGTNE	433
Query	425	PYRMFTSRAEYRLMLREDNADLRLTEIGRELGLVDDERWARFNE---KLENIERERQRLK	481
Sbjct	434	PYRMLTSRAEFRLYLRPDNADIRLTELGRRHNAISDNRWAIPTETKGELENLQRTTEEMK	493
Query	482	ST---W--VTPSAEAAAENAHLTAPLSREASGEDLLRRPEPTYEKLTTLTFPAPALTDE	536
Sbjct	494	MSMVKWKRIIPKLAATSRNDGKVLSAF-----DLIHRDYLDKSDLEL-----CLKDK	540
Query	537	QAAEQVEIQVKYEGYIARQQDEIEKQL----RNENTLLPATLDYRQVSGLSNEVIAKLND	592
Sbjct	541	NIGEDILERLKIIEGRYQMEHERMKAKKQEIRESATAIPDNTDFSTMRGMSLECIEKLER	600
Query	593	HKPASIGOASRISGVTAAISILLVWLKOGMLRRSA	629
Sbjct	601	ARPRNLAAATRISGITPEAIVVLMRHLKNPAPVRSSA	637

BLAST de MTO1 (*S. cerevisiae*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]	491	491	94%	2e-164	42%	NP_496169.1
hypothetical protein F10C5.2 - Caenorhabditis elegans	31.2	31.2	9%	3.0	30%	T16022
MAT-3 [Caenorhabditis elegans]	31.2	31.2	9%	3.0	30%	NP_497203.1
Hypothetical protein C51G7.5 [Caenorhabditis elegans]	30.4	30.4	7%	3.6	33%	AAF39776.2
F33H12.1 [Caenorhabditis elegans]	30.0	30.0	18%	5.1	28%	NP_494303.1
WAH-1, isoform c [Caenorhabditis elegans]	30.0	30.0	7%	5.6	33%	NP_001263729.1
WAH-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	30.0	30.0	7%	5.9	34%	NP_499564.2
oxidoreductase WAH-1 [Caenorhabditis elegans]	30.0	30.0	7%	6.3	34%	AAN60212.1

MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_496169.1| Length: 638 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)
range 1: 15 to 631

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
491 bits(1263) 2e-164() Compositional matrix adjust. 267/635(42%) 395/635(62%) 22/635(3%)						
Features:						
Query	35	TKTQVVVIGAGHAGCEAAAASSRTGAHTTLITPSLTDIGKCSNPSIGGVGKILVKEID	94			
Sbjct	15	TDVDVIVIGGGHAGCESAAAAARCGSNTVLVTQNKNTIGEMSCNPSFGGIGKGLHIREVD	74			
Query	95	ALDGLMGKVTDLAGVQFKMLNRSKGPVAVGPRAGIDRELYKKYMQRELSDKKAHPNLSLL	154			
Sbjct	75	ALDGLCARICDKSAITYQALNRAQGPVAVLGLRAQIDRKLKTYKQMQNEINSTK---RLEIL	131			
Query	155	QNKVADLILYDPGCGHKVIKGVVLDGDTQVQADQVITITGTFLSAEIHIGDKRIAGRIG	214			
Sbjct	132	EGEVAELLVENGK-----IVGIRMMNETVIRTKCVVITITGTFLRAQIYQGMKTWPAGRIG	186			
Query	215	EQPTYGISNTLQNEVGFQGLRKTGTPARLAKESIDFSALEVQKGDALPVPMSFLNETVS	274			
Sbjct	187	EKSSDRLSSESFLKH-GFELGRLRTGTPPRLMKDSINFSKFERVAPDRTPIPFSFLTKNVW	245			
Query	275	VEPTKQLDCFGTHHTTPQMDFLRNNLHQSIHIQDTTIKGPRYCPSIEAKILRFPDRSSHK	334			
Sbjct	246	ISYEDQLPTYLGHNTDEVCRIGNENMHENYQVASETT-SPRYCPSLESKLLRFP-KLHHR	303			
Query	335	IWLEPEGFNSDVIYPNGISNSMPEDVQLQMMRLIPGMANVEILOPAYGVEYDYVDPRLK	394			
Sbjct	304	LFLEHEGLDSPHIYPQGMSLTFKPEVQTQLLRAIPGLENVEIFQPGYGVQYDFVNPQQLK	363			
Query	395	PSLETKLVDGLFLAGQINGTTGYEAAAQGIAGINAGLLSRQEREQLVLRSEAYIGVL	454			
Sbjct	364	RTLETRKVEGMFLAGQINGTTGYEAAAQGVVAGINASARAQNE-PGMEVSRTEGYIGVL	422			
Query	455	IDDLINNGVIEPYRMFTSRSEFRISVRADNADFRLTPIGAQLGIISPVRLSQYSRDKHLY	514			
Sbjct	423	IDDLTSLGTNEPYRMLTSRAEFRLYLRPDNADIRLTELGRRHNAISDNRWAIFTETKDEL	482			
Query	515	DETIRALQNFKLSSQKWSLLQANIAPQAEHR---SAWEIFRFKDMDLHKLYECIPDLP	570			
Sbjct	483	NNLTQRTEEMKMSMKWKRII-PKLAATSRNDGKVLSAFDLIHRYDLDKSDLELCLKDD--	539			
Query	571	INLLDIPMHVVTKINIQKGYEYIVKQNFVKAQADENMLLPQDYRQLPTLSTECKL	630			
Sbjct	540	---KNIGEDILERLKIERYQMEHERMKAKKQIDRESATAIPDNTDFSTMRGMSLEICIE	596			
Query	631	LLNRVQPLTIGQARRIQGITAAALFELYRVARKPS 665				
Sbjct	597	KLERARPRNLAAATRISGITPEAIVVLMRHLKNPA 631				

BLAST de MTO1 (*H. sapiens*) en el proteoma de *C. elegans*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]	588	588	90%	0.0	48%	NP_496169.1
JHDM-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	42.0	42.0	27%	0.001	22%	NP_498419.2
JHDM-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	38.9	38.9	24%	0.013	24%	NP_498418.2
DLD-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	33.5	33.5	11%	0.62	32%	NP_001255810.1
F37C4.6, isoform a [Caenorhabditis elegans]	32.7	32.7	4%	1.1	41%	NP_500428.1
ADSS-1, isoform b [Caenorhabditis elegans]	32.0	32.0	17%	1.6	26%	NP_741530.1
ADSS-1, isoform a [Caenorhabditis elegans]	32.0	32.0	17%	1.8	26%	NP_741529.1
C15B12.8 [Caenorhabditis elegans]	31.6	31.6	46%	1.8	23%	NP_741814.2
hypothetical protein C15B12.1 - Caenorhabditis elegans	30.8	30.8	14%	3.8	30%	T15503

MTCU-2 [Caenorhabditis elegans]

Sequence ID: ref|NP_496169.1| Length: 638 Number of Matches: 1

See 2 more title(s)
range 1: 18 to 629

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Fra
588 bits(1517)	0.0()	Compositional matrix adjust.	320/669(48%)	426/669(63%)	60/669(8%)	
Features:						
Query	38	DVIVIGGGHAGTEAATAAARCGSRTLLLRVDTIGQMSCNPSFGGIGKGHLMREVDALD				97
Sbjct	18	DVIVIGGGHAG E+A AAARCGS T+L+T +TIG+MSCNPSFGGIGKGHL+REVDALD				77
Query	98	GLCSRICDOSGVHYKVLNRRKGPVAVGLRAQIDRKLYKQNMQKEILNTPLLTVQEGAVED				157
Sbjct	78	GLC+RICD+S + Y+ LNR +GPAV GLRAQIDRKLYK MQ EI +T L + EG V +				137
Query	158	LILTEPEEHTGKCRVSGVVLVDG5TVYAESVILTTGTFLRGMIVIGLETHPAGRLGDQP				217
Sbjct	138	L++ GK + G+ +++ + + + V++TTGTFLR I G++T PAGR+G++				189
Query	218	SIGLAQTLEKLGFFVGRKLTGTPPRIAKESINF5ILNKHIPDNPSIPFSFTNETVWIKPE				277
Sbjct	190	S L+++ K GF +GRL+TGTPPR+ K+SINFS + PD IPFSF + VWI E				249
Query	278	DQLPCYLHTNPRVDEIVLKNLHNSHVKETTRGPRYCPSIESKVLRFNRLHQVWLEPE				337
Sbjct	250	DQLPTYLGHNTDEVCRIGNENMHENYQVASETTSPRYCPSLESKLLRFPKLNHRLFLHE				309
Query	338	GMSDLIYPQGLSMTLPAELQEKMITCIRGLEKAKVIOPGYGVQYDYLDPQITPSLETH				397
Sbjct	310	G+DS IYPQGS+T E+O +++ I GLE ++ QPGYGVQYD+++P+Q+ +LET				369
Query	398	LVQRLFFAGQINGTTGYEEAAAQTECCSVARLECCSDMISQLQAILLPQPSLVAGTAGMH				457
Sbjct	370	V+ +F AGQINGTTGYEEAAA-----				391
Query	458	NTQGVAGINASLRVSRKPPFVVSRTEGYIGVLIDDLTTLTGTSEPYRMFTRSRVEFRLSLR				517
Sbjct	392	QGV+AGINAS R +P VSRTEGYIGVLIDDLT+LGT+EPYRM TSR EFRL LR				449
Query	518	PDNADSRRLTRGYKDAGCVSQQRYERACWMKSSLEEGISVLKSIEFLSSKWKLIPE-AS				576
Sbjct	450	PDNAD RLT G + +S R+ K L + ++ KWK++IP+ A+				508
Query	577	ISTSRSLPVRALDVLKYEVDMDLSLAKAVPEPLKYYTKCRELAERLKIATYEVSLFHQL				636
Sbjct	509	S + + A D++ ++D L LK ++ ERLKIE Y+ + H+				562
Query	637	QEIKG--VQQDEALQPKDLDYLTIRDVLSHEVREKLFHSRPTIGAASRIPGVTPAAI				694
Sbjct	563	+ K + ++ A +P + D+ T+R +SL E EKL +RP+ + AA+RI G+TP AI				620
Query	695	INLLRFVKT 703				
Sbjct	621	+ L+R +K VVMRHLKN 629				

Anexo IV. Predicción de la localización mitocondrial de MTTU-1, MTCU-1 y MTCU-2 por MitoProt II.

MTTU-1

Input sequence length : 375 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

```

Net charge of query sequence      : -2
Analysed region                   : 26
Number of basic residues in targeting sequence : 4
Number of acidic residues in targeting sequence : 1
Cleavage site                     : not predictable
Cleaved sequence                  :

```

HYDROPHOBIC SCALE USED

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	1.318	1.547	0.200	0.587
MesoH	-0.824	0.094	-0.392	0.124
MuHd_075	31.070	20.829	9.473	7.666
MuHd_095	19.878	20.092	4.268	5.501
MuHd_100	26.849	21.589	5.794	6.490
MuHd_105	29.932	19.364	5.856	6.261
Hmax_075	16.500	15.750	3.386	6.560
Hmax_095	19.163	23.712	3.795	6.965
Hmax_100	19.100	23.300	3.714	6.860
Hmax_105	14.000	17.700	2.993	5.760

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.2020

MTCU-1

Input sequence length : 439 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

```

Net charge of query sequence      : +1
Analysed region                   : 50
Number of basic residues in targeting sequence : 9
Number of acidic residues in targeting sequence : 0
Cleavage site                     : 41
Cleaved sequence                  : MSTIFALSSGTLPSAIAMFRVSGSQLPVLRLSRRKVK

```

HYDROPHOBIC SCALE USED

	GES	KD	GVH1	ECS
H17	1.906	1.494	0.245	0.580
MesoH	-0.730	0.534	-0.266	0.230
MuHd_075	54.672	29.493	13.239	11.637
MuHd_095	44.572	22.361	10.386	9.450
MuHd_100	41.376	20.943	9.064	9.141
MuHd_105	27.242	15.876	7.010	6.552
Hmax_075	13.650	11.433	1.153	4.520
Hmax_095	13.700	12.338	2.037	3.960
Hmax_100	16.500	14.900	2.316	4.780
Hmax_105	15.750	15.633	2.841	5.600

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.9925

MTCU-2

Input sequence length : 638 aa

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : +9
Analysed region : 15
Number of basic residues in targeting sequence : 4
Number of acidic residues in targeting sequence : 0
Cleavage site : not predictable
Cleaved sequence :

HYDROPHOBIC SCALE USED

	GES	KD	GVH1	ECS
H17 :	0.871	1.224	0.142	0.529
MesOH :	-0.640	0.259	-0.281	0.172
MuHd_075 :	13.240	14.714	4.552	5.101
MuHd_095 :	44.765	27.248	10.854	10.568
MuHd_100 :	46.323	26.332	12.135	10.359
MuHd_105 :	41.773	21.407	11.792	8.921
Hmax_075 :	2.200	11.800	1.332	2.110
Hmax_095 :	7.613	12.862	1.675	3.806
Hmax_100 :	6.100	11.500	1.389	3.370
Hmax_105 :	15.600	14.300	3.609	4.000

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.9459

Anexos

MTCU-2

MnmG[E. coli]	-----MFYDPDFVIIIGGGHAGTEAAMA	24
MT01[S. cerevisiae]	ML-----RVTTLASSCTSFPLQVLRRLR TISSLTSFQPTTKQVVVIGAGHAGCEAAAA	54
MTCU-2[C. elegans]	-----MLSKS-----TRLLRRCFQTDVDVIVIGGGHAGCESAAA	34
MT01[H. sapiens]	MFYFRGCGRWAVSFTKQFPLARL-----SSDSAAPRTPHFDVIVIGGGHAGTEAATA	54
	:*:::*:*:*:*:*:*	
MnmG[E. coli]	AARMGQQLLLLTHNIDTLGQMSCNPAIGGIGKGLH VKEVDALGGLMAKAIQAGIQFRIL	84
MT01[S. cerevisiae]	SSRTGAHTTLITPSLTDIGKCSNPSIGGVGKILVKEIDALDGLMGKVTDLAGVQFKML	114
MTCU-2[C. elegans]	AARCGSNTVLVTQNKNTIGEMSCNPSFGGIGKGLHIREVDALDGLCARICDKSAITYQAL	94
MT01[H. sapiens]	AARCGSRTLLLTHRVDITIGQMSCNPSFGGIGKGLHREVDALDGLCSRICDQSGVHYKVL	114
	:* * . . :*: * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	NASKGPAVRATRAQADRVLRYQAVRTALEN---QPNLMIFQQAVEDLIVEN-----D	133
MT01[S. cerevisiae]	NRSKGPVAVGPRAQIDRELYKYMRELSDKKAHPNL SLLQNKVADLILYDPGCG---HK	171
MTCU-2[C. elegans]	NRAQGPVAVLGLRAQIDRKLKTKQMQNEINS---TKRLEILEGEVAELLEN-----G	143
MT01[H. sapiens]	NRKGPVAVWGLRAQIDRKLKTKQMQKEILN---TPLLTVQEGAVEDLILTEPEPEHTGKC	171
	* : * * * * . * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	RVVGAVTQMGLKFRKAVVLTGTFLDGKIHIGLDNYSGGRAGDPPSIPLSRRLR-ELPL	192
MT01[S. cerevisiae]	VIKGVVLDGTVQVADQVITTTGTFLSAEIHIIGDKRIAAGRIGEPTYGISNTLQNEVGF	231
MTCU-2[C. elegans]	KIVGIRMMNETVIRTKCVITTTGTFLRAQIYQGMKTPWAGRIGEKSDDLSEFSL-KHGF	202
MT01[H. sapiens]	RVSGVVLVDGSTVYAESVILTTGTFLRGMIVIGLETHPAGRLGDQPSIGLAQTLE-KLGF	230
	: * : * : * * * * . * * . . * * * * : : : : : : : :	
MnmG[E. coli]	RVGRLKTGTTPRIDARTIDFVSLAQHGDNPMPVFSFMGNASQ--HPQQVPCYITHTNEK	250
MT01[S. cerevisiae]	QLGRLKTGTTPARLAKESIDFSALEVQKGDALPVPMSFLNETVSVPEPTKQLDCFHTHTTPQ	291
MTCU-2[C. elegans]	ELGRLRTGTPRMLKDSINFKFERVAPDRTPPFSLTKNVWISYEDQLPTYLGHNDNE	262
MT01[H. sapiens]	VVGRLLKTGTTPRIAKESINFILNKHIPDNPSIPFSFTNETVWIKPEDQLPCYLTHTNPR	290
	: * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	THDVIRSNLDRSPMYAG--VIEGVPRYCPISIEDKVMRFADRNQHQIFLEPEGLTSNEIY	308
MT01[S. cerevisiae]	MHDFLRNNLHQSIHQ---DTTIKGPYCPISIEAKILRFPDRSSHKIWLEPEGFNSDVIY	348
MTCU-2[C. elegans]	VCRIGNENMHENYQVA---SE--TSPRYCPSLESKLLRFPKL-HHRLFLEHEGLDSPHIY	317
MT01[H. sapiens]	VDEIVLKNLHLNSHVK---ET-TRGPRYCPISIESKVLRFPNR-LHQVWLEPEGMDSOLIY	345
 * * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	PNGISTSLPFDVQMQUIVRSMQGMENAKIVRPGYAIYDFDPRDLKPTLESKFIQGLFFA	368
MT01[S. cerevisiae]	PNGISNSMPEDVQLQMMRLIPGMANVEILQPAYGVEYDVPDRQLKPSLETKLVDGLFLA	408
MTCU-2[C. elegans]	PQGMSLTFKPEVQTQLRAIPGLENVEIFQPGYGVQYDFVNPQKLKRTLETRKVEGMFLA	377
MT01[H. sapiens]	PQGLSMTLPAELQEKMITCIRGLEKAKVIQPGYGVQYDYLDPQITPSLETHLVQRLFFA	405
	: * * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	GQINGTTGYEEAAA-----QGLLAG	388
MT01[S. cerevisiae]	GQINGTTGYEEAAA-----QGIAG	428
MTCU-2[C. elegans]	GQINGTTGYEEAAA-----QGVVAG	397
MT01[H. sapiens]	GQINGTTGYEEAAQTECCSVARLECSDMI SQLQAILLPOPSLVAGTAGMHHNTQGVVAG	465
	* * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	LNAARLSA-DKEGWAPARSQAYLVLDLCTLTGKPEYRMFTSRAEYRLMLREDNADLR	447
MT01[S. cerevisiae]	INAGLLSRQEREQLVLRSEAYIGVLDLIDNNGVIEPYRMFTSRSEFRISVRADNADFR	488
MTCU-2[C. elegans]	INASARAQ-NEPGMEVSRTEGYIGVLDLIDLSTGNETPYRMLTSRAEFRLYLRPDNADIR	456
MT01[H. sapiens]	INASLRVS-RKPPFVVSRTTEGYIGVLDLIDLTGSEPYRMFTSRVEFRLSLRPNADSR	524
	: * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	LTEIGREL-GLVDDERWARFNEKLENIERERQRLKSTWVTPSAEAAA-EV-NAHLTAPLSR	505
MT01[S. cerevisiae]	LTPIGAQL-GIISPVRLSQYSRDKHL YDETIRALQNFKLSSQKWSLLQANIAPQA---E	544
MTCU-2[C. elegans]	LTELGRRHNA-ISDNRWAI FTETKGNLNTQRTEEMKMSVWKRIIPKLAATS RNDGK	515
MT01[H. sapiens]	LTLRGYKDAGCVSQRYERACWMSLSLEEGISVLK SIEFLSSKWKKL IPEASISTSRSL	583
	* : * . . . : : : : : : *	
MnmG[E. coli]	EASGEDLLRRPEMTEYKLTTLTPFAPA---LTDEQAAEQVEIQVYEGYIARQQDEIEKQ	562
MT01[S. cerevisiae]	NRSAWEIFRFKMDMLHKL YECIPDLINLLDIPMHVVTKINIQQKYEPYIVKQNFVKAF	604
MTCU-2[C. elegans]	VL SADF L IHRYDLKSDLE----LCLKDKNIGEDILERLKI EGRYQMEHERMAKAKQEI	570
MT01[H. sapiens]	PVRALDVLKYEEVDMDSLAKAVP-EPLKKYTKRELAERLKIEATYESVLFHQLEIKGV	642
	: : : : : * : : * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	LRNENTLLPATLDYRQVSGLS--NEVIAKLNDHKPASIGQASRISGVTPAAISILLVWLK	620
MT01[S. cerevisiae]	QADENMLLPQDYDRQLPTLS--TECKLLNRVQPLTIQARRIQGITAAALFEL YRVAR	662
MTCU-2[C. elegans]	DRESATAIPDNTDFSTMRGMSL--ECIEKLERARPNLAAATRISGITPEAIVVLMRHLK	628
MT01[H. sapiens]	QQDEALQLPKDLDYLTIRDVLSHEVREKLFHSRQPTIGAA SRIPGVTPAAIINLRFVK	702
	. . : * * : : : * * * * . * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *	
MnmG[E. coli]	KQGMLRISA-----	629
MT01[S. cerevisiae]	KPSQPM-----	669
MTCU-2[C. elegans]	NPAPVRSSAV-----	638
MT01[H. sapiens]	TTQRQSAMNESSKTDQVLCADADLQEREL	732