



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología.

Estudio de la función de FASTKD3 en la mitocondria.

Presentada por **Rebeca Torres Merino** para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid.

Dirigida por:

Miguel Ángel de la Fuente García

María Simarro Grande

Valladolid, 2015.



Universidad de Valladolid

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1.c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la Uva)

D. Miguel Ángel de la Fuente García, con D.N.I. nº 12368513X, profesor del departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología. Facultad de Medicina-IBGM, Universidad de Valladolid, y Dña. María Simarro Grande con D.N.I. nº 33960854C, profesora asociada del departamento de Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Medicina Legal y Forense. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid; como directores de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de la función de FASTKD3 en la mitocondria**” presentada por Dña. Rebeca Torres Merino, alumno del programa de doctorado en Investigación Biomédica impartido por el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología.

Autorizan la presentación de la misma, considerando que el trabajo de Tesis Doctoral que se presenta constituye un trabajo de investigación original y que el doctorando satisfizo todos los requisitos legales y superó con éxito su periodo de aprendizaje y especialización.

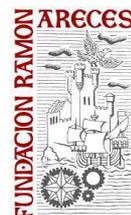
Valladolid, 26 de Octubre de 2015.

El trabajo realizado en esta tesis ha sido financiado por:

- Consejería de Educación. Junta de Castilla y León (VA244A11-2).
- Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, FIS (PI10/02511).
- Fundación Ramón Areces (CIVP16A1843).
- Beca Fundación Ramón Areces de doctorado (29 meses).



Instituto
de Salud
Carlos III



A mi familia y a David

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, con su ayuda y apoyo han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, tanto en el laboratorio como fuera de él.

En primer lugar, dar las gracias a Miguel y María, mis directores de tesis, por haberme dejado formar parte de su equipo, por confiar en mí, por sus consejos, por su paciencia y por enseñarme tantas técnicas diferentes y tan novedosas. Muchas gracias de todo corazón.

A Alejandra, mi compañera y amiga, que me ha enseñado mucho de lo que hoy se. Gracias por todos esos momentos, buenos y no tan buenos, compartidos dentro y fuera del laboratorio

A Bea, por esas charlas en el cuarto de cultivos, por sus consejos y por los ánimos que en todo momento me ha dado.

A la gente que forma parte del grupo de la planta baja, por todas esas risas en los cafés, las comidas, y en las salidas. Porque siempre estáis de buen humor y se lo contagiáis al resto. Porque os gusta celebrar todo. Espero que sigáis celebrando muchas más con esas ganas que vosotras ponéis.

A todos los que han pasado en estos años por el laboratorio B4 y que recientemente se están incorporando.

Y como no, agradecer a toda la gente que me ha apoyado tanto fuera del IBGM.

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de estudiar lo que siempre me ha gustado. Por confiar en mí, por apoyarme en todo momento, por sus consejos y sobre todo, por el cariño que siempre me muestran. Por transmitirme siempre que las cosas no me van mal, sino que es porque algo mejor me está esperando. Estoy muy orgullosa de tener unos padres como vosotros.

A mi hermana, que aunque todavía pasamos mucho tiempo discutiendo como si fuésemos niñas pequeñas, siempre tiene una sonrisa en la boca. Estoy encantada de tener una hermana como tú.

Y como no, a David, mi novio de toda la vida, con quien he compartido todo en esta vida desde que íbamos al parvulario juntos. Serían mil cosas las que te tengo que agradecer, por eso sólo te digo, mil gracias por todo. Te quiero mucho.

A toda mi familia, tanto materna como paterna por todo su apoyo y cariño.

A mis amigos y amigas, por estar siempre ahí, por esos momentos que hemos disfrutado. Espero que siempre sigamos unidos.

RESUMEN

La mitocondria es un orgánulo intracelular que está involucrado en diferentes vías metabólicas, pero su principal función es la producción de la mayor parte de la energía que requiere la célula para su funcionamiento mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Trece de las proteínas que forman parte de los complejos mitocondriales son codificadas por el DNA mitocondrial. La mitocondria posee maquinaria de transcripción y traducción propias.

Una de las familias de proteínas mitocondriales descubiertas recientemente, ha sido la familia FAST (*Fas-activated Serine/Threonine phosphoprotein*), que incluye cinco miembros (FASTKD 1-5), además de FAST, el miembro fundador. Todos ellos poseen un dominio RAP, mediante el cual se unen al RNA. Muy recientemente se ha descrito la importancia de FAST, FASTKD2, FASTKD4 y FASTKD5 en la regulación del metabolismo del RNA mitocondrial y traducción mediante ensayos de silenciamiento y en modelos KO, con importantes consecuencias en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Nuestro grupo ha descrito previamente que el silenciamiento de FASTKD3 produce alteraciones en la respiración mitocondrial. En este trabajo de tesis, estudiamos los mecanismos moleculares que subyacen en esta alteración. Hemos generado como herramienta de trabajo una línea celular U2OS FASTKD3 *knockout* mediante el uso de un plásmido donante y nucleasas TALENs (*Transcription Activator Like Effector Nucleases*).

Nuestros estudios, mediante *Northern-blot* y qRT-PCR, revelan que la ausencia de FASTKD3 produce un aumento de los niveles basales de 6 de los 13 mRNAs mitocondriales (ND2, ND3, ND4/4L, COX2, CytB y ATP6/8), y también observamos que sus vidas medias están alargadas. Nuestros estudios de mapeo revelan que el dominio RAP, y en particular, cinco de sus aminoácidos altamente conservados, son claves en esta función de FASTKD3.

Asimismo, nuestros estudios de traducción mitocondrial revelan una disminución específica en la traducción del transcrito COX1, subunidad clave en el funcionamiento del complejo IV mitocondrial.

En conclusión, esta tesis introduce a FASTKD3 como un elemento clave en la estabilidad de los transcritos mitocondriales ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB y como regulador de la traducción de COX1. Esta importante investigación abre las puertas para encontrar relaciones entre nuestra molécula de estudio y enfermedades mitocondriales que puedan estar asociadas a ella, pudiendo dar una explicación precisa de los mecanismos moleculares responsables de las mismas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
INTRODUCCIÓN	XII
1. MITOCONDRIA	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Genoma mitocondrial	3
1.3. Síntesis y maduración del RNA mitocondrial	4
1.4. Traducción mitocondrial	10
2. FAMILIA FAST	11
2.1. Generalidades	11
2.2. Miembros de la familia FAST	13
2.2.1. FAST	13
2.2.2. FASTKD1	16
2.2.3. FASTKD2	16
2.2.4. FASTKD3	17
2.2.5. FASTKD4	19
2.2.6. FASTKD5	19
3. MODIFICACIÓN GENÉTICA DIRIGIDA	20
3.1. Mecanismos de reparación del DNA	20
3.2. Modificación génica dirigida	22
3.2.1. Mecanismos de transferencia génica	22
3.2.2. Modificación génica mediante nucleasas	27
3.2.2.1. <i>Zinc Finger Nucleases (ZFNs)</i>	27
3.2.2.2. <i>Transcription activator-like effector (TALE) proteins</i>	28
3.2.2.3. <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)</i> y su asociación con genes cas	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. MATERIALES	41
1.1. Líneas celulares	41
1.2. Medios de cultivo	41
1.3. Cepas bacterianas	42
1.4. Plásmidos	42

2. MÉTODOS	47
2.1. Purificación de ácidos nucleicos.....	47
2.1.1. Purificación de DNA plasmídico.....	47
2.1.1.1. Purificación de plásmidos a pequeña escala (miniprep).....	47
2.1.1.2. Producción y purificación de plásmidos a mediana escala (midiprep). 47	
2.1.2. Extracción de DNA genómico a partir de cultivo celular.....	48
2.1.3. Extracción de RNA total.....	48
2.1.4. Amplificación y detección de ácidos nucleicos.....	49
2.1.4.1. Screening celular mediante PCR.....	49
2.1.4.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	49
2.1.4.2.1. Síntesis de cDNA a partir de RNA.....	49
2.1.4.2.2. Evaluación por qRT-PCR.....	50
2.1.4.3. Northern-blot.....	50
2.2. Análisis de proteínas.....	50
2.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE, acrónimo en inglés de Sodium Dodecyl Sulfate).....	50
2.2.2. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.....	51
2.2.3. Western-blot.....	51
2.3. Métodos de DNA recombinante.....	52
2.3.1. Reacción de ligación.....	52
2.3.2. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α termocompetentes.....	52
2.3.3. Transformación por choque térmico.....	53
2.3.4. Generación de plásmidos.....	53
2.3.4.1. Diseño y construcción del plásmido donante pAAV-MCS-FASTKD3. 53	
2.3.4.2. Diseño y construcción de los plásmidos pFASTKD3-FHA.....	54
2.3.4.3. Diseño y construcción de los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57 y pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ RAP.....	56
2.3.4.4. Diseño y construcción de los plásmidos pEGFP-N1-FASTKD3 wt, pEGFP-N1-FASTKD3- Δ 53-57 y pEGFP-N1-FASTKD3-N1- Δ RAP.....	57
2.4. Generación de TALENs (<i>Transcription Activator Like Effector Nucleases</i>) específicas para FASTKD3.....	58
2.4.1. Diseño y construcción de TALENs.....	58
2.4.2. Transfección con TALENs y el plásmido pAAV-MCS-FASTKD3.....	59

2.5.	Vida media de los mRNAs mitocondriales.	60
2.6.	Marcaje metabólico de proteínas de traducción mitocondrial.	60
2.7.	Cuantificación del número de copias de mtDNA.	60
2.8.	Producción y uso de lentivirus.	61
2.8.1.	<i>Producción de lentivirus.</i>	61
2.8.2.	Titulación de vectores lentivirales.	62
2.8.3.	<i>Transducción con Lentivirus.</i>	63
2.9.	Microscopía de fluorescencia.	63
	RESULTADOS	66
1.	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE LOS mtRNAs EN LA LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 <i>KNOCKOUT</i>	68
1.1.	Diseño y construcción del plásmido pAAV-MCS-FASKD3 y TALENs específicas.	69
1.2.	Transfección y <i>screening</i> celular.	73
1.3.	Comprobación de la ausencia de FASTKD3 mediante qRT-PCR y <i>Western-blot</i>	78
1.4.	Efectos de la ausencia de FASTKD3 sobre los mRNAs mitocondriales.	79
2.	ENSAYOS DE RESCATE Y DETERMINACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL DOMINIO RAP.	83
2.1.	Construcción de los plásmidos pFASTKD3-FHA wt, pFASTKD3-FHA- Δ 53-57 y pFASTKD3-FHA- Δ RAP.	84
2.2.	Construcción de los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA.	85
2.3.	Obtención de líneas celulares que expresen FASTKD3 mediante el uso de lentivirus.	87
2.4.	Expresión génica de los transcritos mitocondriales en las líneas celulares estables.	88
3.	COLOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL.	91
4.	ESTUDIO DE LAS POSIBLES CAUSAS DEL AUMENTO EN LOS NIVELES DE LOS TRANSCRITOS MITOCONDRIALES.	93
4.1.	Estudio de la vida media de los transcritos mitocondriales.	93
4.2.	Cuantificación del número de copias de mtDNA.	94
4.3.	Estudio mediante marcaje metabólico de proteínas de traducción mitocondrial.	95
	DISCUSIÓN	99
1.	ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL.	101
2.	LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 <i>KNOCKOUT</i>	102

3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL RNA MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 KO.	104
4. RECUPERACION DEL FENOTIPO DE LA LÍNEA CELULAR FASTKD3 <i>KNOCKOUT</i>	105
5. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES DE LA TRADUCCIÓN DE NOVO MITOCONDRIAL.....	108
6. VIDA MEDIA DE LOS mRNAs MITOCONDRIALES	110
7. ALTERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	1122
CONCLUSIONES	114
ANEXOS	118
1. NOMBRE Y SECUENCIA DE <i>PRIMERS</i>	120
BIBLIOGRAFÍA	122

ABREVIATURAS

- BBL1:** Plásmido de nivel 1 para la construcción de TALENs (*backbone level 1*).
- BBL2:** Plásmido de nivel 2 para la construcción de TALENs (*backbone level 2*).
- BN-PAGE:** del inglés “*Blue-Native PAGE*”.
- BrEt:** bromuro de etidio.
- BSA:** del inglés “*Bovine Serum Albumin*”.
- C I:** Complejo I.
- C II:** Complejo II.
- C III:** Complejo III.
- C IV:** Complejo IV.
- C V:** Complejo V.
- Cas9:** Proteína asociada a CRISPR con función nucleasa (*CRISPR associated*).
- cDNA:** DNA complementario.
- CMV:** citomegalovirus.
- Cp:** del inglés “*crossing-point*”.
- cPPT:** del inglés “*polipurine tract*”.
- CRE:** Proteína con función recombinasa, proveniente del bacteriófago P1.
- CRISPR:** del inglés “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”, Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas.
- crRNA:** CRISPR RNA.
- D.O:** Densidad óptica.
- DMEM:** del inglés “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*”.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- DSB:** del inglés “*Double Strand Break*”, roturas de doble cadena en el DNA.
- dsDNA:** del inglés “*double strand DNA*”, DNA de doble cadena.
- EDTA:** del inglés “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”, Ácido etilendiaminotetra acético.
- EGFP:** del inglés “*Enhanced Green Fluorescent Protein*”, proteína fluorescente verde mejorada.

EYFP: del inglés “*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*”, proteína fluorescente amarilla mejorada.

FAST: del inglés “*Fast-Activated Serin/Treonin Phosphoprotein*”.

GFP: del inglés “*Green Fluorescent Protein*”, proteína fluorescente verde.

GRSF1: del inglés “*G-Rich Sequence Factor 1*”.

h: horas.

HIV: del inglés “*Human Immunodeficiency Virus*”, Virus de la inmunodeficiencia humana.

HR: del inglés “*Homologous Recombination*”, recombinación homóloga.

HSA: del inglés “*Human Serum Albumin*”, albúmina humana.

IN: integrasa.

IRES: del inglés “*Internal Ribosome Entry Site*”.

ITR: del inglés “*Inverted Terminal Repeats*”, repeticiones terminales invertidas.

Kb: kilobases.

KO: del inglés “*knockout*”.

LB: del inglés “*Lennox Broth*”.

LoxP: Sitio que recombina mediante la acción de la proteína Cre recombinasa, para de eliminar el segmento génico situado entre dos de estos sitios.

LRPPRC: del inglés “*Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat-Containing Protein*”.

LTRs: del inglés “*Long Terminal Repeats*”, repeticiones terminales largas.

MCS: del inglés “*Multiple Cloning Site*”, sitio de clonación múltiple.

min: minutos.

MMLV: del inglés “*Moloney Murine Leukemia Virus*”, virus de la leucemia murina.

MOI: del inglés “*Multiplicity Of Infection*”, multiplicidad de infección, número de genomas virales que infectan una célula.

mRNA: RNA mensajero.

mRNA: RNA mensajero.

MRPP1: del inglés “*Mitochondrial RNase P Protein 1*”.

MRPP2: del inglés “*Mitochondrial RNase P Protein 2*”.

MRPP3: del inglés “*Mitochondrial RNase P Protein 3*”.

mtDNA: DNA mitocondrial.

MTERF1: del inglés “*Mitochondrial Transcription Termination Factor 1*”, factor de terminación de la transcripción 1.

MTPAP: del inglés “*Mitochondrial Poly(A) Polymerase*”, polimerasa poli(A) específica de mitocondria.

MTTFA: del inglés “*Mitochondrial Transcription Factor A*”, factor de transcripción mitocondrial A.

ncRNA: RNA no codificante.

nDNA: DNA nuclear.

NEAA: del inglés “*Non Essential Aminoacids*”, aminoácidos no esenciales.

NHEJ: del inglés “*Non Homologous End Joinin*”, recombinación no-homóloga.

OXPHOS: del inglés “*Oxidative Phosphorylation System*”, fosforilación oxidativa.

pb: pares de bases.

PBS: del inglés “*Phosphate Buffered Saline*”, buffer fosfato salino.

PCR: del inglés “*Polymerase Chain Reaction*”.

PIC: del inglés “*Pre-Integration Complexes*”, complejo de preintegración.

PNPasa: polinucleótido fosforilasa.

PPR: del inglés “*Pentatricopeptide Repeat*”, repetición de pentatricopéptido.

PR: proteasa.

RAP: del inglés “*RNA-binding domain abundant in Apicomplexas*”.

RBPs: del inglés “*RNA-Binding Proteins*”, proteínas de unión al RNA.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNasas: Ribonucleasas.

ROS: del inglés “*Reactive Oxygen Species*”.

rpm: Revoluciones por minuto.

RRE: del inglés “*Rev Responsive Element*”, elemento de respuesta a Rev, secuencia a la cual se une la proteína Rev.

rRNA: RNA ribosomal.

RT: del inglés “*reverse transcriptase*”, transcriptasa reversa.

qRT-PCR: del inglés “*quantitative Real Time PCR*”, PCR cuantitativa en tiempo real.

s: segundos.

SAP: del inglés “*Shrimp Alkaline Phosphatase*”, fosfatasa alcalina de camarones.

SDS: del inglés “*Sodium Dodecyl Sulfate*”, dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

SFB: del inglés “*Fetal Bovine Serum*”, suero bovino fetal.

shRNA: del inglés “*short hairpin RNA*”.

siRNA: del inglés “*small interfering RNA*”, pequeño RNA de interferencia.

SLIRP: del inglés “*SRA Stemm-Loop-Interacting RNA-Binding Protein*”.

Tag-HA: del inglés “*Human Influenza Hemagglutinin*” (HA).

TALENs: del inglés “*Transcription Activator Like Effector Nucleases*”

TAR: Secuencia diana para la transactivación lentiviral, a la cual se une TAT.

TAT: del inglés “*Trans-Activator of Transcription*”, Transactivador de la transcripción genética.

TE: Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina.

TIA-1: del inglés “*T-cell intracellular antigen 1*”, antígeno-1 intracelular de células T.

tracrRNA: crRNA trans-activador.

tRNA: RNA de transferencia.

U: Unidades

VSV-G: del inglés “*Glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus*”, glicoproteína del virus de estomatitis vesicular, que confiere un amplio tropismo a la cápside lentiviral.

WPRE: del inglés “*Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element*”, elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota.

YFP: del inglés “*Yellow Fluorescent Protein*”, proteína fluorescente amarilla.

ZFN: del inglés “*Zinc Finger Nucleases*”, nucleasas con dedos de zinc

INTRODUCCIÓN

1. MITOCONDRIA.

1.1. Generalidades.

La mitocondria es un orgánulo intracelular que está involucrado en diferentes vías metabólicas, pero su principal función es la producción de la mayor parte de la energía que requiere la célula para su funcionamiento, mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS), es decir, la respiración celular acoplada a la producción de energía en forma de ATP (Fernandez Silva et al., 2003).

La mitocondria posee dos membranas: membrana mitocondrial externa que separa el espacio intermembrana del citosol, y la membrana mitocondrial interna que separa la matriz mitocondrial del espacio intermembrana. En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas del ciclo del Krebs y de la β -oxidación de los ácidos grasos, el genoma mitocondrial y los mitorribosomas. La membrana interna, está caracterizada por poseer pliegues, a los que se denomina crestas mitocondriales, que aumentan su superficie. Esta membrana es el lugar donde se da la fosforilación oxidativa, ya que contiene los cuatro complejos de la cadena de transporte de electrones (e^-) y la ATP sintasa.

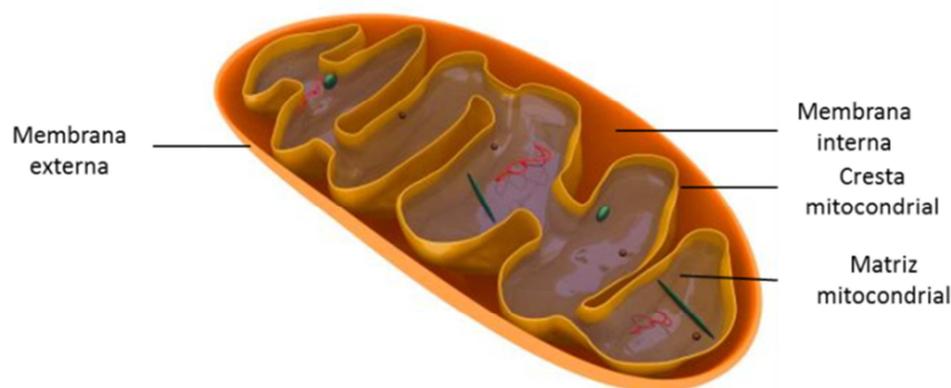


Figura 1. Imagen en la que se muestra la estructura de una mitocondria.

Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación oxidativa es la función más importante desempeñada por la mitocondria. Este sistema está formado por una cadena de transporte electrónico, integrado por cuatro complejos multienzimáticos: NADH deshidrogenasa (Complejo I o CI), succinato deshidrogenasa (Complejo II o CII), ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III o CIII) y citocromo c oxidasa (Complejo IV o CIV) y la ATP sintasa o Complejo V; además posee dos transportadores móviles de electrones que con la ubiquinona o coenzima Q (CoQ) y el citocromo c (Cyt C). El transporte de electrones comienza con los equivalentes

reductores que se originan a partir de la β -oxidación y del ciclo de Krebs que son el NADH y FADH_2 , pasando por la cadena respiratoria hasta finalmente ceder los electrones al O_2 generando H_2O . Durante este proceso se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico de protones, que será utilizado por el sistema ATP sintasa para generar energía en forma de ATP (Garesee et al., 2001). Si la fosforilación oxidativa se ve alterada, se pueden activar diferentes vías metabólicas alterando el metabolismo celular.

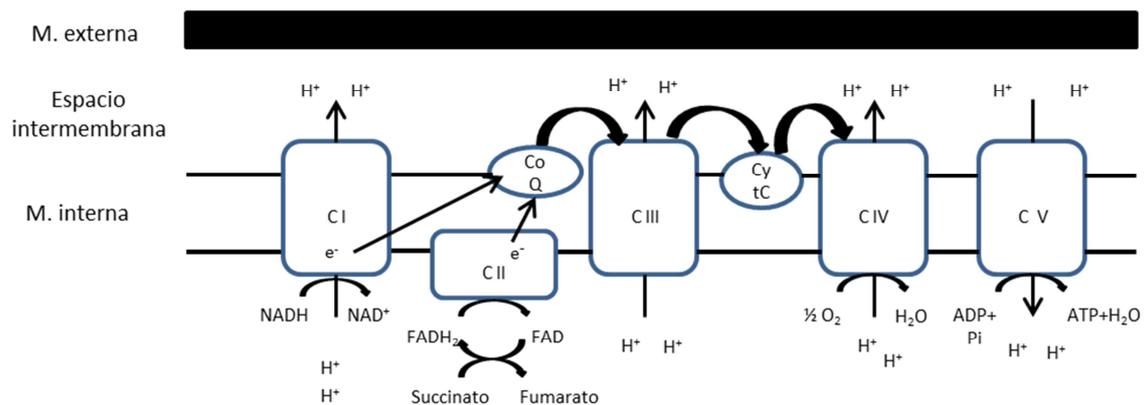


Figura 2. Imagen en la que se muestra un esquema de la cadena transportadora de electrones.

El **complejo I (NADH deshidrogenasa)**: cataliza la transferencia de e^- desde el NADH a la ubiquinona (Q) o coenzima Q (Co Q), una pequeña molécula liposoluble que al reducirse se transforma en ubiquinol QH_2 . De modo que por cada 2 e^- transferidos desde el NADH a la Co Q, cuatro protones son bombeados al espacio intermembrana, generando así un gradiente de H^+ (Andrews et al., 2013).

El **complejo II (succinato deshidrogenasa)**: cataliza la reacción de succinato a fumarato. Uno de los productos de la reacción es el FADH_2 , que transfiere los electrones al centro Fe-S para posteriormente ser cedidos a la Co Q. Este complejo no produce bombeo de H^+ , lo que se traducirá en un menor rendimiento de ATP, comparándolo con el obtenido cuando los e^- entran en la cadena a través del complejo I.

El **complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa)**, se caracteriza por poseer grupos prostéticos hemo, similares a los de la hemoglobina, con un átomo de Fe que se altera entre el estado reducido (Fe^{2+}) y oxidado (Fe^{3+}). Desde este complejo los e^- son transferidos desde el ubiquinol o Co Q al Cyt C, generando el bombeo de 2 H^+ hacia el espacio intermembrana.

El **complejo IV (citocromo c oxidasa)**, acepta 4 e⁻ del Cyt C a través de los grupos hemo, que utilizan átomos de Cu y los transfiere a una molécula de O₂, dando lugar a 2 moléculas de H₂O. Este complejo también funciona como una bomba de H⁺, haciendo que 4 H⁺ vayan hacia el espacio intermembrana.

El **complejo V (ATP sintasa)**, está formado por dos subunidades. F₀ es un complejo hidrofóbico integrado por 6 proteínas que atraviesa la membrana mitocondrial interna y constituye el canal de H⁺. La otra subunidad es la F₁ que está formada por cinco cadenas polipeptídicas diferentes (α₃, β₃, γ, δ y ε). La función principal de este complejo es la síntesis de ATP. Por cada 3 H⁺ que fluyen a través del complejo se forma una molécula de ATP.

1.2. Genoma mitocondrial.

El genoma mitocondrial presenta características diferenciales propias, como es el modo de herencia, ya que su herencia es exclusivamente de origen materno. Es una molécula circular de 16.569 pares de bases (Carew et al., 2002) y codifica para 37 genes: genes que codifican las subunidades 12S y 16S del rRNA de los mitorribosomas, genes para los 22 tRNAs, requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales y genes que codifican únicamente a 13 proteínas de las más de 85 que forman parte de los complejos del sistema OXPHOS (Weigl et al., 2013). En concreto; 7 subunidades del complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4/4L, ND5, ND6), 1 subunidad del complejo III (Cyt B), 3 subunidades del complejo IV (COX1, COX2, COX3), y 2 subunidades complejo V (ATP 6/8). El resto están codificadas por el núcleo, por lo que es necesaria una buena coordinación entre el genoma mitocondrial y nuclear, sin embargo hasta ahora se conoce muy poco acerca de los mecanismos que regulan la interacción de ambos sistemas genéticos (Attardi et al 1988; Grivell 1995).

	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Complejo V
mtDNA	7	0	1	3	2
nDNA	34	4	10	10	14

Tabla 1. Tabla en la que se indica el número de subunidades codificadas por el genoma mitocondrial y por el nuclear (Leonard et al., 2000) que están formando parte de los diferentes complejos que forman la cadena de transporte de electrones.

Otra de las características importantes del mtDNA es que posee doble cadena (cadena ligera L y cadena pesada H), dependiendo de su coeficiente de sedimentación en gradientes alcalinos de cloruro de cesio (Temperley et al., 2010); además cada cadena codifica para proteínas diferentes (**figura 3**).

Por otro lado, el número de moléculas de mtDNA es en general muy elevado y varía entre los diferentes tipos celulares, desde unas pocas copias en las plaquetas hasta unas 100.000 copias en el oocito, aunque la mayoría contienen entre 1.000 y 10.000 copias por célula, con una variación de entre 2 y 10 copias de DNA por mitocondria y cientos de mitocondrias por célula (Fernández Silva et al., 2003).

La característica estructural más importante del mtDNA es que los genes se encuentran situados uno a continuación del otro, sin apenas regiones no codificantes entre los genes. Al contrario que el genoma nuclear, en el que las regiones no codificantes son mayoritarias (Schapira 2006, Clayton 2000). La única zona del mtDNA que no codifica ningún gen es la región del bucle de desplazamiento (*D-loop*), que posee el origen de replicación de la cadena H (OH), además de los promotores de la transcripción y los elementos reguladores de la expresión génica. Para la replicación del mtDNA hacen falta dos orígenes diferentes, uno para cada cadena (OH y OL). Ambos orígenes de replicación están muy separados, haciendo que el proceso sea unidireccional y asimétrico. La síntesis del DNA se inicia en OH y la replicación continúa de modo unidireccional hasta alcanzar OL, momento en el cual comienza la síntesis de la segunda cadena del DNA.

1.3. Síntesis y maduración del RNA mitocondrial.

En humanos el DNA mitocondrial se transcribe simétricamente a partir de dos promotores unidireccionales, HSP y LSP, para las hebras pesada y ligera respectivamente, localizados en el lazo-D. La transcripción de la cadena H comienza en dos sitios, ITH1 e ITH2, mientras que la cadena ligera se transcribe a partir de uno solo, ITL1. Los transcritos a partir de ITH2 e ITL1, los cuales se localizan dentro del gen del tRNA^F, son policistrónicos y corresponden prácticamente a las secuencias completas de ambas cadenas, H y L, respectivamente (Taanman 1999). ITH1 se encuentra situado justo antes del gen del tRNA^F, y el transcrito generado a partir de él termina después de los genes ADN_r 12S y RNA_r 16S, en el gen tRNA^L. El factor de transcripción mitocondrial (TFAM) reconoce secuencias específicas en los promotores y podría jugar un doble papel como factor específico de activación de la transcripción y de empaquetador de mtDNA, así como de regulador del número de copias de mtDNA.

Los tRNAs son generalmente sintetizados como precursores inmaduros con extensiones en ambos extremos. La eliminación de estas secuencias extras es esencial para la función del tRNA. Nucleótidos extras son eliminados del extremo 5' por la actividad de la RNasa P, mientras que el procesamiento del extremo 3' es llevado a cabo por la acción de la endonucleasa RNasa Z (Rossamanith 2011).

Recientemente se ha identificado que la RNasa P está compuesta de tres subunidades proteicas, denominadas RNasa P mitocondrial 1 (MRPP1, *mitochondrial RNase P protein 1*), MRPP2 y MRPP3 (Holzmann et al., 2008). Se piensa que MRPP1 es una m1G9 metiltransferasa, responsable de la metilación que se produce en los tRNAs y que puede estar también involucrada en la capacidad de unión de la RNasa P a los tRNAs. MRPP2, posee un dominio de unión necesario para la actividad de RNasa P, es predominantemente citoplasmática, mientras que MRPP3, es una repetición de pentatricopéptido (PPR), que contiene proteínas de funciones desconocidas hasta el momento (López Sánchez et al., 2011). Estas tres subunidades son necesarias para la actividad RNasa P sobre los extremos 5' de los tRNAs. Por otro lado, ELAC2 está localizada tanto en el núcleo como en la mitocondria (Brzezniak et al., 2011), y es una RNasa Z, ya que su análisis funcional ha demostrado que está involucrado en la regulación, procesamiento y expresión de los mRNA mitocondriales (López Sánchez et al., 2011) además de la maduración de los tRNA 3' tanto en el núcleo como en la mitocondria (Rossmainth 2011).

Cuatro de los 13 genes que codifican para proteínas no están flanqueados por tRNAs, por lo que su procesamiento se realiza de forma diferente. El gen COX1 está flanqueado en su región 5' por un RNA no codificante (ncRNA), y aguas arriba del ncRNA se encuentra una secuencia que adopta una estructura similar a la de los tRNAs cuyo procesamiento es llevado a cabo por la RNasa P. Sin embargo, el procesamiento de ND6-ncRNA, RNA14-COX3 y ND5-CYTB no depende de la actividad RNasa P/Z (Sánchez et al., 2011). En el caso de ND5-CYTB, se ha demostrado que PTC2 (*pentatricopeptide-containing protein*) es necesaria para su procesamiento (Xu et al., 2008), mientras que para los otros dos, se ha visto recientemente que es GRSF1 (*G-rich sequence factor 1*), la proteína necesaria para el procesamiento de sus precursores. Al principio, GRSF1 se describió como una proteína que se expresaba de manera ubicua y que estaba implicada en *splicing*, poliadenilación, exportación y traducción de mRNAs celulares y virales. Posteriormente, se ha visto que es una proteína soluble predominantemente mitocondrial, que se une al RNA, siendo necesaria para la expresión de mtRNA y síntesis de proteínas en la mitocondria (Antonicka et al., 2013). Esta proteína posee

varias isoformas, siendo la isoforma 1 la que se ha estudiado más recientemente: colocaliza con RNA nacientes y RNasa P en un subcompartimento mitocondrial que Jourdain et al., en 2013 han denominado “gránulos de RNA mitocondrial”. Mutaciones en esta proteína, producen una desestabilización de varios mRNAs y tRNAs, produciendo una anormal biogénesis de los ribosomas y una disregulación en la síntesis de proteínas mitocondriales. (Antonicka et al., 2013 y Jourdain et al., 2013).

Las proteínas de unión al RNA (RBPs, *RNA-binding proteins*) juegan un papel muy importante en la regulación post-transcripcional de los RNAs, incluyendo *splicing*, poliadenilación, transporte y localización del RNA, estabilización del RNA y traducción tanto para los genes nucleares como mitocondriales, pero hasta el momento en la mitocondria sólo se han caracterizado dos RBPs, LRPPRC Y SLIRP. LRPPRC (*Leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein*) (Mootha et al., 2003), promueve la transcripción y la estabilidad de los mt-mRNAs y se une a su cola poli(A). SLIRP (*SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein*), es una proteína que contiene un dominio de unión al RNA, necesario para el mantenimiento de los mtRNAs que codifican para proteínas (Baughman et al., 2009). Se ha visto que mutaciones de un cambio de una C por una T en la posición 1119 del PPR que contiene el LRPPRC, provoca una variante del síndrome de *Leigh Syndrome French Canadian*, (Mootha et al., 2003). Esta enfermedad se caracteriza por una deficiencia en la actividad del complejo IV, con afectación sobre todo del cerebro y del hígado (Merante et al., 1993).

La familia de RBPs está formada por LRPPRC y otros seis miembros más, todos ellos localizados en la mitocondria: POLRMT (RNA-polimerasa mitocondrial), PTCD1, PTCD2, PTCD3 y MRPS27 (Xu et al., 2008, Antonicka et al., 2013). PTCD1 juega un papel importante en el procesamiento de tRNAs (López Sánchez et al., 2011); PTCD2 está involucrado en la expresión del citocromo b (CYTB) y en el ensamblaje completo del complejo III (Xu et al., 2008); PTCD3 se une a rRNA mitocondrial 12S, una interacción necesaria para la correcta síntesis de proteínas mitocondriales (Davies et al., 2009). MRPS27 es una proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial, que se asocia con el rRNA 12S y tRNA^E, lo que es importante para la traducción. Por todo esto, podemos decir que los RBPs tienen un papel muy importante en el metabolismo mitocondrial, y como consecuencia en la síntesis de proteínas mitocondriales.

LRPPRC y SLIRP forman un complejo muy estable con un peso molecular de 250 kDa, encargado de la maduración y estabilización de los mRNAs ya que previene de la formación de estructuras secundarias y terciarias en su extremo terminal 3' facilitando así la poliadenilación por MTPAP (polimerasa poli(A) específica de mitocondria) (Chujo

et al., 2012). Mutaciones en este complejo causan una disminución global de los niveles basales de los mRNAs mitocondriales (Sasarman et al., 2010).

La poliadenilación en mitocondrias está mediada por MTPAP y la polinucleótido fosforilasa (PNPasa). Este proceso es importante para la estabilidad de los mt-mRNAs y para la generación de codones stop (UAA) en algunos mRNAs mitocondriales (Nagaike et al., 2005). La MTPAP adenila específicamente los RNAs en el extremo 3´.

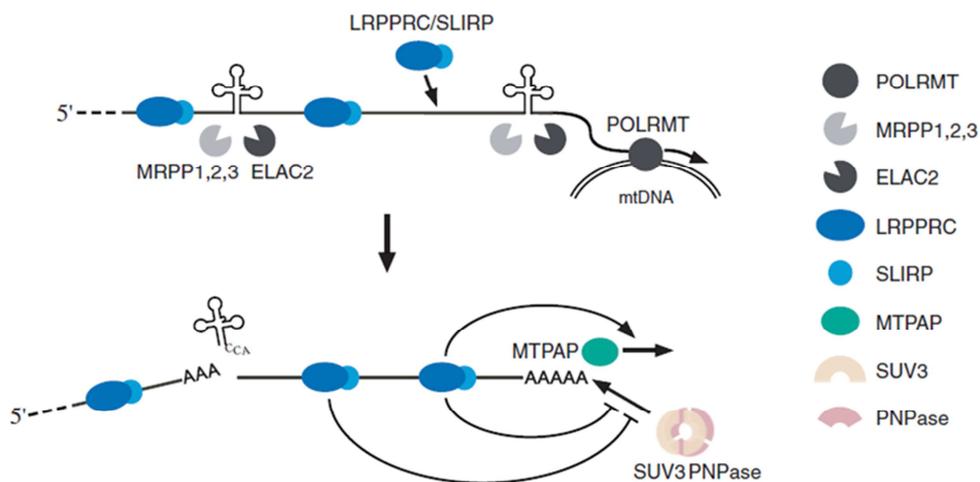


Figura 4. Figura en la que se muestra el procesamiento del mtDNA y todas las moléculas involucradas. Imagen tomada de Chujo et al., 2012.

Mutaciones en MTPAP provocan un acortamiento de la cola de poli(A) de algunos mRNAs, en consecuencia, los niveles basales de COX1 y COX2 se reducen. Sin embargo los mRNAs de ND1, ND2, ND3 y CYTB permanecen inalterados. Es importante mencionar que los transcritos de ND5 y ND6 poseen bien una cola corta de poli(A) o no la tiene. Ambos presentan en sus mRNAs extremos 3´ no traducidos (3´ UTRs).

Hasta el momento se sabe poco de la maquinaria de degradación del mRNA mitocondrial. PNPasa es un exonucleasa con actividad 3´-5´ que en humanos está involucrada en la homeostasis de la cola de poli(A): participa en la desadenilación de un conjunto de mRNAs, y el silenciamiento de esta exonucleasa provoca una elongación de la cola de poli(A) de COX1, COX2, COX3, ATP6/8 y ND3, aunque los niveles basales de estos mRNAs y de las proteínas no están alterados (Nagaike et al., 2005). En cuanto a la localización de PNPasa existe controversia, ya que se ha visto en el citosol (Borowski et al., 2013) en el espacio intermembrana mitocondrial (Szczesny et al., 2010), y una pequeña cantidad se encuentra en la matriz, donde forma un complejo con hSuv3p denominado degradosoma de RNA mitocondrial.

La proteína humana Suv3 (o hSuv3p) es una helicasa de DNA y RNA encargada de desenrollar el dsDNA localizada en el nucleoide mitocondrial, lo que sugiere que actúa en la replicación del mtDNA. También juega un papel muy importante en el metabolismo del RNA mitocondrial; en la regulación de la vida media de mRNAs maduros, en la vigilancia del RNA, eliminando RNAs aberrantes y en el deterioro de los compuestos intermedios derivados de los transcritos sintetizados a partir de las hebras L y H del mtDNA (Szczesny et al., 2010).

En levaduras, el degradosoma de las mitocondria, contiene la exonucleasa Dss1P, que actúa en sentido 3'-5' y Suv3, que actúa como RNA helicasa, mientras que en humanos, la proteína Suv3 también forma un complejo estable con PNPasa denominado degradosoma de RNA mitocondrial que degrada el mtRNA en dirección 3'-5' y se encuentra localizado en los *D-foci* el cual colocaliza con mtRNA y nucleoides.

Existen evidencias de que el complejo LRPPRC/SLIRP suprime la degradación de los mRNAs mediada por el complejo hSuv3p/PNPasa y facilita la poliadenilación de mRNA mediada por la polimerasa poli(A) mitocondrial (Chujo et al., 2012).

Recientemente, Anderson y Kedersha en 2006, describieron diferentes tipos de gránulos de RNA en el citoplasma de células somáticas, germinales y neuronas, los cuales tienen un papel importante en la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Estos gránulos de RNA contienen varias subunidades ribosomales, factores de traducción, enzimas, helicasas, proteínas andamio y proteínas de unión al RNA, controlando la localización, estabilidad y traducción del RNA. Recientemente, Antonicka et al., y Jourdain et al., en 2013, descubrieron gránulos similares a los citoplasmáticos próximos al nucleoide mitocondrial, y demostraron que esos gránulos mitocondriales son centros de procesamiento post-transcripcional del RNA y biogénesis de los ribosomas mitocondriales. Recientemente se han descrito 4 proteínas de los gránulos de RNA mitocondrial; las helicasas DDX28 y DHX30 y los miembros FASTKD2 y FASTKD5 pertenecientes a la familia FAST. Estos juegan un importante papel en el ensamblaje del ribosoma mitocondrial y se ha identificado que el rRNA 16S está unido a DDX28 y a FASTKD2, mientras que FASTKD5 está implicado en el ensamblaje de la subunidad 12S del ribosoma (Antonicka et al., 2015).

1.4. Traducción mitocondrial.

El mtRNA es traducido en la matriz mitocondrial en sus propios ribosomas, los cuales poseen bajo contenido en rRNA en humanos y como consecuencia bajo coeficiente de sedimentación 55S (Taanman et al., 1999). Están compuestos por dos subunidades 39S y 28S que contienen respectivamente el rRNA 16S y 12S codificados por el DNA mitocondrial, además de aproximadamente 80 componentes proteicos codificados por el DNA nuclear.

Los mecanismos moleculares de traducción mitocondrial son más parecidos a los utilizados por procariotas que a los que tiene lugar en el citoplasma de células eucariotas; sin embargo, la síntesis mitocondrial de proteínas tiene características propias, que no se han encontrado en procariotas.

La primera de todas estas características, es que el código genético mitocondrial presenta algunas diferencias respecto al código genético universal (Moriya et al., 1994) (**Tabla 2**).

	Universal	mtDNA humano
UGA	STOP	Triptófano
AUA	Isoleucina	Metionina
AUU	Isoleucina	Metionina
AGG, AGA	Arginina	STOP

Tabla 2. Tabla en la que se indican las diferencias entre el código genético universal y el código genético mitocondrial humano.

La mitocondria utiliza mecanismos de decodificación que permiten la lectura de todo el código genético utilizando simplemente 22 tRNAs en lugar de los 31 indicados en la hipótesis de Crick (Smits et al., 2010). Este sistema se basa en el reconocimiento de las dos primeras bases del codón.

La segunda, es que los mRNAs mitocondriales poseen características inusuales, ya que no presentan regiones en 5' o 3' sin traducir (UTRs), además de carecer de la estructura cap en el extremo 5'. Además, contienen una cola de poli(A) que incluso forma parte de los codones stop (Ojala et al., 1981).

Finalmente, la iniciación de la traducción en la mitocondria de mamíferos depende de un único factor de iniciación, el MTIF-2, que promueve la unión de la subunidad pequeña del ribosoma al tRNA^M, y MTIF3, que está implicado en la discriminación del codón de iniciación y podría actuar como factor de disociación ribosomal (Koc et al.,

2002). Mientras que la elongación depende de factores similares a los encontrados en procariotas, MTEFTu, MTEFTs, MTEFG (Taanman 1999).

2. FAMILIA FAST.

2.1. Generalidades.

Fas-activated Serine/Threonine phosphoprotein (FAST) es el miembro fundador de la familia de proteínas mitocondriales FAST (*Fas-activated Serine/Threonine phosphoprotein*), que además de FAST, incluye otros cinco miembros (FASTKD 1-5).

Todos los miembros de esta familia, poseen una señal de localización mitocondrial en el extremo amino terminal (Simarro, et al. 2010b), además de tres dominios conservados sin caracterizar llamados FAST_1 (de aproximadamente de 70 aa), FAST_2 (de aproximadamente de 90 aa) y un dominio RAP. RAP es un dominio putativo de unión al RNA, y está compuesto de aproximadamente 60 aa (Lee et al., 2004), y se ha descrito que se une al RNA en los procesos de *trans-splicing* (Riveier et al., 2001). Recientemente, se ha integrado a esta familia en el grupo de proteínas de unión al RNA (RBPs, *RNA-Binding Proteins*), gracias al dominio RAP. (a quien a FAST?)

Mediante búsquedas en bases de datos se han identificado genes ortólogos de la familia FAST, en peces, pájaros, ratón y humano, lo que sugiere que estos genes proceden de un ancestro común de vertebrados. La homología de la secuencia entre los ortólogos es de entre un 5 y un 10% mayor en los dominios FAST_1, FAST_2 y RAP que la observada en el extremo amino terminal (Simarro et al., 2010).

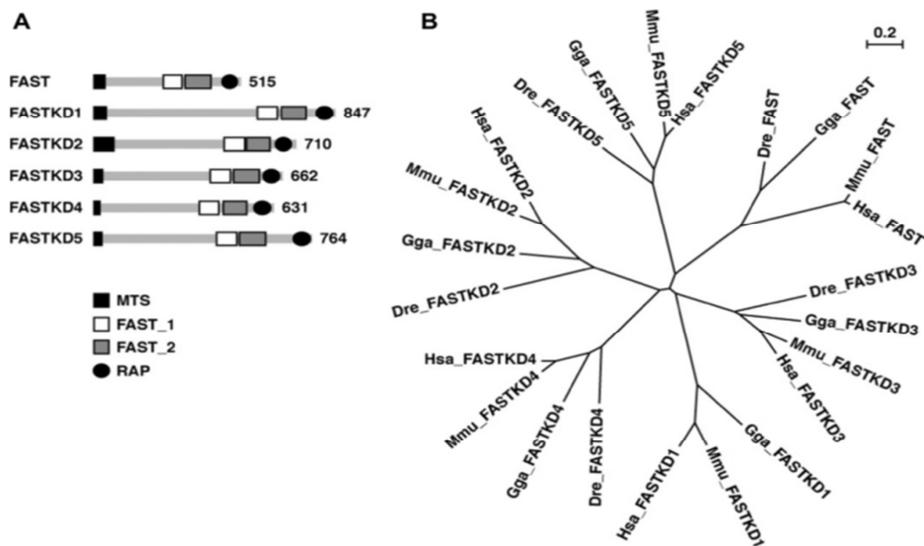


Figura 5. Imagen tomada de Simarro et al., 2010. **A.** Representa la estructura de todos los miembros de la familia FAST, además de indicar el número de aminoácidos que los constituyen. **B.** Árbol filogenético que representa el parentesco entre humanos (Has), ratón (Mus), pollo (Gga), y pez cebra (Dre) de todos los miembros de la familia FAST.

Todos los miembros de la familia FAST se localizan en la mitocondria, y la expresión de ellos es ubicua, algunos son particularmente abundantes en tejidos enriquecidos en mitocondria, como el corazón, y músculo esquelético. Su localización cromosómica se indica en la **tabla 3**.

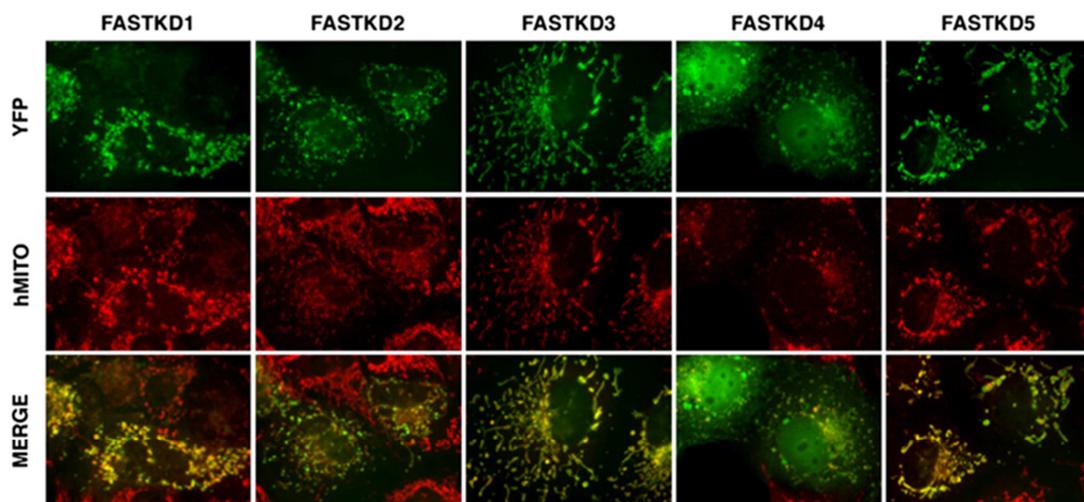


Figura 6. Imagen en la que se muestra que FASTKD1-5 se localizan en mitocondria. Imagen tomada y modificada de Simarro et al., 2010.

Miembros	Localización
FAST	7q35
FASTKD1	2q31
FASTKD2	2q33.3
FASTKD3	5p15.31
FASTKD4	7p15.31
FASTKD5	20p13

Tabla 3. Tabla en la que se indica la localización cromosómica de todos los miembros de la familia FAST.

2.2. Miembros de la familia FAST

2.2.1. FAST.

Es el miembro fundador, está compuesto por 515 aminoácidos. Se encuentra localizado en el núcleo, en el citoplasma y en la mitocondria (Simarro et al., 2007).

En el citoplasma, FAST modula la traducción de proteínas (Simarro et al., 2010) mediante su interacción con el represor intracelular de células T (TIA-1). TIA-1 inhibe la producción de mediadores proinflamatorios como son; TNF, IL-1b, IL6, ciclooxigenasa 2 y metaloproteinas 13. Mediante la inhibición de la actividad de TIA-1, FAST promueve la traducción de estos mediadores. Además, FAST se localiza en los gránulos de estrés, que son agregados citoplasmáticos de mRNAs no traducibles asociados a factores de iniciación de la traducción, a la subunidad ribosomal 40S y a varias proteínas de unión a RNA. FAST también se localiza en estructuras asociadas a los gránulos de estrés que se llaman cuerpos de procesamiento o P bodies que son estructuras granulosas presentes en el citoplasma y cuyos componentes juegan un papel importante en la degradación de ciertos mRNAs tienen un papel en el almacenamiento y turnover de ciertos mRNAs en el citoplasma.

Los órganos de procesamiento o *P-bodies* fueron descritos por primera por Bashkirov et al. en 1997 y son estructuras granulosas presentes en el citoplasma de las células eucariotas los componentes de las cuales juegan un papel esencial en la regulación de la expresión génica. Los *P-bodies* contienen ARNm que intervienen en la supresión de la expresión génica, proteínas de degradación del ARNm y maquinarias de silenciamiento génico.

FAST y TIA-1 también están presentes en el núcleo, donde TIA-1 promueve la inclusión de exones flanqueados por sitios de reconocimiento de empalme. FAST promueve la inclusión del exón 6 del receptor Fas. Esta forma codifica para una forma pro-apoptótica, mientras que la ausencia del exón 6 codifica para una forma soluble del receptor Fas inhibe la apoptosis (Izquierdo et al., 2007). Además, se ha

demostrado que tanto FAST como TIA-1 promueven la inclusión del exón IIIb en el mRNA del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2). FGFR2 es producido por transcripciones que incluyen uno de los dos exones adyacentes (IIIb o IIIc) que codifican para receptores con distintas propiedades de unión al ligando. La elección de empalme de FGFR2 es crítica para la organogénesis y la progresión del cáncer de próstata. El exón IIIb posee un sitio de empalme débil, y su inclusión depende del potenciador intrónico de *splicing* que posee regiones ricas en uridina conocido como IAS1. Sin embargo, FAST no se une a IAS1, ya que este recluta a TIA-1, un factor de regulación, que facilita el sitio de reconocimiento de empalme en 5' por U1shRNP, para promover la inclusión del exón IIIb. Se ha demostrado que 188 aminoácidos de FAST son necesarios para la supervivencia y son absolutamente imprescindibles para la activación del exón IIIb en FGFR2. Finalmente, se ha descrito que FAST se une a otros reguladores de splicing como son: HNRPK, KHDRBS1, TIAL1 y SF3B4 (Simarro et al., 2007). Todos los estudios mencionados de splicing se han realizado usando casetes exónicos. Hasta el momento no han identificado pre-mRNAs diana endógenos de FAST.

FAST, en la mitocondria, está involucrado en la regulación del mRNA de ND6, el único mRNA codificado por la cadena ligera. Además, se ha demostrado que FAST se une al precursor del RNA de la hebra ligera en varios lugares de la región codificante del ND6 y que le protege de la acción del degradosoma generando así la forma madura del mRNA ND6.

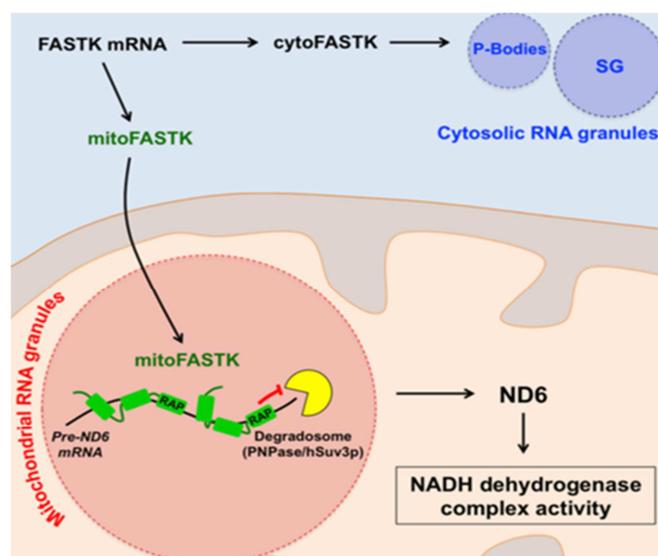


Figura 7. Imagen donde se muestra la localización y actividad de FAST. Imagen tomada de Jourdain et al., 2015.

También se ha observado que la deficiencia de FAST tanto en la línea celular 143B, como en diferentes tejidos de ratón, produce ausencia de ND6 y una disminución de la actividad del complejo I (Jourdain et al., 2015).

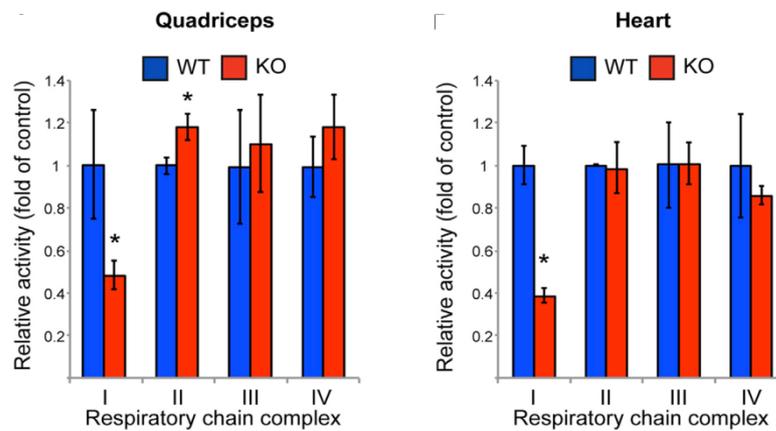


Figura 8. Gráficas en las que se muestra la actividad relativa de los diferentes complejos que constituyen la cadena respiratoria en diferentes tejidos. Imagen tomada y modificada de Jourdain et al., 2015.

Recientemente se ha estudiado el papel de FAST en el sistema inmune mediante la generación de un ratón deficiente en FAST. Se sabe que FAST se encuentra sobreexpresado en pacientes con atopia, asma, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus eritematoso. El primer estudio realizado con los ratones FAST KO demuestra que FAST regula el reclutamiento de los neutrófilos en dos modelos de inflamación pulmonar. En los ratones FAST KO se observó una reducción de la acumulación de neutrófilos en el pulmón en un modelo de inflamación pulmonar alérgica (mediante la exposición a extractos de ácaros de polvo) y en un modelo de daño pulmonar agudo (mediante la exposición a lipopolisacáridos). En estos estudios también se observó en los ratones FAST KO una disminución significativa en IL-6, IL-23, TNF- α , MIP-2, y KC en el lavado broncoalveolar como se muestra en la **figura 9** (Simarro et al., 2010).

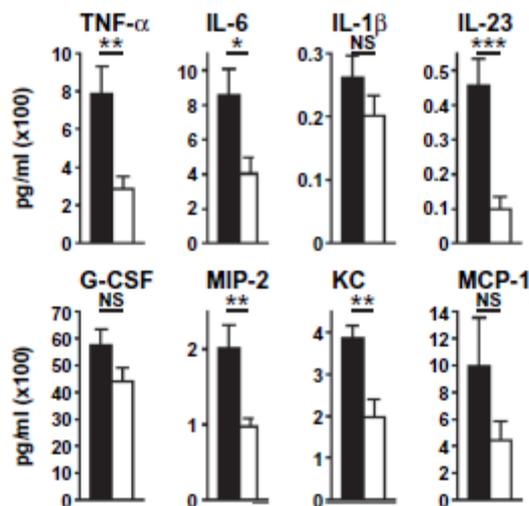


Figura 9. Imagen en la que se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, G-CSF, MIP-2, KC y MCP-1. Las barras negras representan los ratones FAST wt y las blancas los ratones FAST ko. Imagen tomada de Simarro et al., 2010.

2.2.2. FASTKD1.

Este es el miembro de la familia menos estudiado. Está compuesto por 847 aminoácidos. Su localización concreta en la mitocondria aún está por estudiar. Hasta el momento sólo se ha demostrado que está sobreexpresado en muestras con cáncer de endometrio (Colas et al., 2011). No hay estudios publicados que proporcionen datos sobre su funcionalidad y su implicación en el metabolismo mRNA mitocondrial.

2.2.3. FASTKD2.

Esta proteína está constituida por 710 aminoácidos. Previamente fue localizado en la membrana interna mitocondrial (Ghezzi et al., 2008). Recientemente, se ha descubierto que FASTKD2 se encuentra en los gránulos mitocondriales de RNA, los cuales tienen un papel muy importante en la biogénesis de los ribosomas mitocondriales. Además, muestra un porcentaje de colocalización de entre un 50% y un 90% con GRSF1, junto con FASTKD5, DDX28 y DHX30 (Antonicka et al., 2015).

Se han descrito mutaciones en FASTKD2 asociadas con una deficiencia en el citocromo C oxidasa (complejo IV), en dos casos de encefalopatía infantiles. Estos casos fueron estudiados exhaustivamente, y se observó que poseían una mutación de un cambio de C a T en la posición 1246; esto convertía el triplete CGA en TGA, que actúa como un codón de terminación, generando así una proteína truncada prematuramente (Ghezzi et al., 2008). También se ha demostrado que la expresión de

FASTKD2 está disminuida en los astrocitos de pacientes con enfermedad de Alzheimer; esto sugiere que FASTKD2 puede actuar como modulador de la neurodegeneración característica de esta enfermedad (Sekar et al., 2015). Además, también se ha descrito que FASTKD2 puede inducir la apoptosis de líneas celulares de cáncer de mama y de próstata (Yeung et al., 2011).

FASTKD2 actúa en el ensamblaje del ribosoma mitocondrial, en concreto se ha descrito que actúa sobre la síntesis del rRNA 16S, y se ha demostrado que el silenciamiento de FASTKD2 produce una disminución de aproximadamente un 50% en los niveles del RNA 16S (Antonicka et al., 2015).

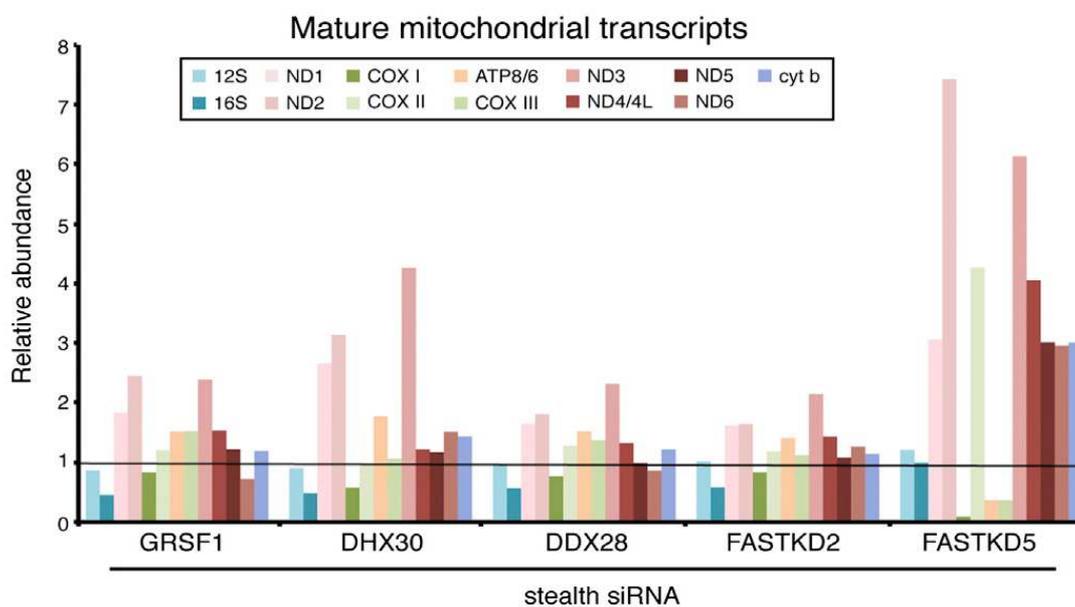


Figura 10. Gráfico en el que se observa la abundancia relativa de los diferentes transcritos mitocondriales al silenciar FASTKD2, al igual que la alteración de los mismos al silenciar otras moléculas. Imagen tomada de Antonicka et al., 2015.

Además, Antonicka et al., en 2015 han realizado estudios de traducción mitocondrial que demuestran que las células 143B, en las que se ha silenciado FASTKD2 presentan una disminución del 60% en la síntesis de las proteínas mitocondriales, lo que origina un defecto en el ensamblaje de los complejos mitocondriales I, III, IV y V (ver **figura 13**) (Antonicka et al., 2015).

2.2.4. FASTKD3.

Esta es la proteína en la que hemos centrado nuestro interés. Está formada por 662 aminoácidos. Su concreta localización mitocondrial aún está por estudiar.

Estudios realizados por Simarro et al., en 2010, mediante el silenciamiento específico de FASTKD3 con siRNAs en células U2OS, han demostrado que FASTKD3 es necesario para la respiración mitocondrial.

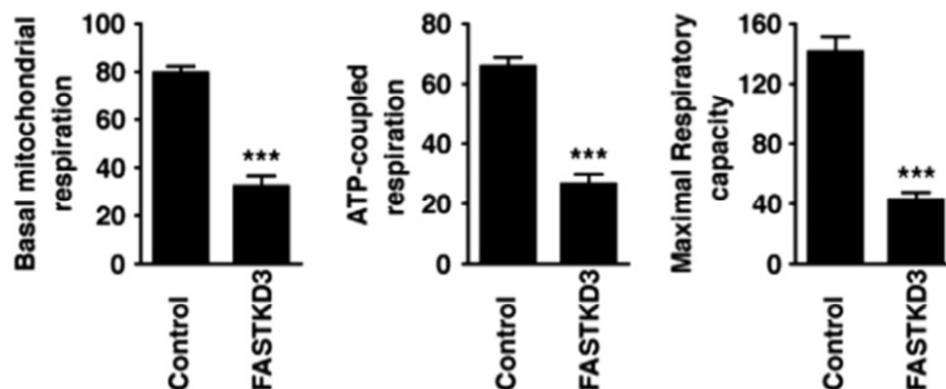


Figura 11. Imagen en la que se muestra el consumo de oxígeno (pMoles O₂/min) de células U2OS wt (control) frente a U2OS tratadas con siRNA contra FASTKD3. Imagen tomada y modificada de Simarro et al., 2010.

Estos estudios también demostraron que la reducción de la expresión de FASTKD3 no influye en la proliferación, ni en la viabilidad celular ni tampoco en el contenido de mtDNA.

El análisis del interactoma de FASTKD3 mediante espectrometría de masas demostró que FASTKD3 forma parte de un complejo de proteína involucradas en el procesamiento del RNA, (que incluye LRPPRC, DHX30 y PNPasa) y traducción (TUFM, GFM1, IARS2, MRPS22, TARS2, MRPS2, PTCD1, MTO1 y MRPS31). FASTKD3 también interacciona con diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de amino ácidos (PYCR1, PYCR2, ALD-H18A1, SHMT2 y GLS).

FAST_1 y FAST_2 son dominios ricos en leucinas en todos los homólogos. Estos datos sugieren que FASTKD3 podría actuar como una proteína andamio (*scaffold*) unida a la maquinaria de procesamiento/traducción de la cadena respiratoria. Esto puede tener una particular importancia en situaciones que se requiere la producción de energía (Simarro et al., 2010).

Este trabajo de tesis doctoral profundiza en la función de FASTKD3 en la mitocondria.

2.2.5. FASTKD4.

FASTKD4 es una proteína compuesta por 631 aminoácidos que se localiza en la matriz mitocondrial (Wolf et al., 2014).

Recientes estudios en FASTKD4 realizados por Wolf et al., en 2014, describen que el silenciamiento de FASTKD4 en células HEK293T desestabiliza transcritos maduros y tiene un efecto similar al producido por el silenciamiento de otros genes reguladores conocidos (ELAC2, MRPP1, MRPP2, DHX30, MRPP3). Dicha inestabilidad acorta la vida media de algunos transcritos mitocondriales de vida media larga (COX1-3, ATP6/8, CytB) y la de ND3 que es de vida media corta. De forma concomitante se observó un aumento en el contenido del mtDNA, descartando que sea su depleción la causa del fenotipo observado en los transcritos mitocondriales.

Con el fin de observar el efecto producido por la ausencia total de FASTKD4 sobre la OXPHOS, se generó una línea celular HEK293T deficiente en FASTKD4 mediante el sistema CRISPR/Cas9, demostrando una importante reducción en la abundancia de la proteína COX2 que forma parte del complejo IV. El resto de los complejos mitocondriales no vieron alterados sus niveles ni su actividad. Estudios de co-inmunoprecipitación demostraron que FASTKD4 se asocia con todos los mtRNAs, y con especial afinidad al rRNA 12S (Wolf et al., 2014).

2.2.6. FASTKD5.

Este miembro de la familia está formado por 764 aminoácidos.

Como ya he descrito antes en el apartado dedicado a FASTKD2, FASTKD5 se encuentra en los gránulos de RNA junto con FASTKD2, DDX28 y DHX30.

Estudios realizados en células 143B, observan que el grado de colocalización de estas proteínas con GRSF1 y con los RNA sintetizados es de 50-90%, mientras que es sólo del 30%-40% con los nucleoides (Antonicka et al., 2015). El silenciamiento de FASTKD5 producido mediante el uso de siRNAs, produce el bloqueo de la proliferación celular y una reducción de todas las proteínas de los gránulos de RNA. Además, se produce una acumulación de precursores de mRNAs, los cuales no pueden ser eficientemente traducidos, conduciendo al bloqueo y una subsecuente degradación del ribosoma mitocondrial.

Estudios de co-inmunoprecipitación demostraron que se une al rRNA 12S y a todos los mRNA mitocondriales a excepción de ND3. La unión de FASTKD5 es muy fuerte para los mRNAs que codifican para las proteínas que forman parte del complejo IV.

También se ha observado que está involucrado en la maduración de los mRNAs no flanqueados por tRNA (COX1, ATP6/8-COX3, ND5-CytB). Hasta el momento no se conoce que FASTKD5 tenga actividad nucleasa por lo que serán necesarios estudios complementarios para saber si por si sólo es capaz de procesar estos mRNAs o necesita la asociación con otras proteínas. (Antonicka et al., 2015).

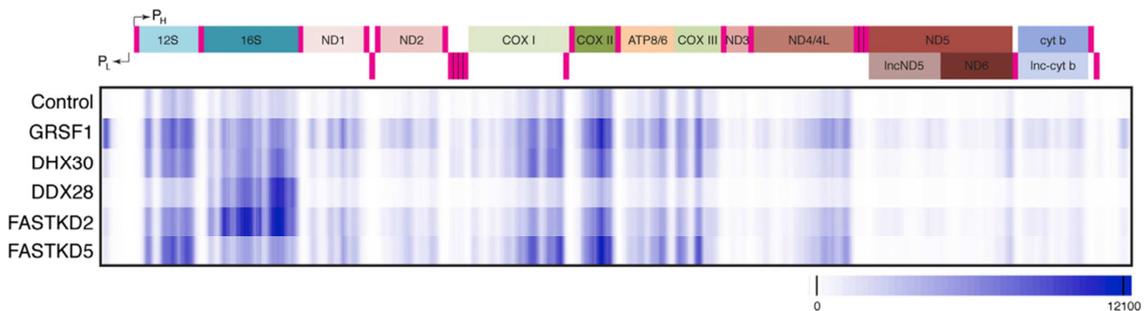


Figura 12. Resultados obtenidos de experimentos de co-inmunoprecipitación de RNA. Imagen tomada de Antonicka et al., 2015.

Estudios de traducción mitocondrial en células 143B que poseen FASTKD5 silenciado mediante siRNA, muestran un defecto significativo en la traducción de COX1, lo que produce una deficiencia en la actividad del complejo IV. También se ha observado defecto en la traducción en ND2, ND1, CytB, COX2 y COX3, siendo este defecto no tan importante (Antonicka et al., 2015).

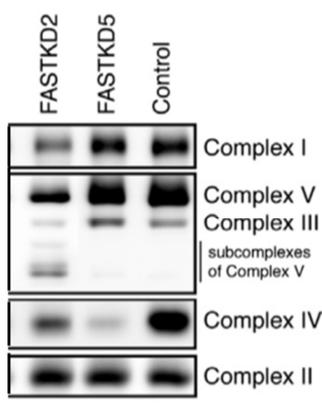


Figura 13. Experimento de BN-PAGE en el que se observan defectos en los complejos de la OXPHOS en células 143B que poseen silenciado el gen FASTKD2 y el gen FASTKD5. Imagen tomada y modificada de Antonicka et al., 2015.

3. MODIFICACIÓN GENÉTICA DIRIGIDA.

3.1. Mecanismos de reparación del DNA.

El DNA está expuesto constantemente a una gran variedad de factores que producen la rotura de la doble hebra de DNA (DSB, *Double Strand Break*): externos (radiación ionizante, luz UV y agentes químicos (Shrivastav et al., 2008)), y endógenos (especies radicales de oxígeno (ROS) producidas por el metabolismo). Naturalmente

las DSBs pueden ser generadas de forma espontánea durante el proceso de replicación del DNA (Krajewska et al., 2015). Por otro lado, esta rotura también está programada por la célula para ser reparada en la primera división meiótica, para así asegurarnos la segregación y generar gametos con diferente información genética o durante la recombinación V(D)J que ocurre en las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (Chapman et al., 2012). Si no se produce la reparación de la DSB, se producirá reorganización del DNA celular, deleciones, translocaciones o fusiones de cromosomas, que aumentarán la inestabilidad celular pudiendo incluso dar lugar al desarrollo de cáncer, o la muerte celular.

El mecanismo de reparación de la rotura de la doble cadena de DNA, puede ocurrir mediante dos vías, recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*) o recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end-joining*). Ambos mecanismos están controlados por el ciclo celular.

La NHEJ es la vía de reparación más frecuente en vertebrados. Esta vía está activa durante todo el ciclo celular y juega un papel importante en G0, G1 y fase S temprana (Langerak et al., 2011). La HR es considerada como el mecanismo más preciso de reparación de la rotura de la DSB y sólo tiene lugar en la fase S y G2, cuando las cromátidas hermanas están disponibles para ser usadas como molde (Shrivastav et al., 2008; Suzuki et al., 2011).

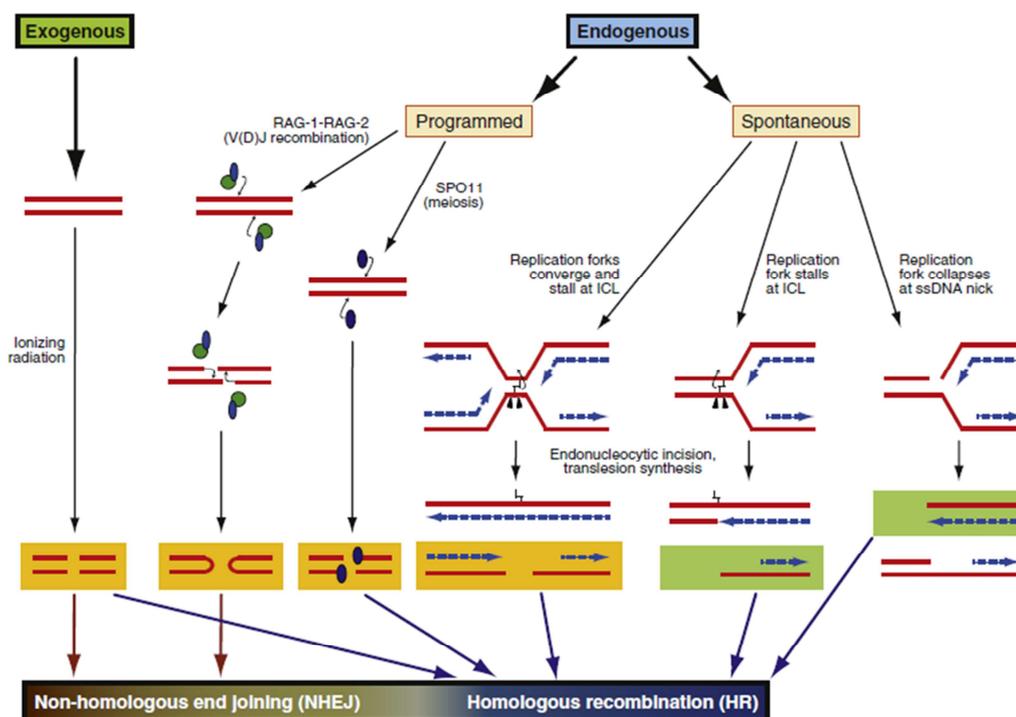


Figura 14. Representación de la reparación de la DSB, mediante las diferentes vías. Chapman et al 2012.

3.2. Modificación génica dirigida.

Desde 1988, se comenzó a realizar *gene targeting* en células madre de embrión de ratón para generar mutaciones y así poder estudiar la función de los genes (Capecchi 2005).

Estas técnicas pueden llevarse a cabo mediante la inserción génica, donde se introduce la versión normal del gen sin modificar el gen endógeno, modificación génica mediante la cual el gen endógeno es normalizado mediante mutagénesis dirigida o por sustitución génica mediante la que el gen defectuoso es sustituido por su versión normal, lo que requiere la participación de la maquinaria reparatoria mediante recombinación homóloga (HR).

3.2.1. Mecanismos de transferencia génica.

Para la realización de la transferencia génica, existen diferentes métodos mediante los cuales se puede introducir material genético en las células diana. Para ello, se utilizan vectores virales modificados (vectores virales) o mediante formulaciones fisicoquímicas (vectores no virales). La utilidad de un vector u otro varía en función de nuestras necesidades, condicionando el éxito del proceso. Actualmente no disponemos de un vector ideal y versátil que se adapte bien a las numerosas situaciones experimentales y clínicas. Pero existe una gran variedad de vectores que pueden ser utilizados para la transferencia génica.

Existen numerosos métodos químicos y métodos físicos (vectores no virales) utilizados para la transferencia génica, que nos permiten transferir moléculas de gran tamaño, ya que en estos casos el DNA exógeno está integrado en un plásmido, que es el que se introduce en el interior de la célula diana. El uso de estos métodos presentan varios inconvenientes, siendo los más destacados la baja frecuencia de transferencia, la baja especificidad por las células diana y que la mayoría de ellos, sólo pueden hacerse transferencias *in vitro*.

Por otro lado se encuentran los vectores virales. Actualmente los vectores virales constituyen la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos al interior de las células diana. Los vectores virales se obtienen por eliminación de uno o más genes indispensables para la replicación del virus y su sustitución por el gen terapéutico. De esta forma el nuevo virus es defectivo, lo que significa que mantiene la capacidad de infectar las células pero es incapaz de multiplicarse en ellas.

Los virus están constituidos por pequeños ácidos nucleicos (DNA o RNA) encapsulados en envolturas proteicas que los protegen y les permiten entrar en las células. Una vez en el interior de la célula, la información contenida en el ácido nucleico dirige la síntesis de proteínas virales, aprovechando la maquinaria y la energía de la célula huésped para así producir nuevos viriones.

Los vectores virales utilizados son los Herpesvirus, Adenovirus, Adenoasociados (AAV), Retrovirus y sobre todo los Lentivirus, debido a su alta capacidad infectiva. A estos últimos vamos a hacer referencia, debido a su utilización en nuestros experimentos.

Los **lentivirus** pertenecen a la subfamilia *Lentoviridae*, la cual pertenece a la familia *Retroviridae*. Estos virus presentan como material genético dos copias de RNA de cadena simple, rodeado de una cápside fosfolipídica, con glicoproteínas que determinan el tropismo del virus al ser reconocido por receptores celulares específicos. Dentro de la envuelta hay una cápside proteica de estructura icosaédrica que contiene las dos copias del genoma viral, la transcriptasa reversa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa (PR).

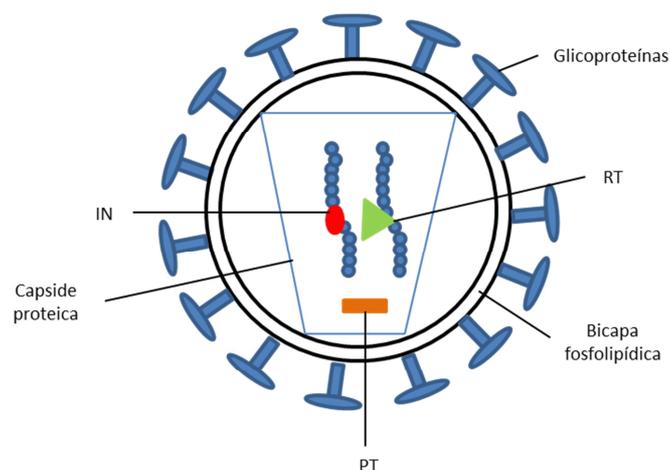


Figura 15. Estructura de una partícula lentiviral.

La estructura genética es compleja, incluye los genes estructurales *gag*, que codifica para proteínas de la cápside; *pol* codifica para enzimas necesarias para el ciclo viral, como la transcriptasa reversa (RT), proteasa (PR) y la integrasa (IN), esenciales para la transcripción del RNA a DNA de doble cadena y su integración en el DNA de la célula hospedadora; y *env*, que codifica para glicoproteínas de la envuelta comunes a todos los retrovirus. También contiene los genes *tat* y *rev* necesarios para la replicación viral y los genes reguladores *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* que son llamados accesorios, debido a que si son eliminados no afectan a la replicación viral (Zufferey et

al., 1997, Miyoshi et al., 1998). Estos genes tienen diferentes funciones especializadas y actúan en concreto para neutralizar las defensas de la célula hospedadora, respuestas del sistema inmune y regulan la replicación viral. Pero se ha demostrado que esos genes accesorios no son esenciales para la replicación viral *in vitro* pero sí para la patogénesis *in vivo* (Delenda 2004). El genoma de los lentivirus está flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeat*), subdivididas en regiones U3, R, y U5. U3 (único en 3') tiene aproximadamente un tamaño de longitud de 450 nucleótidos y actúa como promotor de la transcripción viral y forma el extremo 5' del provirus, además se encuentra el sitio att, señal necesaria para que la integrasa pueda llevar a cabo el proceso correcto de integración. La región R (repetición) es de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y contiene la señal de poliadenilación, normalmente AAUAAA. La homología entre sus dos regiones R es esencial para la transcripción reversa del genoma. U5 (único en 5') de tamaño aproximado de 80 nucleótidos es rico en GU, y sirve para aumentar el reconocimiento en el procesamiento de la señal de poliadenilación en la región R y es la primera parte del genoma que se retrotranscribe formando el extremo 3' del provirus. Finalmente, la secuencia ψ sirve como señal de empaquetamiento para el genoma viral (Schambach et al., 2013).

Los lentivirus comienzan la infección de la célula diana mediante la unión de las glicoproteínas de la envuelta con receptores presentes en la superficie de la célula hospedadora, permitiendo la fusión de las membranas viral y celular, permitiendo así la internalización de la cápside viral hacia el citoplasma. Una vez dentro de la célula, se produce la transcripción reversa del RNA viral llevada a cabo por la RT que convierte el RNA viral en DNA de doble cadena (Felice et al., 2009), para ello la RT necesita unirse específicamente a PBS (*primer binding site*). Una vez generado el dsDNA, la actividad RNasa H que posee la RT va a eliminar el RNA viral que ha sido utilizado como molde (Pluta et al., 2009). Una vez sintetizada la doble cadena de DNA, este se une a diferentes proteínas virales y celulares para producir el llamado complejo de preintegración (PIC, *pre-integration complexes*) (Felice et al., 2009). Posteriormente se produce la importación al núcleo a través de los poros nucleares (Gallay et al., 1997). Los lentivirus tienen la ventaja de que pueden atravesar la membrana nuclear e integrarse en células que no están en división, lo que hace que sean muy utilizados como métodos de transferencia génica.

La integración del DNA viral es llevada a cabo por la integrasa (IN). El proceso comienza con la eliminación de varios nucleótidos en el extremo 3' de ambas hebras de DNA viral, y también con la escisión del DNA de la célula hospedadora para así

poder ligar a éste el genoma viral. Para que se produzca esta unión es necesario que actúe la maquinaria de reparación del DNA de la célula, generando así el denominado provirus, o lo que es lo mismo, el DNA viral se integra en el genoma de la célula huésped. El provirus también se replica y hereda junto con el cromosoma hospedador. Durante mucho tiempo se pensó que la integración no ocurría de manera específica, sin embargo se ha descubierto que la integración se debe al estado de la cromatina y no a secuencias específicas del DNA. Los lentivirus parecen tener preferencia por la integración en lugares distantes a los sitios de inicio de la transcripción. Una vez integrado, el provirus utiliza la maquinaria celular para la transcripción y traducción. En la transcripción del provirus están involucradas la interacción de secuencias regulatorias en *cis* en los LTR y la *trans*-activación de proteínas producidas por la célula y el virus. Finalmente, los viriones son empaquetados junto con proteínas de la célula huésped y posteriormente se liberan a través de la superficie celular como partículas inmaduras no infecciosas.

Los genes *gag* y *pol* se expresan inicialmente como una poliproteína fusionada Gag-Pol, pero la proteasa viral escinde Gag-Pol para así generar de manera individual la PT, RT e IN (Buchsacher et al., 2000).

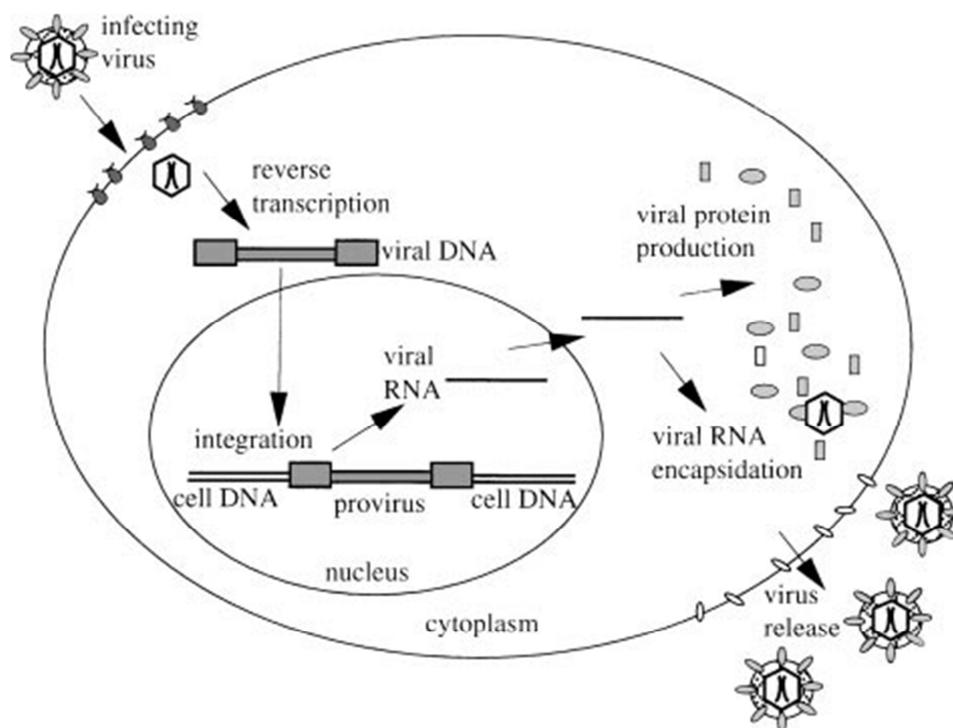


Figura 16. Ciclo replicativo del lentivirus. Imagen tomada de Buchsacher et al., 2000.

Los lentivirus presentan una serie de ventajas frente a otros sistemas de transferencia génica, como por ejemplo: el patrón de integración es menos genotóxico,

esqueleto más variable para modulaciones, y más resistentes al silenciamiento, expresión estable. Además, los vectores lentivirales tienen una alta eficiencia de transducción de forma estable tanto en células en división como en células que no se están dividiendo (Blömer et al., 1997; Kafri et al., 1999; Naldini et al., 1996; Sutton et al., 1998), una larga expresión, una baja inmunogenicidad, pueden introducirse en ellos grandes regiones codificantes y son altamente eficientes cuando se transducen células como neuronas, células de la retina y hepatocitos (Wanisch et al., 2009).

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) ha sido el más utilizado como vector lentiviral, ya que estos no tienen tendencia a integrarse en zonas transcripcionalmente activas lo que disminuye el riesgo de mutagénesis insercional. También se han utilizado otros vectores lentivirales como por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV).

Los vectores lentivirales derivados del HIV-1 han sufrido diversas variaciones para disminuir su patogenicidad y así poder tener más aplicaciones clínicas. Los lentivirus de primera generación incluían todas las partículas virales excepto las de la envuelta. Posteriormente se ha demostrado que la eliminación de los genes *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* no hace que se pierda la habilidad de transducir células que no se dividen (Miyoshi, et al., 1998). Más recientemente se han inactivado los LTR, para así salvar la posibilidad de activar oncogenes en las células debido a la integración al azar del vector.

Los sobrenadantes lentivirales se generan mediante la cotransfección con: (1) plásmido empaquetador, posee los genes *gag*, *pol* y *env*. Esto elimina la posibilidad de que generen virus con capacidad de replicación por recombinación, (2) el plásmido de la envuelta: la proteína de la envuelta más usada hasta el momento ha sido la VSV-G (Burns et al., 1993) y (3) en cuanto al vector de transferencia, se ha venido trabajando en el incremento de la seguridad biológica y recientemente se han generado vectores autoinactivables (*self-inactivating*, SIN). Esto se consigue con la sustitución de la región U3 del LTR 5' por el promotor del citomegalovirus (CMV), además de la delección de la región U3 del LTR 3'. Esta delección implica la eliminación de una caja TATA, y de este modo no se puede transcribir desde el LTR 5' y la capacidad del provirus de generar partículas replicativas competentes es eliminada (Miyoshi et al., 1998). Debido a esto, la expresión de los transgenes es dirigida por el promotor CMV. En estas construcciones se han añadido regiones reguladoras en *cis* para mejorar la expresión de los transgenes, como es el caso de la región rica en polipurina (cPPT, *polipurine tract*) que facilita el transporte del provirus al núcleo para su integración.

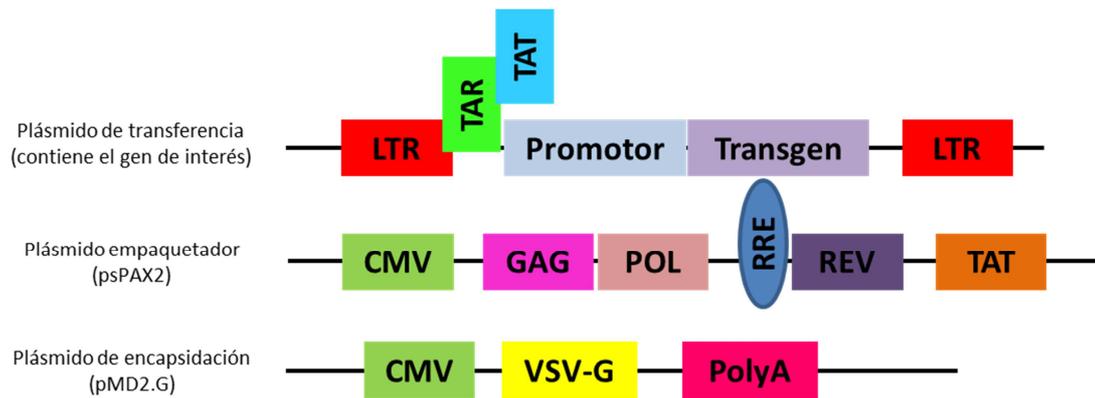


Figura 17. Mapas de los tres plásmidos necesarios para generar lentivirus de segunda generación. Imagen tomada y modificada de Addgene.

3.2.2. Modificación génica mediante nucleasas.

Con el afán de aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en células humanas, en los últimos años han emergido nuevas técnicas de modificación del genoma que ayudan a aumentar su eficiencia, ya que ésta es muy baja (1 de cada 10^5 - 10^7 células) en comparación con otras especies (Vasquez et al., 2001). Estas técnicas son: *zinc-fingers nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) y *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPs-Cas9). Estas nucleasas inducen la rotura de la doble cadena del DNA, después de esta rotura, los mecanismos de reparación inducen a la recombinación homóloga (HR) para reparar los daños producidos de forma exógena o endógena. La doble rotura, también puede ser reparada mediante recombinación no homóloga (NHEJ), la cual suele ir acompañada de deleciones e inserciones y/o reorganización en la zona de la rotura, produciendo de esta manera mutaciones genéticas (Sun et al., 2013).

3.2.2.1. Zinc Finger Nucleases (ZFNs).

Fue una de las primeras herramientas creadas para la modificación génica. Son proteínas modulares artificiales creadas por la unión de varios dominios *Zinc Finger* (ZF) fusionados a una endonucleasa FokI que produce la rotura en la hebra de DNA, por lo que se necesita una pareja de ZFN para que se produzca la rotura de la doble hebra de DNA. Un dominio *zinc finger* de manera individual está formado por aproximadamente 30 aa en una configuración $\beta\beta\alpha$ muy conservada y estable debida a la interacción de dos residuos de Cisteína y dos residuos de Histidina con un átomo central de Zinc (Sun et al., 2013). Cada dominio de ZF reconoce una secuencia

específica de DNA de 3 pb (Gaj et al., 2013, Silva et al., 2011). Esta herramienta consta de entre 3 y 5 dominios de ZF, por lo que reconoce secuencias de entre 9-18 pb confiriéndole especificidad.

Aunque se ha utilizado ampliamente en ensayos de modificación génica, su aplicación está limitada debido a su limitada modularidad y sobre todo a la falta de especificidad del dominio ZF pudiendo generar una rotura *off-target*, lo que produciría mutaciones indeseadas y aberraciones en los cromosomas (Radecke et al., 2010).

Estas nucleasas son cada vez menos utilizadas, debido a la complejidad a la hora de construirlas para que reconozcan el DNA con suficiente especificidad y afinidad.

3.2.2.2. *Transcription activator-like effector (TALE) proteins.*

Son proteínas secretadas por bacterias del género *Xanthomonas*. Estas proteínas penetran directamente en el citoplasma celular y son transportadas al núcleo de la célula de una planta, infectándola y uniéndose al DNA de la célula hospedadora de manera específica, y regulando la expresión de genes diana (Jankele et al., 2014).

Las TALEs reconocen secuencias de DNA de la célula hospedadora a través de un dominio central de unión al DNA que de forma natural, está integrada por repeticiones en tándem (Deng et al., 2012). Cada una de estas unidades repetidas están compuestas de 33-35 amino ácidos muy conservados, y cada uno de ellos reconoce un único par de bases, lo que les confiere una alta modularidad (Schmid-Burgk et al., 2013, Gaj. et al., 2013). Su especificidad está determinada por 2 aa hipervariables que se encuentran en las posiciones 12 y 13, y que son conocidos como unidades de repetición variables (RVDs) (Deng et al., 2012, Mussolino et al., 2012). Más de 20 diferentes RVDs han sido identificados, entre ellos NI, NG, HD, NN y HG. Los nucleótidos reconocidos son A, T, C, G/A y T respectivamente (Sun N., et al., 2013). Además de un dominio central, la TALE posee una región amino terminal y otra carboxilo terminal. La región amino terminal está compuesta por cuatro repeticiones desconocidas, que contribuyen a la carga básica de las proteínas TALE. La NTR es necesaria para la unión de la TALE al DNA y mediar la interacción con una timina conservada. La región carboxilo terminal está formado por tres señales de localización nuclear (NLS) y conserva un dominio de activación transcripcional (AD) (Jankele et al., 2014).

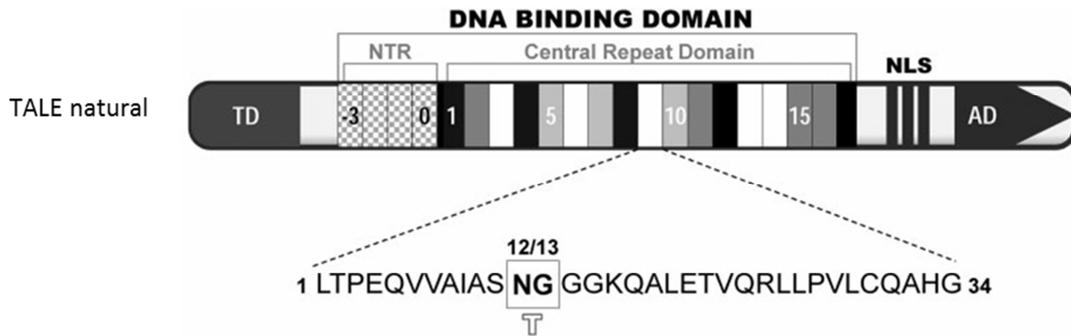


Figura 18. Esquema de un TALE natural, en el que se identifican todas sus regiones. (Imagen modificada de Jankele et al., 2014).

Las TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) se basan en la unión de la TALE, en su extremo carboxilo terminal con el dominio catalítico de la endonucleasa FokI que producirá el corte de la hebra de DNA. Para generar el corte de la doble cadena, es necesario crear dos TALENs con un dominio de unión específico a la secuencia de cada una de las cadenas de DNA y mediante la dimerización de la endonucleasa FokI se producirá la rotura de la doble cadena (Li T. et al., 2011).

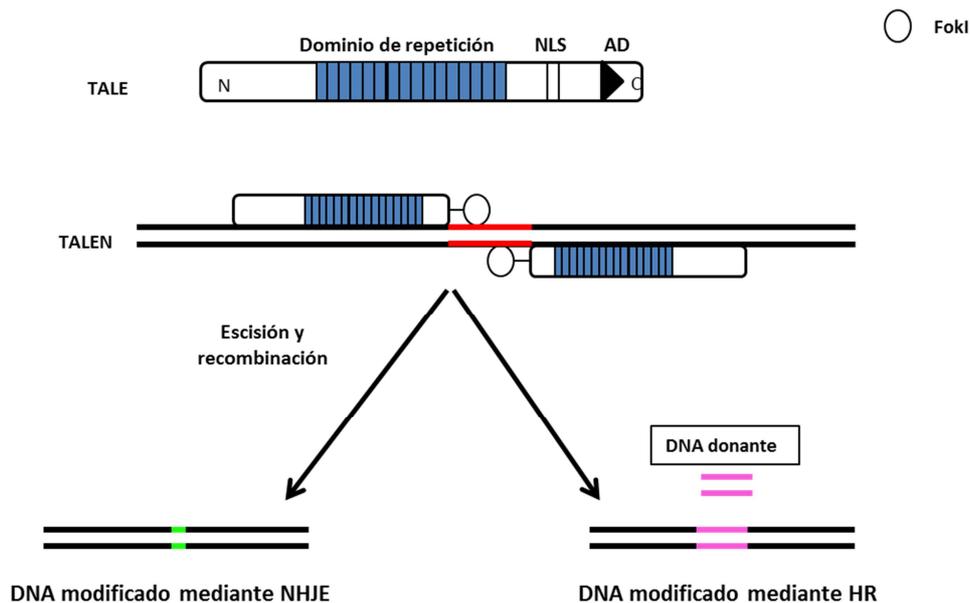


Figura 19. Esquema de un TALEN; el dominio de unión al DNA de una proteína se une con el dominio catalítico de la endonucleasa FokI para producir la escisión de la secuencia elegida.

Los sitios de unión de la TALEN deben estar separados por unas secuencias cortas de longitud variable (12-20 pb).

Gracias al carácter modular de las TALENs y que funciona sólo como dímeros se pueden conseguir dominios de unión a DNA muy específicos y un riesgo muy reducido de cortes inespecíficos en el genoma. El sistema original fue desarrollado por dos

grupos independientes, Li et al., en 2011, ensamblaron la TALE natural con el dominio catalítico FokI. Por otro lado Christian et al., 2010 desarrollaron una TALEN con un extremo amino terminal de 287 aa y un extremo carboxilo terminal de 231 aa. Posteriormente se han ido realizando modificaciones reduciendo su porción peptídica para así aumentar su eficiencia (Sun et al., 2013).

La clonación de la TALENs, representa un desafío debido a amplias secuencias idénticas y repetidas. Para ello se han desarrollado diferentes técnicas que permiten su correcto ensamblaje, como es el clonaje mediante el método llamado Golden Gate, un método que consiste en el ensamblaje de múltiples fragmentos de DNA ordenados en una única reacción. Esta técnica utiliza la nucleasa IIS, la cual corta fuera del sitio de reconocimiento generando un extremo libre de 4 pb (Cermak et al., 2011). Otra de las técnicas descritas es la denominada *Fast Ligation-based Automatable Solid-phase High-throughput* (FLASH), que se basa en un archivo de 376 plásmidos que codifican una, dos, tres o cuatro repeticiones de TALE generando así todas las combinaciones posibles. Los fragmentos de DNA que codifican para las repeticiones TALE son ensamblados en una fase sólida constituida por bolas magnéticas, un método novedoso que permite la automatización seriada de digestión, purificación y ligación (Reyon et al., 2012).

En nuestro caso utilizamos el ensamblaje mediante técnicas de clonación independientes de ligación (LIC, *Ligation-independent cloning*) (Schmid-Burgk et al., 2013). En este método todos los fragmentos de DNA se someten a una digestión parcial para generar extremos monocatenarios protruyentes, que van a hibridar con otros fragmentos de manera específica. Con este método se parte de una librería de plásmidos que poseen todas las posibles combinaciones para reconocer la secuencia específica del DNA diana. Este método nos permite construir una TALEN con 18 RVDs en solamente dos procesos de ensamblaje (Schmid-Burgk et al., 2013).

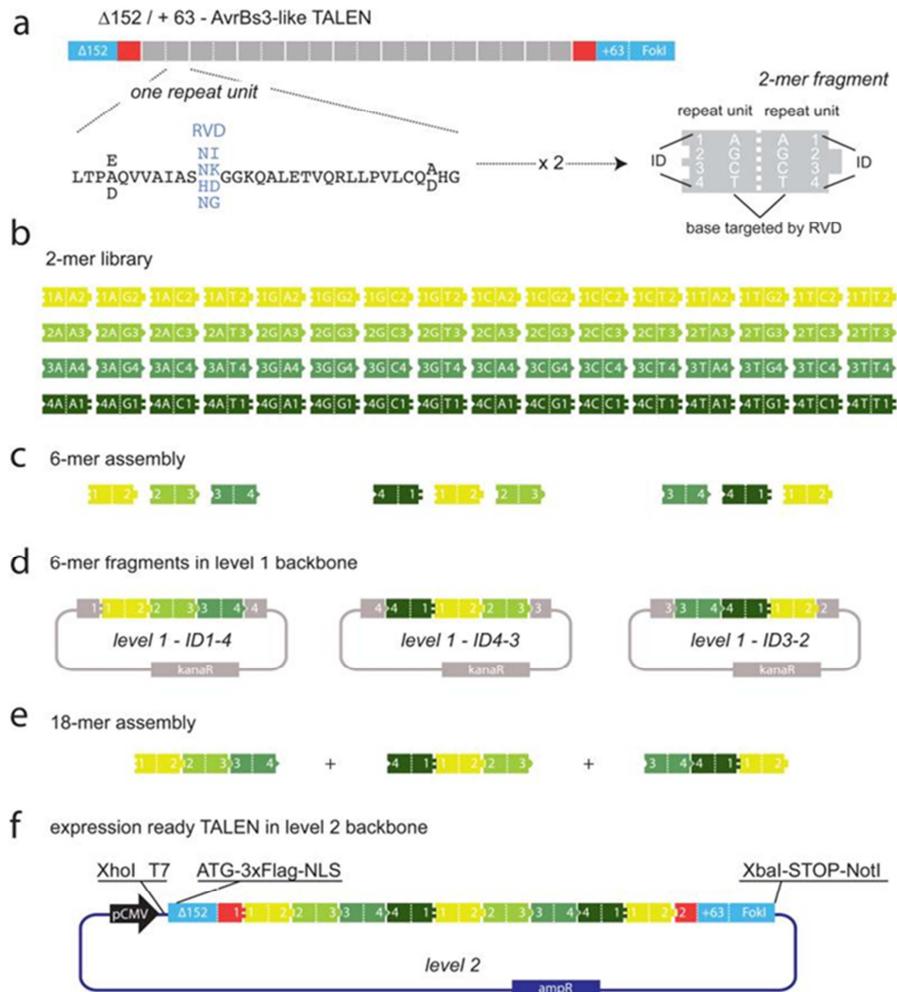


Figura 20. Descripción esquemática en la que se indican todos los pasos del proceso de construcción de una TALEN. Imagen tomada de Schmid-Burgk et al., 2013.

A pesar de su éxito como herramienta de modificación génica, se ha visto que no actúan frente a DNAs metilados, lo cual representa una gran desventaja para genes que se encuentran en la heterocromatina (Bultmann et al., 2012).

3.2.2.3. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) y su asociación con genes cas.*

Son componentes esenciales en el sistema inmune adaptativo que está extendido en bacterias y archaeas el cuál promueve la resistencia contra determinados virus y plásmidos (Bhaya et al., 2011, Wilkinson et al. 2014). Los fragmentos o espaciadores junto con las nucleasas Cas del hospedador son usados como adaptación del sistema inmune y como método de supervivencia, mediante el cual reconocen, eliminan o silencian DNAs foráneos (Bhaya et al., 2011).

En los procesos de inmunidad ocurren dos etapas, en primer lugar se produce el reconocimiento e integración de los espaciadores entre dos unidades de repetición adyacentes dentro de las CRISPR locus. Para que se produzca la adquisición del fragmento de DNA, se necesitan los motivos de reconocimiento denominados PAM (*Protospacer adjacent motif*). Posteriormente se produce la expresión del RNA de CRISPR (pre-crRNA) que va a ser transcrito por una RNA polimerasa, dando lugar a pequeños RNAs CRISPR (crRNAs), finalmente en la etapa de interferencia o inmunidad, el crRNA, se va a unir a un complejo multiproteico con Cas, que va a reconocer de manera específica regiones del DNA o RNA foráneo, para después iniciar la rotura del complejo crRNA-ácido nucleico foráneo gracias a la actividad nucleasa de Cas (Ran et al., 2013, Humphrey. et al., 2015).

La longitud de las repeticiones en las diferentes especies varía entre 21 pb y 47 pb, mientras que los espaciadores varían entre 27 pb y 72 pb (Mojica et al., 2009). Las secuencias de las unidades de repetición en las diferentes CRISPR no son conservadas, aunque conservan un motivo en el inicio del extremo 5' (GTTTg/c) y otro al final del 3' (GAAAC) (Bhaya et al., 2011).

Actualmente, se existen diez sistemas de CRISPR/Cas9, que se diferencian por la secuencia CRISPR y los genes Cas que contienen, que codifican para proteínas que poseen diversas actividades bioquímicas. Según los diferentes genes que las codifican han sido agrupados en tres categorías; I, II y III, siendo las de tipo II las más utilizadas.

El sistema CRISPR/Cas 9 Tipo II, consta de tres elementos, (1) la nucleasa Cas9, que presenta dos dominios nucleasa conservados. El dominio HNH se encuentra en la región central y corta la hebra complementaria a nuestra secuencia diana en dirección 3'-5' y un dominio RuvC en el extremo amino terminal, que corta la hebra no complementaria en dirección 5'-3' (Belhaj et al., 2015), ambos pueden ser mutados. (2) un RNA CRISPR (crRNA) formado por 42 nucleótidos, 20 de los cuales constituyen la secuencia conocida como espaciador, y otros 22 corresponden a la secuencia repetida, que actúan como secuencias guía para la nucleasa Cas9 hacia el DNA diana. (3) el trans-activador crRNA (tracrRNA) que facilita el procesamiento de crRNA y es necesario para que ocurra el corte mediado por Cas9.

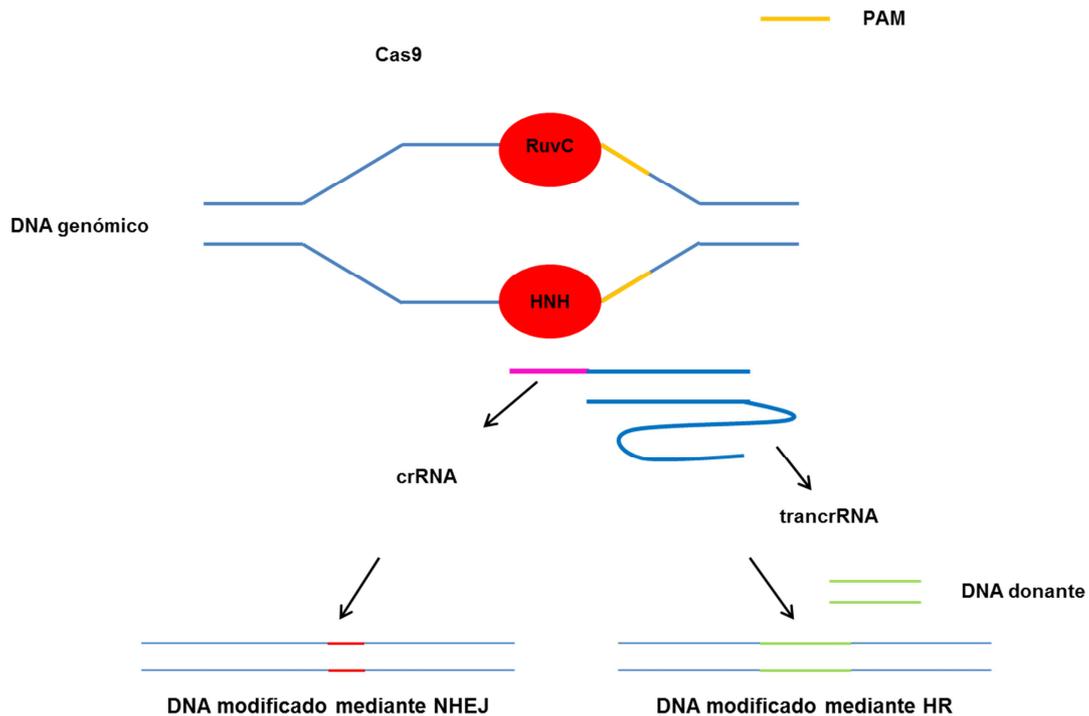


Figura 21. Representación del mecanismo de corte del sistema CRISPR-Cas9.

Recientemente y por el afán de disminuir el número de mutaciones no deseadas, se realizó una mutación de una Aspartato por una Alanina (D10A) en el dominio catalítico RuvC de Cas9, a este sistema se les denominó CRISPRs-Cas9 nikasa, el cual produce una única rotura de las cadenas de DNA aumentando así la reparación por HR, lo que disminuiría la frecuencia de mutaciones indeseadas. (Mali et al., 2013, Ran et al., 2013).

Este sistema es muy empleado, ya que sólo es necesario modificar el crRNA para que reconozca la secuencia diana de nuestro interés.

OBJETIVOS

Recientemente se ha descrito una nueva familia de proteínas mitocondriales integrada por seis miembros: FAST y FASTKD1-5. FAST, FASTKD2 y FASTKD5 se localizan en los gránulos mitocondriales de RNA los cuales son importantes para el procesamiento del mtRNA. El objetivo general de la presente tesis es el estudio de la función del miembro de esta familia FASTKD3, además del impacto del déficit de FASTKD3 en el metabolismo de los mtRNAs, pudiendo de este modo, estudiar otras alteraciones producidas en la mitocondria y a nivel celular.

Los objetivos específicos del trabajo son:

1. Analizar el efecto de la ausencia de la proteína FASTKD3 en el procesamiento, maduración y estabilidad de los RNAs mitocondriales.
 - a. Estudio de localización de FASTKD3 en los gránulos de RNA mitocondriales.
 - b. Generación de una línea celular *knockout* en FASTKD3 mediante el uso de nucleasas TALENs.
 - c. Cuantificación de los niveles de FASTKD3 en células en las que hemos delecionado FASTKD3.
 - d. Ensayos de rescate y determinación de la importancia del dominio RAP.
 - e. Mecanismos moleculares subyacentes al fenotipo obtenido.
2. Analizar el efecto de la ausencia de la proteína FASTKD3 en la traducción de los mRNA mitocondriales.
 - a. Estudio de las alteraciones del metabolismo del RNA en la línea celular U2OS FASTKD3 *knockout*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Líneas celulares.

La línea celular humana **U-2 OS** (ATCC 40345) deriva de una muestra de osteosarcoma de una niña de 15 años de raza caucásica. Esta línea presenta una morfología epitelial y propiedades adherentes en cultivo. Fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Paul J. Anderson de la Universidad de Harvard (Boston, EUA). En el texto nos referiremos a esta línea celular como U2OS.

La línea celular humana **143B rh0**, deriva de una muestra de osteosarcoma de una niña de 13 años de raza caucásica. Esta línea presenta una morfología mixta y propiedades adherentes en cultivo. La principal característica de esta línea celular es la ausencia de DNA mitocondrial. Fue proporcionada por el laboratorio de Dr. Paul J. Anderson de la Universidad de Harvard (Boston, EUA).

La línea celular estable **293FT** proviene de las células embrionarias primarias de riñón humano transformadas con el antígeno T grande del virus SV40 (*SV40 large T antigen*). La presencia del antígeno T permite la expresión de altos niveles de proteínas. Esta línea presenta una morfología epitelial y propiedades adherentes en cultivo. Estas células se obtuvieron de la compañía Life Technologies™.

La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripano (Gibco) y las células se contaron con una cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico invertido.

1.2. Medios de cultivo.

Las líneas celulares **U-2 OS** y **143B rh0** fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con Glutamax I (Gibco), suero fetal bovino (SFB) (LONZA) al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco; concentración final de penicilina-estreptomicina de 100U/ml y 100 µg/ml respectivamente) y piruvato al 1% (Gibco; concentración final 1mM). Nos referiremos a este medio a lo largo de texto como medio completo.

Para el mantenimiento de las células **293FT** se utilizó medio DMEM completo, incluyendo además aminoácidos no esenciales (NEAA) (Gibco) al 10% y geneticina a una concentración de 500 µg/ml (Gibco), ya que estas células expresan de manera estable el gen de resistencia a neomicina del pCMVSPORT6TA_g.neo. La expresión de este gen de resistencia está controlado por el promotor de SV40.

1.3. Cepas bacterianas.

***Escherichia coli* DH5α**

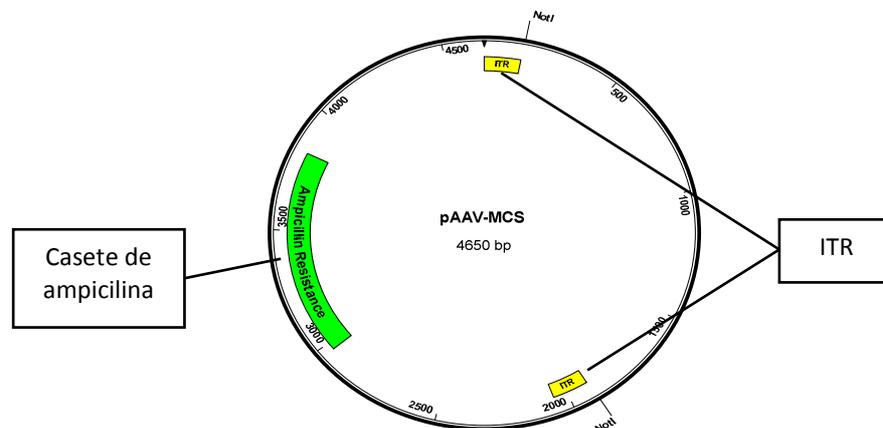
La cepa bacteriana DH5 alfa se obtuvo de Stratagene. El genotipo de esta cepa es F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(*r*_K⁻ *m*_K⁺), λ⁻.

XL10-Gold

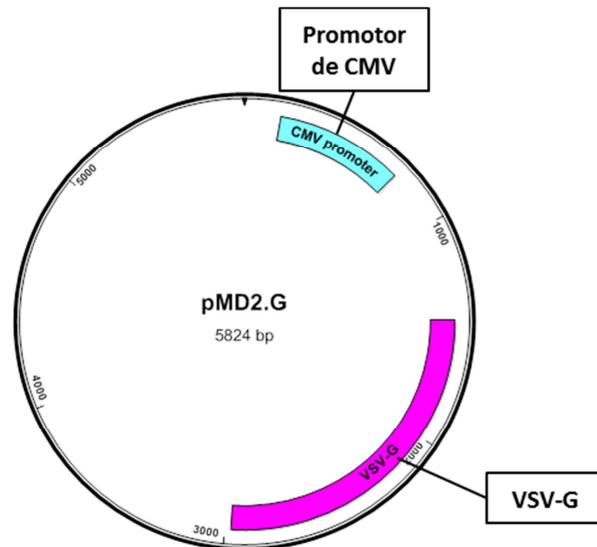
La cepa bacteriana XL-10 Gold se obtuvo de Agilent Technologies. El genotipo de esta cepa es: Tet^r Δ(*mcrA*)183Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F⁻ *proAB lacI*^qΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r].

1.4. Plásmidos.

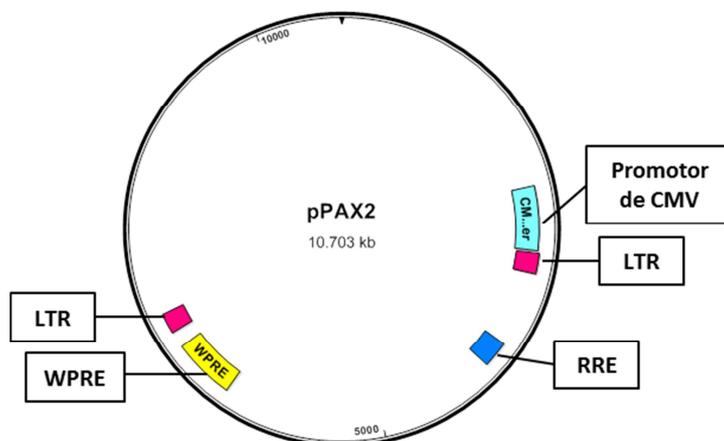
Plásmido pAAV-MCS: Este plásmido de 4.650 pb, contiene las repeticiones terminales invertidas (ITR, *Inverted Terminal Repeats*), que flanquean sitio de clonación múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site*) y que intervienen directamente en la replicación y encapsidación de las partículas virales. También posee un casete de resistencia bacteriana a ampicilina que permite su selección. Fue obtenido de Stratagene.



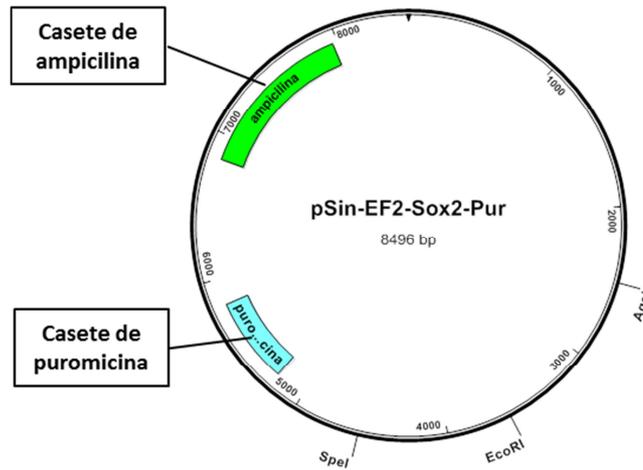
Plásmido pMD2.G: Es un plásmido de 5.824 pb, que se utiliza en la producción de lentivirus ya que posee un gen que codifica para la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G, *glycoprotein of the vesicular stomatitis virus*), que es una proteína involucrada en la formación de la envoltura viral, además de un casete de resistencia a ampicilina que permite su selección. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 12.259).



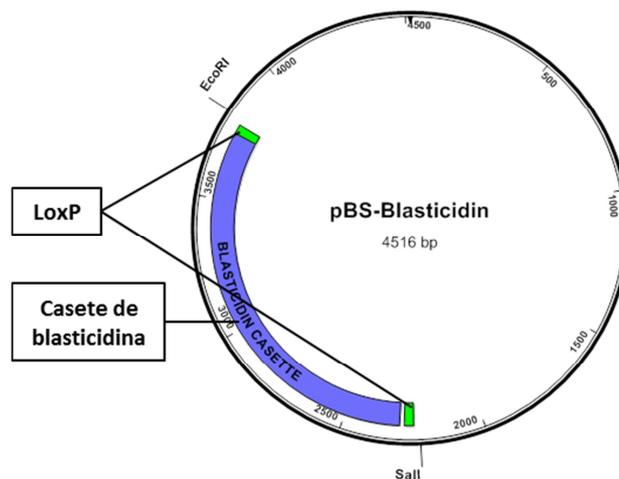
Plásmido pPAX2: Es un plásmido de 10.703 pb, que se utiliza en la producción de lentivirus de segunda generación. Posee el promotor híbrido CAG (que combina elementos de los promotores de citomegalovirus (CMV), de la β -actina de pollo y de la β -globina de conejo) que aumenta la eficiencia en la expresión de las proteínas de Gag, Pol, Tat y Rev del HIV-1, que también son codificadas por este plásmido. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 12.260).



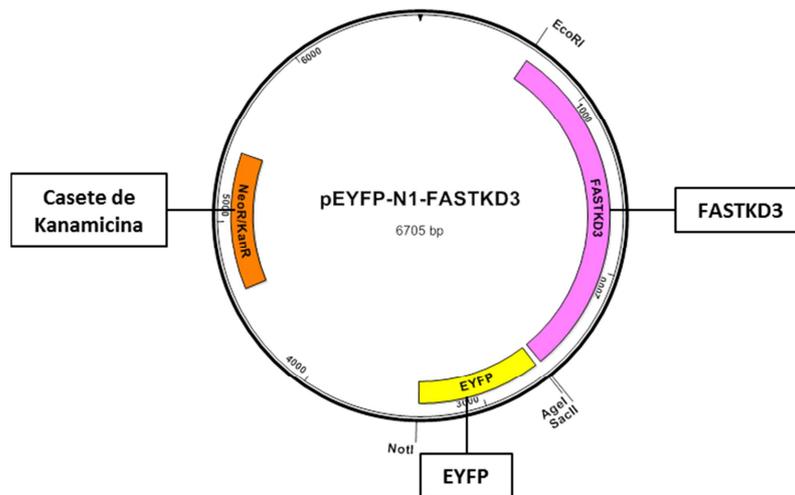
Plásmido pSin-EF2-Sox2-Pur: Este plásmido tiene un tamaño de 8.496 pb. Es un vector lentiviral de expresión en mamíferos. Contiene una secuencia que codifica para Sox2. Posee un casete de resistencia bacteriana a ampicilina, y un casete de resistencia a puomicina como marcador de selección. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 16.579).



Plásmido pBS-Blasticidin: El plásmido pBS-Blasticidin tiene un tamaño de 4.516 pb. A partir de este plásmido obtuvimos el casete de Blasticidina, el cual está flanqueado por dos sitios loxP. Este plásmido fue creado con anterioridad en nuestro laboratorio.

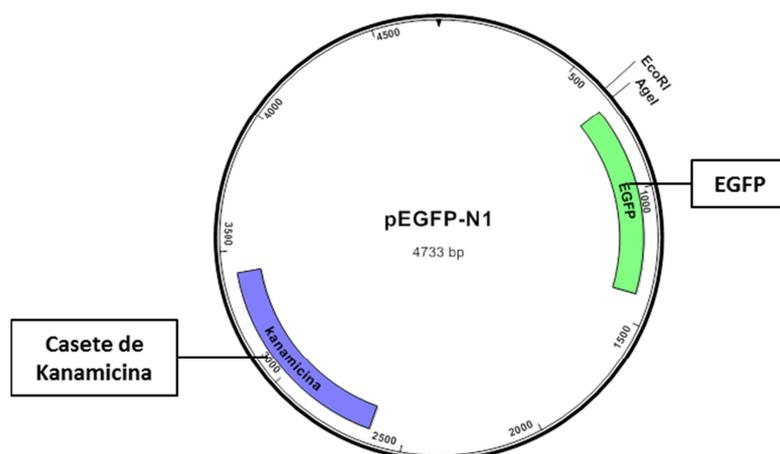


Plásmido pEYFP-N1-FASTKD3: Este plásmido tiene un tamaño de 6705 pb. Presenta un casete de resistencia bacteriana a kanamicina, un casete que codifica para la proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) localizado en la posición carboxilo terminal en relación con la proteína de interés, que en este plásmido es FASTKD3. Tiene un casete de resistencia bacteriana a kanamicina. Este plásmido fue obtenido del laboratorio de Paul Anderson de la Universidad de Harvard.



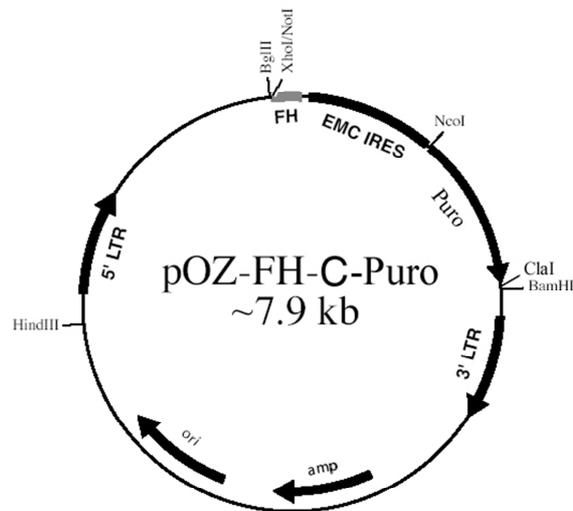
Plásmido FASTKD2-HA: Este plásmido contiene la secuencia codificante de FASTKD2, al cual posee unido un Tag HA en su extremo carboxilo terminal. Este plásmido fue proporcionado por el laboratorio del doctor Martinou, Universidad de Ginebra.

Plásmido pEGFP-N1: Este plásmido es un vector de expresión en mamíferos que tiene un tamaño de 4.733 pb, con un gen que codifica para la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, *Enhanced Green fluorescent protein*) en posición carboxilo terminal en relación con la proteína de interés, un casete de resistencia bacteriana a kanamicina y como marcador de selección un casete de kanamicina. Este plásmido se obtuvo de Clontech.



pOZ-FH-C: Es un plásmido de 8.000 pb. Es un plásmido derivado del virus de la leucemia murina (MMLV) y del plásmido pOZ. El pOZ contiene una unidad transcripcional bicistónica, que permite la expresión de dos proteínas a partir de un único transcrito. Este plásmido contiene los tags FLAG y HA y un codón stop aguas

abajo del sitio de corte para NotI. Este plásmido fue obtenido del laboratorio de Paul Anderson de la Universidad de Harvard.

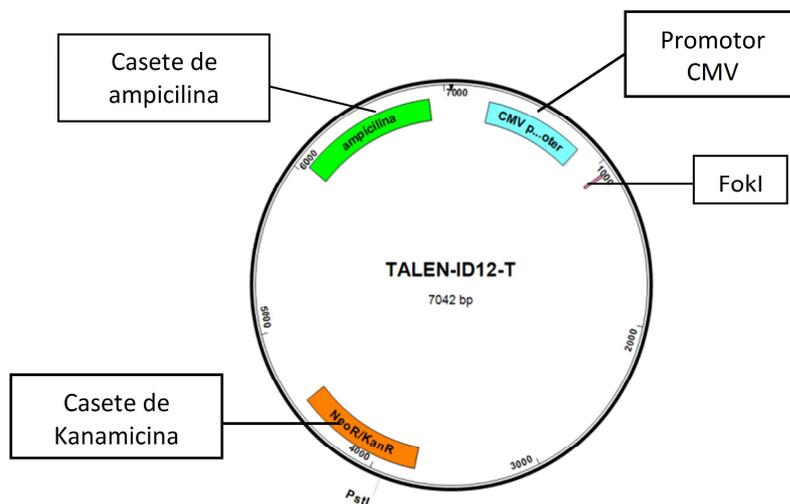


TAL-BBL1-ID41: Vector de 2.686 pb que contiene un MCS flanqueado por dos sitios de corte para Mva1269I. Posee un casete de resistencia bacteriana a kanamicina. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 41.516).

TAL-BBL1-ID21: Vector de 2.698 pb que contiene un MCS flanqueado por dos sitios de corte para Mva1269I. Posee un casete de resistencia bacteriana a kanamicina. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 41.519).

TAL-BBL1-ID43: Vector de 2.687 pb que contiene un MCS flanqueado por dos sitios de corte para Mva1269I. Posee un casete de resistencia bacteriana a kanamicina. Este plásmido fue obtenido de Addgene (número de referencia es 41.517).

TALEN-ID12-T: Es un vector de expresión en mamíferos de 7.042 pb, que posee una secuencia que codifica para la nucleasa bacteriana FokI, bajo el promotor de CMV.



2. MÉTODOS

2.1. Purificación de ácidos nucleicos.

2.1.1. Purificación de DNA plasmídico.

2.1.1.1. Purificación de plásmidos a pequeña escala (*miniprep*).

Se tomaron colonias aisladas de una placa de LB agar en presencia del antibiótico de selección y se cultivaron en 2 ml de medio LB líquido en presencia del mismo antibiótico durante toda la noche a 37°C en agitación. El *pellet* bacteriano obtenido mediante la centrifugación del cultivo se resuspendió en 100 µl de *buffer* de resuspensión (50 mM Tris y 10 mM EDTA, pH 8.0). Se añadieron 100 µl de *buffer* de lisis (0,1 M NaOH y 1% SDS), se invirtieron los viales para mezclar las soluciones y se incubó 4 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de *buffer* neutralizador (1,5 M de acetato potásico, pH 5,5), mezclamos mediante agitación y centrifugamos 5 minutos a 15.000 rpm. Se recogió el sobrenadante al que se añadieron 900 µl de etanol absoluto (100%) frío para precipitar el DNA plasmídico. Se invirtieron los viales para mezclar las soluciones y se incubaron durante 10 minutos a -20°C. Finalmente, centrifugamos los viales a 15.000 rpm durante 10 minutos, retiramos el sobrenadante y añadimos sobre el *pellet* 700 µl de etanol al 70%. Centrifugamos de nuevo los viales a 15.000 rpm durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y dejamos secar al aire el *pellet* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el DNA plasmídico en 50 µl de TE 1X y se utilizó el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop (Thermo Fisher) para su cuantificación.

2.1.1.2. Producción y purificación de plásmidos a mediana escala (*midiprep*).

La extracción de plásmidos a mediana escala se realizó utilizando el kit comercial PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen). El principio de este kit se basa en la lisis alcalina de las bacterias, seguido por la absorción del DNA a una membrana de silica presente en una columna. Esta columna separa el DNA del resto de la muestra. Las bacterias procedentes de 100 ml de cultivo se resuspendieron en 4 ml de *buffer* R3 (*buffer* de resuspensión). A continuación se añadieron 4 ml de *buffer* L7 (*buffer* de lisis), se mezclaron las soluciones mediante inversión y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 4ml del *buffer* N3 (*buffer* neutralizador), se invirtieron los viales para mezclar las soluciones y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se aplicaron los sobrenadantes a columnas de silica previamente equilibradas con 10 ml de *buffer* EQ1 (*buffer* equilibrador). Se lavó la columna con 10 ml de *buffer* W8 (*buffer* de lavado). El DNA se eluyó con 5 ml de *buffer*

E4 (*buffer* de elución) y se precipitó añadiendo 3,5 ml de isopropanol e incubando las muestras durante 10 minutos a -20°C. Se centrifugó 30 min a 9.500 rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y se resuspendió el DNA en TE, se cuantificó y almacenó a -20°C.

2.1.2. Extracción de DNA genómico a partir de cultivo celular.

El *pellet* celular se resuspendió en 200 µl de *buffer* de lisis (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5%) con Proteinasa K (300 µg/ml), y se incubó durante 1 hora a 56°C. El DNA se precipitó añadiendo al lisado celular 600 µl de etanol absoluto, 20 µl de NaCl a 5 M y 2 µl de glucógeno (Sigma) a una concentración de 20 mg/ml. Se incubó la mezcla durante 20 min a -20°C y se centrifugaron los viales a 15.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el DNA genómico precipitado se lavó con etanol al 70%. Se volvió a centrifugar y el *pellet* de DNA se resuspendió en TE 1X y en presencia de RNAsa (a una concentración final de 80 µg/ml).

2.1.3. Extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA, utilizamos TRIzol (Sigma) siguiendo las instrucciones del producto. El TRIzol es un reactivo monofásico a base de fenol e isotiocinato de guanidina que mantiene la integridad del RNA mientras se rompen las células y se disuelve el resto de componentes celulares. Añadimos 1 ml de TRIzol por cada 5×10^5 células y pipeteamos la muestra. Posteriormente incubamos la muestra homogeneizada durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Añadimos 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol. Agitamos los tubos vigorosamente durante 15 segundos y los incubamos a temperatura ambiente durante 2 ó 3 minutos. Centrifugamos las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Esto permitió separar dos fases, el RNA se encuentra en la fase superior o fase acuosa. Transferimos cada una de las fases acuosas a tubos nuevos, y se añadieron 500 µl de isopropanol a cada muestra para precipitar el RNA. Las mezclas se agitaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA, generalmente invisible, forma un *pellet* en el fondo del tubo. Eliminamos el sobrenadante con ayuda de una pipeta y lavamos el *pellet* con etanol al 75% añadiendo al menos 1 ml por cada ml de TRIzol usado. Se agitaron las muestras con el vórtex y se centrifugaron a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, después de secar los *pellets* de RNA (al aire durante 5-10 minutos), se disolvieron en 20 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas.

La cuantificación se realizó con el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop.

2.1.4. Amplificación y detección de ácidos nucleicos.

2.1.4.1. Screening celular mediante PCR.

En primer lugar, extrajimos el DNA genómico de cada una de los clones obtenidos siguiendo el protocolo básico de extracción descrito en el apartado 1.2 de esta misma sección. A continuación realizamos reacciones de PCR utilizando la DNA polimerasa recombinante Taq (*Thermus aquaticus*) (iNtRON) y los *primers* P5/P6 para la detección de la integración por recombinación homóloga del brazo 1 y los *primers* P7/P8 para el brazo 2. La reacción de PCR incluyó los siguientes pasos: 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 40 ciclos de 94°C 15s, 60°C 20s y 72°C 100s, y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Los tamaños de los fragmentos de DNA esperados para el brazo 1 eran de 1.216 pb (alelo mutado) y 1.754 pb (alelo *wild-type*) y para el brazo 2 de 1.449 pb (alelo mutado) y 1.701 pb (alelo *wild-type*).

Asimismo, se verificó la integración del plásmido por recombinación homóloga mediante PCR utilizando combinaciones de *primers* incluidos en la secuencia de blastidicina (P9 y P10) y *primers* externos a los brazos de homología 1 (P5) y 2 (P11): P5/P9 (tamaño esperado de 1.451 bp) y P10/ P11 (tamaño esperado de 1.778 bp). Además se comprobó la presencia o ausencia o del casete de blastidicina en ambos alelos mediante la reacción de PCR que incluyó los siguientes pasos: 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 40 ciclos de 94°C 15s, 60°C 20s y 72°C 120s, y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. Los *primers* utilizados en este caso fueron P14/P15 obtener un amplificado de 2.700 pb para el alelo wt, 2.200 pb para el alelo que posee el casete de blastidicina y 700 pb para el alelo que no contiene la blastidicina. El *primer* P14 se encuentra al final del brazo 1 y P15 al inicio del brazo 2.

También se comprobó la correcta acción del enzima TAT-Cre, mediante PCR utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente y utilizando los *primers* P5/P9 (tamaño esperado de 1.451 pb), y P10/P11 (tamaño esperado de 1.778 pb).

2.1.4.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

2.1.4.2.1. Síntesis de cDNA a partir de RNA.

Para la retrotranscripción del mRNA a cDNA usamos el kit iScript cDNA de BioRad que incluye la transcriptasa reversa (TR) del virus de la leucemia murina de Moloney (*Moloney murine leukemia virus*, MMLV) y una mezcla de *primers* inespecíficos:

oligonucleótidos poli-dT que hibridan con las secuencias poli(A) de los mRNAs y oligonucleótidos degenerados que idealmente permiten la retrotranscripción de todo el mRNA. La mezcla de reacción fue la siguiente: 0,5 µg de RNA total, *Buffer* 1X para TR, 200 U de TR MMLV y agua hasta un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó 5 min a 25° C y 30 min a 42° C, y 5 min a 85° C para inactivar la TR. El cDNA se conservó a -80° C hasta su utilización.

2.1.4.2.2. Evaluación por qRT-PCR.

El cDNA obtenido fue amplificado con el kit SYBR Green I Master de Roche en un termociclador a tiempo real LightCycler 480 (Roche Diagnostics). La mezcla de reacción para un volumen final de 25 µl fue: 5 µl de una dilución 1/10 de cDNA, mezcla SYBR Green I Master 1X y *primers* a una concentración final de 0,4 µM. Tras una incubación de 10 min a 95° C (para desnaturalizar el DNA y activar la Taq polimerasa), el cDNA se amplificó mediante 40 ciclos de PCR de 15 s a 95° C, 30 s a 60° C y 40 s a 72° C. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado. La especificidad de los *primers* se comprobó mediante el análisis de las curvas de fusión. Los datos se expresaron en términos de valores relativos al control y se normalizaron con respecto al valor de expresión de los genes ubicuos 18S y β-actina. El análisis se realizó con el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.1.4.3. Northern-blot.

El RNA se purificó a partir de 5×10^6 de células y el *Northern-blot* se realizó según se describe en Jourdain et al., 2013. Las muestras de RNA (15 µg) se separaron en gel de agarosa en presencia de formaldehído y posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon donde se fijaron covalentemente. Las sondas radioactivas fueron transcritas in vitro usando T7 RNA polimerasa en presencia de uridina trifosfato ^{32}P y la hibridación se realizó a 60° C con 50% formamida, 7% SDS, 0,2M NaCl, 80 mM fosfato sódico (pH 7.4) y 10 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Las sondas utilizadas se hallan clonadas en plásmidos cedidos por el Dr. Jean Claude Martinou.

2.2. Análisis de proteínas.

2.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, acrónimo en inglés de Sodium Dodecyl Sulfate).

Para la extracción de proteínas utilizamos células previamente lavadas dos veces con PBS y recuperadas mediante centrifugación. El *pellet* celular obtenido (equivalente a 5×10^6 de células U2OS) se resuspendió en 1 ml de *buffer* RIPA (Tris-HCL 50 mM,

NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, ácido deoxicólico al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 1mM) suplementado con 10 µl de un cóctel comercial de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) e incubamos durante 30 minutos en hielo. Los lisados se centrifugaron a 10.000g durante 10 min a 4°C para eliminar el debris y agregados insolubles. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de proteínas en cada uno de los sobrenadantes mediante el método de Bradford (BioRad).

Diferentes alícuotas de 50 µg de proteínas totales de cada una de las muestras fueron mezcladas con tampón de carga Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 1%, ditiotreitól 25 mM), y separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó utilizando un tampón Tris-Glicina (Tris 2,5 mM, glicina 19,2 mM, SDS al 0,01%, pH 8,3). Finalizada la electroforesis, los geles fueron, o bien teñidos con azul de Coomassie, o bien utilizados para realizar un *Western-blot*.

2.2.2. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

Los geles a teñir se sumergieron en el colorante azul de Coomassie durante 10 min y luego decolorados con solución decolorante (20% de metanol, 10% de ácido acético, 70% de agua), hasta que las bandas correspondientes a las proteínas fueron observadas claramente.

2.2.3. Western-blot.

Las proteínas se transfirieron de los geles SDS-poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda. Las esponjas y papeles de filtro fueron previamente humedecidos en el *buffer* de Transferencia 1X (Tris 25 mM, glicina 192 mM, Metanol al 10%). La transferencia se realizó a 100V durante 1 hora en la cámara fría. Una vez finalizada, embebimos la membrana en solución de bloqueo conteniendo un 5% de leche descremada en TTBS 1X (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,1%, pH 7,6) durante toda la noche a 4°C. Tras el bloqueo, incubamos la membrana en presencia del anticuerpo policlonal de conejo contra FASTKD3 (Proteintech) diluido 1:1000 en una solución con 1% de leche descremada en TTBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 min cada uno con el *buffer* TTBS 1X, incubamos la membrana en presencia de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham) diluido 1:5000 en TTBS 1X durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, tras tres lavados con TTBS 1X de 10 min cada uno, las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo

Scientific). La película fotográfica y la membrana, fueron enfrentadas a diferentes tiempos hasta encontrar aquel en el que se apreciaron mejor las proteínas en estudio.

2.3. Métodos de DNA recombinante.

2.3.1. Reacción de ligación.

Para realizar todas las ligaciones utilizamos el kit de ligación Rapid DNA Dephos & Ligation Kit de Roche.

Para realizar una ligación, usamos los DNAs (vector e inserto/s) previamente purificados. La relación molar del DNA vector con respecto al DNA del inserto fue de 1:3.

Para que se produzca la reacción de ligación, el primer paso es disolver el DNA del vector y el DNA del inserto en el tampón de dilución (5X DNA *dilution buffer*). Esto se lleva a cabo en un volumen final de 10 μ l, que se ajusta con H₂O ultrapura. A continuación, se añaden 10 μ l del tampón de ligación (2X T4 DNA *ligation buffer*) y se mezcla. Por último, se añade 1 μ l de la enzima ligasa (T4 DNA *ligase*) y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción de ligación se utiliza inmediatamente para transformar bacterias termocompetentes, o bien se almacena a -20°C.

2.3.2. Preparación de bacterias *E. coli* DH5 α termocompetentes.

A partir de la cepa comercial, se obtuvieron en el laboratorio bacterias termocompetentes *E. coli* DH5 α . En primer lugar, se tomó una colonia aislada de una placa de agar fresca de bacterias *E. coli* DH5 α y se cultivó en 2 ml de medio líquido LB durante toda la noche a 37°C en agitación. Tras esto, inoculamos 50 ml de medio LB con 1 ml del cultivo de noche y se incubaron a 37°C en agitación hasta obtener una densidad óptica (D.O) a 600 nm de 0,4 - 0,6. A continuación, centrifugamos el cultivo bacteriano a 4.000 x g durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano resuspendido en 15 ml de *buffer* CMG (50mM CaCl₂ y 50 mM de MgCl₂) se incubó en hielo durante 15 min. La suspensión bacteriana se volvió a centrifugar a las mismas condiciones anteriores; se descartó el sobrenadante y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 3,6 ml de *buffer* CMG y se incubó en hielo durante 5 min. Finalmente, se añadieron 0,250 ml de DMSO, volvimos a incubar en hielo durante 5 min y las bacterias competentes recién obtenidas se almacenaron a -80°C en alícuotas de 250 μ l.

2.3.3. Transformación por choque térmico.

Para realizar la transformación bacteriana, se descongelan las bacterias *E. coli* (cepas DH5 α , y XL 10 Gold) termocompetentes en hielo. A 50 μ L de la solución bacteriana descongelada, se le añaden 50 ng de plásmido o 2 μ L del producto de ligación (10-30 ng). Según la cepa bacteriana que estemos utilizando, se deja la mezcla en hielo entre 5 – 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se somete a un choque térmico, el cual también depende de la cepa bacteriana. Al final de esta sección se detallan las condiciones de incubación en hielo y de choque térmico para cada una de las cepas *E. coli* empleadas. Luego se incubó la muestra otros 2 minutos en hielo, tras lo cual se añade 1 mL de LB líquido y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Posteriormente, se centrifugó la muestra 2 minutos a 12.000 rpm y se retiraron 900 μ L del sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* bacteriano, que se sembró en placa de LB agar con el antibiótico de selección correspondiente al plásmido transformado. Las placas se incuban durante toda la noche a 37°C.

DH5 α : Incubación de 20 minutos en hielo; choque térmico de 55 segundos a 43°C.

XL10 *Gold*: Incubación de 30 minutos en hielo; choque térmico 30 segundos a 42°C. Previo a la transformación, a estas bacterias se les añaden 2 μ L de β -mercaptoetanol y se dejan durante 10 minutos en hielo, para aumentar la eficiencia de transfección.

2.3.4. Generación de plásmidos.

2.3.4.1. Diseño y construcción del plásmido donante pAAV-MCS-FASTKD3.

1. Para la obtención del casete de blastidina realizamos una doble digestión del plásmido pBS-Blasticidina con las enzimas de restricción Sall (Fermentas) y EcoRI (Takara), utilizando 10 y 15 U respectivamente de cada enzima por cada μ g de DNA. El producto de digestión de 1.512 pb fue purificado a partir del gel de agarosa al 1% con el kit Wizard® SV Gel And PCR Clean-Up System (Promega).
2. Los fragmentos de homología, brazo 1 (*ARM 1*) y brazo 2 (*ARM 2*) se obtuvieron mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) de DNA genómico de células U2OS wt. En todas las reacciones, se utilizó la DNA polimerasa *Hot Start* de alta fidelidad procedente de *Pyrococcus* (Thermo Fisher), clonada en *E. coli*, con actividad correctora (exonucleasa 3'-5') y reducidas tasas de error (50 veces menor que las *Taq* DNA polimerasas estándar). Los *primers* utilizados para la amplificación del brazo 1

(*ARM 1*) fueron: P1/P2 y para el brazo 2 (*ARM 2*) fueron: P3/P4. Las secuencias de los *primers* se aportan en el anexo 1. La reacción de PCR incluyó los siguientes pasos: 1 ciclo a 98°C durante 1 min, 40 ciclos de 98°C 15s, 60°C 20 s y 72°C durante 100 s, y 1 ciclo a 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR brazo 1 (982 pb) y brazo 2 (1.380 pb) fueron purificados a partir del gel de agarosa al 1%, y digeridos con Sall/NotI y EcoRI/NotI respectivamente. Tras la digestión, los enzimas fueron eliminados mediante purificación en columna (Promega) y el DNA fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific).

3. El vector de clonación pAAV-MCS de 4,6 kb fue previamente digerido con NotI (Thermo Scientific) y defosforilado con fosfatasa alcalina de camarones (SAP del inglés *shrimp alkaline phosphatase*) para evitar su posterior autoligación. La digestión del pAAV-MCS con NotI da lugar a dos fragmentos de 2.883 pb y 1.500 pb, siendo el de 2.883 pb el de nuestro interés por contener las repeticiones terminales invertidas (ITR) y el casete de resistencia a la ampicilina, por lo que fue purificado a partir de gel de agarosa al 1%.
4. Los tres fragmentos: brazo 1, brazo 2 y el casete de blasticidina fueron insertados en el vector de clonación pAAV-MCS de la manera que se describe en el apartado 4.1 de esta misma sección, utilizando el kit de ligación, y posteriormente se transformaron bacterias termocompetentes XL-10 *Gold* según se describe en el apartado 4.3 de esta misma sección. La siembra se realizó en placas de LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Se seleccionaron varias colonias que se propagaron en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C, en agitación. Posteriormente realizamos la purificación del plásmido a pequeña escala para después poder realizar la digestión de comprobación con NotI/EcoRI, NotI, EcoRI/Sall y NotI/Sall. Las colonias que se correspondieron con los resultados positivos se expandieron para la purificación del plásmido a mediana escala según se describe en el apartado 1.1.2 de esta misma sección.

Al plásmido obtenido lo llamamos pAAV-MCS-FASTKD3.

2.3.4.2. Diseño y construcción de los plásmidos pFASTKD3-FHA.

Para la recuperación de la expresión de FASTKD3 en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO, previamente hemos creado un vector que contiene el gen FASTKD3 unido a su extremo carboxilo terminal el Tag-Flag-HA.

1. El Tag Flag-HA fue obtenido mediante amplificación por PCR del plásmido pOZ-FH-C utilizando la DNA polimerasa *Hot Start*. Los *primers* utilizados para esta PCR se indican en el anexo 1. La reacción de PCR incluyó los siguientes pasos: 1 ciclo a 98°C durante 1 minuto, 40 ciclos de 98°C 15s, 60°C 20s y 72°C 50s, y 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. El tamaño del fragmento de DNA esperado fue de 123 bp. El producto de PCR fue purificado a partir del gel de agarosa al 1% y digerido con 10U de SacII (Fermentas) y 10U de NotI (Fermentas). Tras la digestión, los enzimas fueron eliminados mediante purificación en columna (Promega) y el DNA fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific).
2. Para la obtención del gen FASTKD3, se realizó una doble digestión del plásmido pEYFP-N1-FASTKD3 con las enzimas de restricción SacII y NotI obteniendo 2 fragmentos de DNA, uno de 749 pb que corresponde al gen EYFP y otro de 5.956 pb, siendo este último purificado en columna a partir de gel de agarosa al 1% y el DNA fue cuantificado.
3. El fragmento Tag-Flag-HA, fue clonado en el vector pEYFP-N1-FASTKD3 utilizando el kit de ligación tal y como ha descrito anteriormente en el apartado 4.1 de esta misma sección. En este caso, para la reacción de transformación utilizamos bacterias termocompetentes DH5 α , sembrándose en placas de LB agar suplementado con kanamicina (30 μ g/ml), e incubado durante 16 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se seleccionaron algunas colonias resistentes a kanamicina, las cuales fueron sembradas en LB líquido con kanamicina y se dejaron incubar a 37°C en agitación (250 rpm) durante 12-16 h. Pasado este tiempo, se realizaron minipreps de las muestras y posteriormente, se realizaron digestiones de comprobación con NotI/SacII. Una vez obtenido la colonia con la correcta incorporación del inserto, se realizó la correspondiente midiprep.

A este plásmido resultante le llamamos pFASTKD3-FHA wt, y se utilizó posteriormente para finalmente construir los vectores a los que les llamamos pFASTKD3-FHA- Δ 53-57 y pFASTKD3-FHA- Δ RAP mediante reacciones de mutagénesis de la manera que se describen a continuación.

La reacción de **mutagénesis dirigida** se realizó utilizando el Kit de mutagénesis QuickChange Site-Directed (Agilent Technologies). Para la reacción de mutagénesis se utilizaron oligonucleótidos situados al inicio y final de nuestras deleciones, cada oligonucleótido se utilizó a una concentración final de 125 ng, mientras que el DNA se utilizó a una concentración final de 20 ng. Las condiciones del termociclador para que

ocurra la reacción de mutagénesis constaron de un ciclo a 95°C durante 30 s y de 18 ciclos de 95°C 20s, 55°C 1 min y 68°C 10 min. A continuación, el producto de la reacción fue digerido con el enzima DpnI (10 U/μl) a 37°C durante 1 hora. Finalmente se realizó la transformación en bacterias DH5α termocompetentes. Una vez obtenidas las colonias bacterianas, se crecieron en LB líquido suplementado con kanamicina (30μg/ml) y se realizó el miniprep. Finalmente, se comprobaron las deleciones mediante secuenciación.

2.3.4.3. *Diseño y construcción de los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-Δ53-57 y pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-ΔRAP.*

Para poder crear los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA a partir de los plásmidos pFASTKD3-FHA wt, pFASTKD3-FHA-Δ53-57 y pFASTKD3-FHA-ΔRAP, se realizaron los siguientes pasos.

1. En primer lugar, digerimos cada uno de ellos con las enzimas de restricción EcoRI y SpeI (10 U/μl) (Fermentas). Como resultado de las digestiones se obtuvieron en todos los casos tres fragmentos de diferentes longitudes. Dos fragmentos comunes de 3.968 pb y 531 pb, y un fragmento específico de 1.563 pb para el wt, 1.392 pb para FASTKD3-FHA-ΔRAP y 1.548 pb para FASTKD3-FHA-Δ53-57. Los productos de digestión de 531 pb y los específicos, fueron de nuestro interés.
2. Por otro lado, el vector lentiviral p-Sin-EF2-Sox2-pur fue digerido con EcoRI/SpeI, obteniéndose dos fragmentos de DNA: uno de 980 pb y otro de 7.516 pb, siendo este último el de nuestro interés. Todos los productos de interés obtenidos mediante las digestiones previamente descritas fueron purificados en columna a partir de gel de agarosa al 1%.
3. Finalmente se procedió a la ligación de los productos de digestión de 531 pb con los productos de digestión específicos en el vector lentiviral de 7.516 pb. Se realizó una primera ligación con el fragmento de 531 pb, y el vector lentiviral de 7.516 pb.

Todas las transformaciones fueron realizadas utilizando bacterias termocompetentes DH5 α, que fueron sembradas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina (100 μg/ml). Se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina y se dejaron crecer en LB líquido a 37°C, en agitación durante 12-16 h. El DNA plasmídico obtenido de los minipreps fue digerido con AgeI para poder verificar la correcta orientación del inserto: si el inserto se integra en sentido

contrario el patrón de bandas esperado de la digestión sería de 7.984 pb y 1.633 pb, mientras que si la orientación es la correcta esperamos fragmentos de 6.506 pb y 3.111 pb. De las colonias bacterianas positivas, se realizaron midipreps.

A estos plásmidos resultantes les llamamos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57 y pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ RAP respectivamente.

2.3.4.4. *Diseño y construcción de los plásmidos pEGFP-N1-FASTKD3 wt, pEGFP-N1-FASTKD3- Δ 53-57 y pEGFP-N1-FASTKD3-N1- Δ RAP.*

Para construir dichos vectores, llevamos a cabo los siguientes pasos:

1. pEGFP-N1 fue digerido con EcoRI/Agel obteniendo como producto de digestión dos fragmentos de DNA: siendo el de 4.696 pb purificado en columna a partir de gel de agarosa al 1% y el DNA fue cuantificado.
2. Para la obtención del gen FASTKD3 wt, FASTKD3 Δ 53-57 y FASTKD3 Δ RAP, se realizó una digestión con las enzimas EcoRI/Agel de los vectores construidos en el apartado 3.4.2 de esta misma sección, obteniendo en cada caso, dos fragmentos de DNA; un fragmento común para los tres plásmidos de 4.053 pb y fragmentos específicos de DNA de 2.009 pb, 1.994 pb y 1.838 pb. Estos fragmentos fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 1%.
3. Se realizaron las ligaciones utilizando el kit de ligación, insertando los fragmentos de FASTKD3 wt (2.009 pb), FASTKD3 Δ 53-57 (1.994 pb), y FASTKD3 Δ RAP (1.838 pb) en el vector pEGFP-N1 y así poder obtener nuestros tres plásmidos. La transformación se realizó utilizando bacterias termocompetentes DH5 α , las cuales se sembraron en placas de LB agar suplementadas con kanamicina (30 μ g/ml). Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y se dejaron crecer en LB líquido en agitación durante 12-16h a 37°C. Finalmente se realizaron minipreps de dichas colonias y la correcta inserción de los fragmentos se comprobó mediante digestión con EcoRI/Agel. Por último, se realizó midiprep de aquellas colonias positivas (una de cada vector construido).

A estos plásmidos resultantes se les llamó, pEGFP-N1-FASTKD3 wt, pEGFP-N1-FASTKD3- Δ 53-57 y pEGFP-N1-FASTKD3- Δ RAP.

2.4. Generación de TALENs (*Transcription Activator Like Effector Nucleases*) específicas para FASTKD3.

2.4.1. Diseño y construcción de TALENs.

El diseño de la TALENs se realizó utilizando el algoritmo “online” que proporciona el servidor *European Molecular Biology Open Software Suite* (emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzzunuc). Para ello seleccionamos un fragmento de la secuencia de la región donde queremos que actúen las TALENs, e indicamos que la secuencia de reconocimiento debe cumplir el patrón: T-N(51,54)-A. De todas las secuencias obtenidas seleccionamos las más adecuadas para su funcionamiento en combinación con el plásmido donante pAAV-MCS-FASTKD3. Una vez seleccionada la secuencia obtuvimos los 2-mer a emplear utilizando el algoritmo que proporciona el laboratorio del Dr. Veit Hornung (<http://www.hornunglab.de/Tassembly.html>).

<p>TGTCTCAGATAAACTGACTTttgccttatctgagAAATTGCAGCATTCTTAGGA</p> <p>Secuencia 1: TGTCTCAGATAAACTGACTT</p> <p>Secuencia 2: TCCTAAGAATGCTGCAATT</p>
--

Figura 22. Secuencias de reconocimiento de TALEN 1 (secuencia 1) y TALEN 2 (Secuencia 2).

Para la construcción de las TALENs utilizamos LIC TAL Effector Assembly Kit (Addgene). Este kit está compuesto de una librería de plásmidos que contienen fragmentos 2-mer (unidades de repetición modulares las cuales presentan 2 aminoácidos hipervariables) y los plásmidos necesarios para ligar en cada nivel (*Backbone Level 1* (BBL1), y *Backbone Level 2* (BBL2), los cuales tienen resistencia a kanamicina y ampicilina respectivamente.

En primer lugar, digerimos 1,4 µg de cada uno de los plásmidos que contienen fragmentos 2-mer con 10 U de Mva1269I (Fermentas). Cada uno de los plásmidos BBL1 (5 µg), se digirió con 10 U de PstI (Fermentas) y 10 U de KpnI (Fermentas). Los productos de las digestiones de los plásmidos BBL1 se purificaron en gel y se sometieron a una reacción de *chewback*. Este método utiliza la actividad exonucleasa 3´-5´ de la enzima T4 polimerasa y genera *overhangs*. Para controlar el tamaño de los *overhangs* se añadió a la reacción un determinado dNTP STOP (en nuestro caso dATP o dTTP) para competir con la actividad DNA polimerasa y así frenar la actividad exonucleasa. La reacción se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía NEB2

buffer 1x, BSA (100 mg/l), 1 mM de dNTP (A o T) y 5 unidades de T4 DNA polimerasa. Esta mezcla se incubó a 28°C durante 8 minutos, en hielo durante 1 minuto y a 75°C durante 20 minutos. A continuación, mezclamos 3µl del producto de la reacción de *chewback* de cada uno de los plásmidos BBL1 con los correspondientes 2-mers, para ensamblarlos y generar el 6-mer. Incubamos la mezcla durante 30 min a 55°C y luego 3 horas a 25°C. Finalmente, transformamos bacterias XL-10 Gold mediante shock térmico (30 s a 42°C) con el producto de ligación, las sembramos en placas de agar suplementadas con kanamicina (30 µg/ml) y se incubaron entre 12-16 horas a 37°C. Posteriormente 4 de las colonias obtenidas se crecieron en medio líquido LB suplementado con kanamicina (30 µg/ml) para la purificación del plásmido a pequeña escala y poder realizar la digestión de comprobación con Mva1269I. A continuación, y con el fin de ensamblar los tres 6-mers y generar los 18-mers, se digirieron los vectores que contienen los diferentes 6-mers con Mva1269I y el vector BBL2T con PstI (Fermentas). El vector BBL2T digerido se sometió a una reacción de *chewback* y se ligó a los diferentes 6-mers tal y como se describe anteriormente. La transformación con el producto de ligación se realizó en bacterias XL-10 Gold y se sembraron en placas suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Para su comprobación se realizó una digestión doble con 10 U XbaI (Fermentas) y 10 U de XhoI (Fermentas) obteniendo fragmentos de 5.300 pb y 3.300 pb. A los vectores BBL2T que contienen los 18-mer los denominamos TALEN1 (que reconoce la secuencia 1) y TALEN2 (que reconoce la secuencia 2).

2.4.2. Transfección con TALENs y el plásmido pAAV-MCS-FASTKD3.

El día previo al experimento, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo. Inmediatamente antes de la transfección sustituimos el medio completo por medio completo sin antibiótico. El complejo de transfección se generó agregando a la mezcla Opti-MEM/DNA 25 µl de Opti-MEM con 200 ng de cada una de las TALENs y 200 ng del vector donante pAAV-MCS-FASTKD3, la mezcla Opti-MEM/lipofectamina con 25 µl de Opti-MEM que contiene 1 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). A continuación, se dejó incubar la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente para la formación de los liposomas. A continuación dicha mezcla se añadió a las células en cultivo y se incubaron 12 horas a 37°C y a 7% CO₂. Trascurrido este tiempo, el medio se reemplazó por medio completo fresco. Al día siguiente las células se tripsinizaron y sembraron a una densidad aproximada de 2.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron en presencia de blasticidina (10 µg/ml) durante 10 a 15 días hasta la obtención de clonas resistentes.

2.5. Vida media de los mRNAs mitocondriales.

La estimación de la vida media de mRNA mitocondriales se realizó mediante el tratamiento con bromuro de etidio (BrEt), ya que éste es un inhibidor selectivo de la transcripción de DNAs circulares por alteración de la estructura terciaria de la molécula (Hayashi J. et al., 1990). El día anterior al tratamiento, plaqueamos 100.000 células U2OS wt y U2OS FASTKD3 KO por pocillo de placa de 24 pocillos, para posteriormente ser tratadas con 0,5 µg/ml de BrEt (Nagao A. et al., 2008) para interrumpir la transcripción mitocondrial y ser capaces de estimar la vida media de los mRNAs mitocondriales. Tras el tratamiento se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min), para ello, lavamos las células con PBS y seguidamente las células fueron solubilizadas en TRizol para la extracción de RNA total según se describe en el apartado 1.3 de esta misma sección. Finalmente analizamos los niveles de los transcritos mediante qRT-PCR tal y como se describe en el apartado 1.4.2.2 de la sección de materiales y métodos. La secuencia de los *primers* se proporciona en el anexo 1. La vida media ($t_{1/2}$) fue obtenida mediante la fórmula $t_{1/2} = \ln 2/\lambda$.

2.6. Marcaje metabólico de proteínas de traducción mitocondrial.

Para realizar el marcaje metabólico de proteínas de traducción mitocondrial, se plaquearon 500.000 células de las líneas celulares U2OS wt y U2OS FASTKD3 KO. Al día siguiente, se les retiró el medio, y se le añadió DMEM libre de metionina y cisteína (Lonza), suplementado con 10 % de suero bovino fetal dializado (gibco) y 1% de Glutamax (100X) y se incubaron durante 20 min. Transcurrido el tiempo se añadió 100 µCi/mL metionina/cisteína marcada con S³⁵ (PerkinElmer) y emetina (Sigma-Aldrich), a una concentración de 100 µg/ml, la cual produce la inhibición de la síntesis de proteínas citoplasmáticas, de modo que únicamente serán marcadas las proteínas mitocondriales. Se dejó incubar durante 1h. Posteriormente, se recogieron las células, se lisaron utilizando el tampón RIPA y se cuantificó la proteína utilizando el método colorimétrico Bradford (BioRad). Las muestras se separaron mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE de gradiente (15%-20%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, finalmente se visualizaron mediante autoradiografía.

2.7. Cuantificación del número de copias de mtDNA.

La cuantificación relativa del mtDNA frente al DNA nuclear (nDNA) se realizó mediante qRT-PCR. En primer lugar, se extrajo el DNA total de las distintas líneas

celulares (U2OS +/+, U2OS FASTKD3 +/- y U2OS FASTKD3 -/-) según se describe en el apartado 1.2 de esta misma sección. La línea celular 143B rho se utilizó como control negativo. Para la cuantificación de mtDNA se utilizó la siguiente pareja de *primers*: *primer* SEN: 5'-CCACGGGAAACAGCAGTGAT-3' y el *primer* ATS: 5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3', los cuales amplifican un fragmento del gen *mt-RNR1* mitocondrial y una sonda Taqman marcada en 5' con el fluorocromo 6FAM (5'-FAM-TGCCAGCCACCGCG-MGB-3') para su detección. Para la cuantificación del nDNA se usó el Kit Human RNasa P (Applied Biosystems), que incluye una pareja de primers que amplifican un fragmento del gen nuclear RNasa P, y una sonda TaqMan marcada en 5' con el fluorocromo VIC para su detección. Cada pocillo a estudiar contenía una mezcla de 1X de Taqman universal PCR mastermix (Applied Biosystems), 1 µl del kit RNasa P, 112 nM de cada *primer* de mtDNA, 125 nM de la sonda mitocondrial marcada con 6FAM (6-carboxifluoresceína, fluoróforo que sirve para marcar oligonucleótidos) y 2 ó 10 ng del DNA total, obteniendo así un volumen final de reacción de 20 µl. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo 2 min a 50°C, 1 ciclo 10s a 60°C y 45 ciclos que constan de: 95°C 15s y 1 min a 60°C. La cuantificación de las muestras se realizó por duplicado y con dos concentraciones distintas (2 y 10 ng de DNA total). La cuantificación absoluta del mtDNA y nDNA se calculó utilizando una curva de calibración realizada por dilución de una solución madre, consistente en una mezcla de un número conocido de copias de dos plásmidos, uno con el fragmento del gen *mti-RNR1* del mtDNA y otro con el fragmento del gen RNasa P nuclear. El número de copias del mtDNA de este calibrador se determinó dividiendo su concentración por el peso molecular de cada plásmido.

2.8. Producción y uso de lentivirus.

2.8.1. Producción de lentivirus.

Los lentivirus fueron producidos por co-transfección de tres plásmidos en la célula empaquetadora 293FT. Los tres plásmidos utilizados fueron: plásmido de empaquetamiento pPAX-2, el plásmido de envoltura pMD2g y el plásmido de que contenga el gen de nuestro interés. Una vez que las células alcanzaron una confluencia de 80-90% realizamos la transfección, para ello, media hora antes, se cambió el medio por medio completo sin antibiótico. El complejo de transfección se generó utilizando 500 µl de Opti-MEM mezclándolo con 22,5 µg de DNA total (5 µg de pMD2g, 7,5 µg de pPAX-2 y 10 µg del plásmido de transferencia), con 500 µl de Opti-MEM que contiene 45 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Tras combinar el DNA

con la lipofectamina, se dejó incubar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente para la formación de los liposomas. A continuación dicha mezcla se añadió a las células en cultivo y se incubaron durante toda la noche a 37°C a 7% CO₂. Al día siguiente se reemplazó el medio por medio completo con antibiótico y las células se incubaron durante 48 horas más para facilitar la acumulación de lentivirus en el sobrenadante. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min, y se descartó el sedimento que contiene restos celulares (debris). El sobrenadante, que contiene los viriones, se filtró con un filtro de 0,45 µm, y el filtrado se ultracentrifugó a 25.000 rpm durante 2 horas. Descartamos el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire durante 1 h. El sedimento seco se incubó con 500 µl de una solución de albúmina humana en PBS al 1% (w/v) durante una noche a 4°C. Finalmente, el sedimento se resuspendió y se realizaron alícuotas de 100 µl cada una de ellas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2.8.2. Titulación de vectores lentivirales.

Para obtener la titulación de los vectores lentivirales, la solución viral fue purificada utilizando el kit *Pure Link Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen). Posteriormente, el RNA purificado se transformó en cDNA, y por último, realizamos qRT-PCR, en la que la mezcla de reacción de volumen final de 25 µl contenía: 5 µl de una dilución 1/10 de cDNA, mezcla SYBR Green I Master 1X y los *primers* FLV y RLV cuya secuencia se indica en Sastry L., et al., 2002, a una concentración final de 0,4 µM. Tras una incubación de 10 min a 95°C (para desnaturalizar el DNA y activar la Taq polimerasa), el cDNA se amplificó mediante 40 ciclos de PCR de 15 s a 95°C, 30 s a 60°C y 40 s a 72°C, tras los cuales se añadió una curva de fusión para comprobar la especificidad del amplificado, esta consistió en: 1 min a 65°C, 1 min a 35°C, 1 s a 65°C y una medición continua de la fluorescencia hasta llegar a 95°C y finalmente enfriamiento, 1 ciclo durante 30 s a 40°C. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

Para la obtención de la recta estándar se incluyeron muestras con concentraciones conocidas del plásmido correspondiente (entre 10³ y 10¹⁰ copias/µl). Para cada sobrenadante a titular se obtuvo el número de copias por interpolación con la recta estándar. Este valor nos indica las partículas virales eficientes presentes en el volumen utilizado inicialmente (5 µl).

2.8.3. Transducción con Lentivirus.

El día antes de la transducción, se sembraron las células U2OS en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Para la transducción, retiramos el medio y añadimos 1 ml de medio completo con 5 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno que es un polímero catiónico que incrementa la eficiencia de la transducción y sobre esto se añadió el lentivirus pSin-Sox2-FASTKD3 wt, pSin-Sox2-FASTKD3- Δ 53-57, y pSin-Sox2-FASTKD3- Δ RAP respectivamente a una MOI de 10^2 . Las células infectadas se incubaron durante 12 h a 37°C y 7% de CO_2 , y transcurrido este tiempo, reemplazamos el medio por medio completo fresco y lo incubamos durante 12 h adicionales a 37°C , 7% de CO_2 . A las 24 h de la transducción, suplementamos el medio completo con puromicina (2 $\mu\text{g/ml}$) que nos sirvió como antibiótico de selección y se incubaron las células infectadas a 37°C y 7% de CO_2 hasta la obtención de clonas resistentes a puromicina.

2.9. Microscopía de fluorescencia.

Para estudiar si FASTKD3 se localiza en los gránulos de RNA mitocondriales, se usaron células U2OS wt transfectadas con FASTKD2-HA y FASTKD3-GFP a una concentración de 1 μg y 2 μl de Lipofectamina 2000. Previamente las células fueron plaqueadas a una densidad de 35.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos que poseían cristales de 12 mm (que habían sido previamente incubados con medio completo). Se dejaron durante 24 horas en el incubador a 37°C a 7% de CO_2 . Transcurridas 48 horas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, tras lo cual se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente, después se lavaron 3 veces con PBS. A continuación se permeabilizaron con 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS, y seguidamente se realizó el bloqueo con 1% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) durante 30 min. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario anti-HA (Sigma-Aldrich) diluido 50 veces en solución de bloqueo. Después se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno de ellos con PBS, y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen), durante 30 min. Finalmente, se realizó el montaje de los cristales en el portaobjetos utilizando medio de montaje, para realizar su visualización utilizando un microscopio confocal utilizando los filtros apropiados.

Para estudiar el impacto de la delección del dominio RAP y de sus aminoácidos 53-57 en la localización mitocondrial de FASTKD3, se transfectaron células U2OS (35.000

células por pocillo en placas de 24 pocillos) con los plásmidos pEGFP-N1-FASTKD3 WT, pEGFP-N1-FASTKD3 Δ 53-57 y pEGFP-N1-FASTKD3- Δ RAP usando lipofectamina 2000. Después de 48 h de haber realizado la transfección, las células fueron tripsinizadas y sembradas sobre cristales de 12 mm. Tras 24 horas de incubación las células fueron marcadas con Mito Tracker Rojo (CMX-ROS, fluoróforo que tiñe las mitocondrias de las células vivas de color rojo, su acumulación es dependiente del potencial de membrana) y con Hoechst 33258 (fluoróforo que tiñe los núcleos de color azul). Para realizar este marcaje, las células fueron previamente lavadas 2 veces con PBS, posteriormente añadimos Mito Tracker a una concentración de 125 nM y dejamos incubar 15 min a 37°C. Pasado este tiempo, lavamos 3 veces con PBS, y fijamos con metanol frío 10 min a temperatura ambiente. Lavamos 2 veces con PBS e incubamos con Hoechst 33258 a una concentración final de 50 ng/ml en PBS, durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente lavamos 2 veces con PBS y montamos los cristales en el portaobjetos para poder ser observados con un microscopio confocal.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE LOS mtRNAs EN LA LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 *KNOCKOUT*.

Todos los miembros de la familia FAST se encuentran en la mitocondria, gracias a una señal de localización mitocondrial en su extremo amino terminal (Simarro et al., 2010).

Diferentes autores han descrito la localización concreta de algunos de los miembros de la familia FAST dentro de la mitocondria. El miembro fundador FAST en los gránulos mitocondriales de RNA (Jourdain et al., 2015). Al igual que FAST; FASTKD2 y FASTKD5 se localizan en dichos gránulos, que representan los centros de procesamiento post-transcripcional del RNA y biogénesis de los ribosomas mitocondriales (Antonicka et al., 2015). A diferencia de FAST, FASTKD2 y FASTKD5, FASTKD4 se localiza de forma difusa en la matriz mitocondrial (Wolf et al., 2014).

Sabiendo que tres de los miembros de la familia FAST se encuentran en los gránulos mitocondriales de RNA, quisimos comprobar si FASTKD3 también poseía esta misma localización. Para ello, estudiamos mediante microscopía de fluorescencia la localización de FASTKD3 en células U2OS transfectadas con los plásmidos FASTKD2-HA y pFASTKD3-GFP wt. Para la detección de FASTKD2 utilizamos un anticuerpo frente al epítipo HA que se encuentra en el extremo carboxilo de FASTKD2.

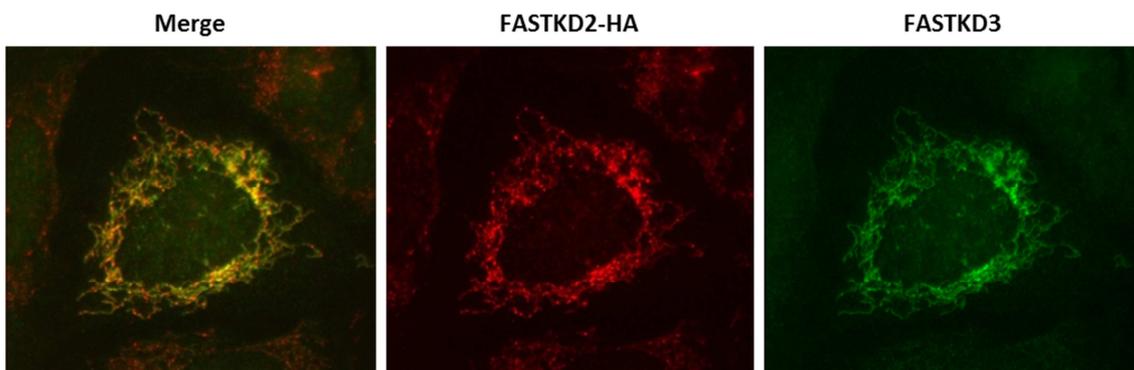


Figura 23. Imagen en la que se muestra FASTKD2 (en color rojo) y FASTKD3 (en verde) y la imagen superpuesta (merge).

Como observamos en la **figura 23**, FASTKD3 no colocaliza con FASTKD2, por lo que podemos concluir que FASTKD3 no se encuentra en los gránulos mitocondriales de RNA.

Aun así, dado que teníamos evidencias previas de que FASTKD3 interacciona con proteínas involucradas en el procesamiento y traducción del RNA mitocondrial no

descartamos su posible función en estos procesos (Simarro et al., en 2010). Además, es importante recordar que todos los miembros de la familia FAST poseen un posible dominio de unión al RNA denominado dominio RAP (dominio de unión a RNA abundante en Apicomplexas) de aproximadamente 60 aa.

Todo lo expuesto nos llevó a generar una línea celular deficiente en FASTKD3 que nos permitiese estudiar el impacto de su delección en el procesamiento, maduración y traducción de los RNAs mitocondriales.

La línea celular escogida fue U2OS. Se trata de una línea celular de osteosarcoma de una niña caucásica de xx años, ampliamente caracterizada por otros investigadores y en la que se habían realizado los estudios previos para FASTKD3 (Simarro et al., 2010).

1.1. Diseño y construcción del plásmido pAAV-MCS-FASKD3 y TALENs específicas.

Para la generación de nuestra línea celular deficiente para FASTKD3 (FASTKD3 *knockout*, KO), examinamos en primer lugar la estructura del gen. El gen FASTKD3 posee 7 exones y 8 intrones, encontrándose el ATG al inicio del exón 2. Por ello se decidió realizar un vector que constaba de dos brazos de homología que flanqueaban el exón 2 de FASTKD3 para conseguir su delección tras el proceso de RH. El vector poseía además un casete de resistencia a blasticidina que permitía la selección de las células que integraban el mismo.

1. Dos brazos de homología (*ARM 1* y *2*), con un tamaño de 982 pb y 1.387 pb respectivamente. Fueron obtenidos mediante amplificación por PCR de DNA genómico de células U2OS.
2. Un casete de resistencia a blasticidina flanqueado por dos LoxP, se obtuvo mediante digestión con enzimas de restricción Sall/EcoRI del plásmido pBS-blasticidina, el producto obtenido fue de un tamaño de 1.582 pb.
3. Finalmente la región de clonación múltiple (MCS), se obtuvo del plásmido comercial pAAV-MCS mediante digestión con la enzima NotI, el fragmento obtenido fue de un tamaño de 2.887 pb.

Todos los fragmentos se purificaron a partir de una electroforesis en gel de agarosa, además los brazos de homología fueron posteriormente digeridos con NotI/Sall, EcoRI/NotI, sitios que fueron introducidos en los *primers* utilizados para las diferentes PCRs. Finalmente, estos fragmentos fueron nuevamente purificados a partir

de un gel de agarosa, y con ellos se realizó la ligación de los cuatro fragmentos descritos previamente.

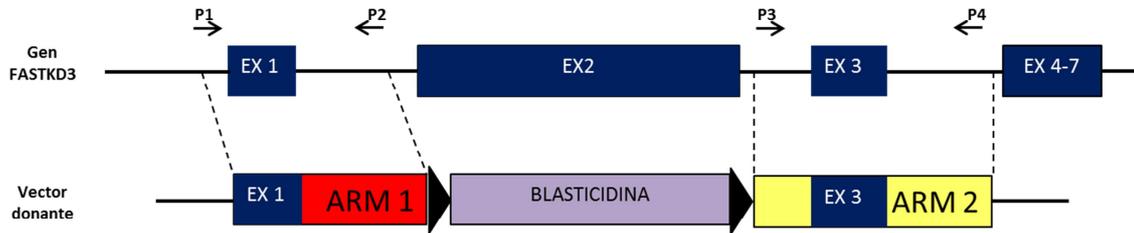


Figura 24. Diseño de los brazos de homología.

P1	5'-ATTGCGGCCGCCTGGAAAGCGCCTAGAAC-3'
P2	5'-TAAGTCGACGCTCTATGCATCTGAAAATCAGCGAGGTTAGAGCAAGGCAAG-3'
P3	5'-ATAGAATTCTAGAAAGCTGGAAAACGTGCCCTGAAGTTAACAGATGCTGG -3'
P4	5'-TATGCGGCCGCATTTGGGCGTAGAAACTGA-3'

Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación del cada brazo de homología.

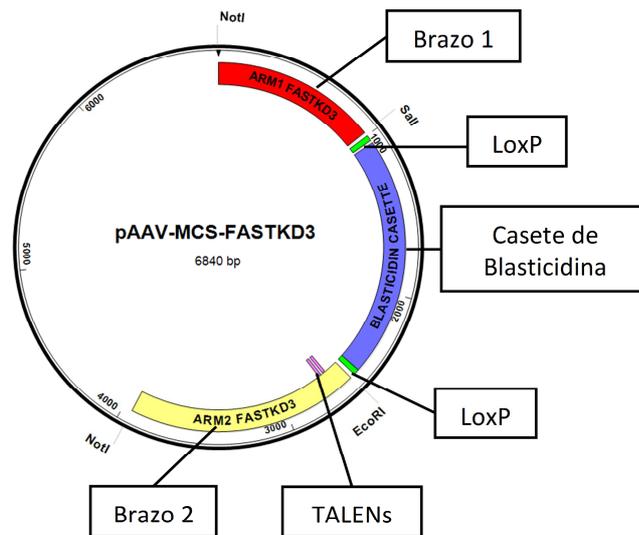


Figura 25. Estructura final del plásmido pAAV-MCS-FASTKD3.

Las colonias obtenidas del producto de la ligación fueron analizadas mediante digestión con los diferentes enzimas de restricción para verificar la correcta ligación de los diferentes fragmentos. Según las enzimas utilizadas, los pesos esperados fueron los siguientes:

- ▶ NotI/NotI: 3.953 pb y 2.887 pb.
- ▶ NotI/Sall: 2.969 pb, 2.887 pb y 984 pb.
- ▶ NotI/EcoRI: 2.887 pb, 2.566 pb y 1.387 pb.
- ▶ EcoRI/Sall: 5.258 pb y 1.582 pb.

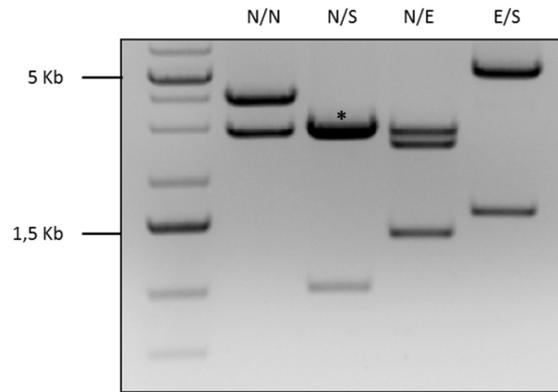


Figura 26. Imagen que muestra los resultados obtenidos de la comprobación de la correcta ligación del plásmido pAAV-MCS-FASTKD3, realizadas con NotI/NotI, NotI/Sall, NotI/EcoRI y EcoRI/Sall.

Una de las colonias positivas obtenidas en este punto, se utilizó para la extracción del DNA plasmídico mediante midiprep. Se comprobó su pureza y se confirmó nuevamente con las enzimas utilizadas previamente que el patrón obtenido era el correcto.

Con el objetivo de generar una DSB en el DNA, y aumentar la frecuencia de recombinación homóloga, nos planteamos el diseño y la construcción de TALENs. Las TALENs son unas proteínas de fusión que producen un corte en la doble hebra de DNA debido a que poseen la nucleasa FokI. La especificidad por una secuencia de DNA determinada viene dada por 2 aminoácidos que se encuentran en la posición 12 y 13 y que son conocidos como unidades de repetición variables. En nuestro caso, las TALENs reconocen una región específica del gen FASTKD3, localizada al inicio del brazo 2 de homología (*ARM 2*) de nuestro plásmido pAAV-MCS-FASTKD3.

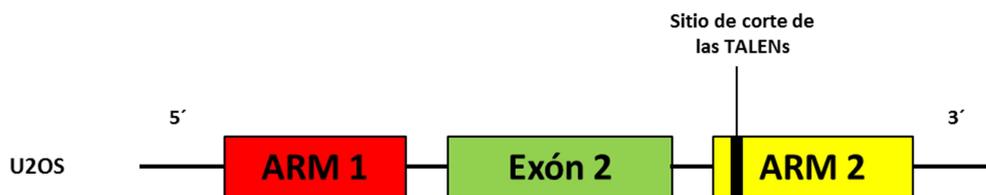


Figura 27. Esquema del DNA de la célula U2OS, indicando la posición de nuestros brazos de homología y el sitio de corte para las TALENs.

Para su diseño, utilizamos algoritmos “online” descritos anteriormente en el apartado 4.1 de materiales y métodos, que nos permitieron elegir las secuencias óptimas para la construcción de las TALENs adecuadas, (se indican encuadradas en rojo en la **figura 28**), además los algoritmos nos indicaron los plásmidos 2-mer necesarios para construir la pareja de TALENs como se muestra en la **figura 28**.

(1) TGTCTCAGATAAACTGACTT in BB-L2-T					
1GT2	A12	1GTCTCA4	A1		2.5µl
2CT3	D8	1GTCTCA4	A1		2.5µl
3CA4	B9	1GTCTCA4	A1		2.5µl
BB-L1-ID41	G1	1GTCTCA4	A1		2.5µl
4GA1	F1	4GATAAA3	A2		2.5µl
1TA2	B1	4GATAAA3	A2		2.5µl
2AA3	D1	4GATAAA3	A2		2.5µl
BB-L1-ID34	G2	4GATAAA3	A2		2.5µl
3CT4	B12	3CTGACT2	A3		2.5µl
4GA1	F1	3CTGACT2	A3		2.5µl
1CT2	A8	3CTGACT2	A3		2.5µl
BB-L1-ID23	G3	3CTGACT2	A3		2.5µl
(2) TCCTAAGAATGCTGCAATT in BB-L2-T					
1CC2	A6	1CCTAAG4	A4		2.5µl
2TA3	E1	1CCTAAG4	A4		2.5µl
3AG4	B7	1CCTAAG4	A4		2.5µl
BB-L1-ID41	G1	1CCTAAG4	A4		2.5µl
4AA1	E5	4AATGCT3	A5		2.5µl
1TG2	B3	4AATGCT3	A5		2.5µl
2CT3	D8	4AATGCT3	A5		2.5µl
BB-L1-ID34	G2	4AATGCT3	A5		2.5µl
3GC4	C2	3GCAATT2	A6		2.5µl
4AA1	E5	3GCAATT2	A6		2.5µl
1TT2	B4	3GCAATT2	A6		2.5µl
BB-L1-ID23	G3	3GCAATT2	A6		2.5µl

Figura 28. Imagen obtenida a partir de la página de internet <http://www.homunglab.de/Tassembly.html>, mediante la cual obtuvimos la secuencia de las TALENs a construir, además de los 2-mer y de los plásmidos que se han utilizado para cada ligación.

Después de obtener los plásmidos comerciales y mediante un proceso de auto-ligación entre 3 fragmentos 2-mer obtenidos mediante digestión con la enzima Mva1269I, y el plásmido de nivel 1 (BBL1) linearizado mediante digestión con KpnI y PstI, se obtuvieron los plásmidos 6-mer.

Las ligaciones de los 2-mer con los BBL1, se realizaron según se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1.

Posteriormente las colonias obtenidas se comprobaron mediante digestión con Mva1269I. Las bacterias que incorporaron el inserto ligado de forma correcta presentaron un patrón de bandas de 2.700 pb y 700 pb (**figura 29**).

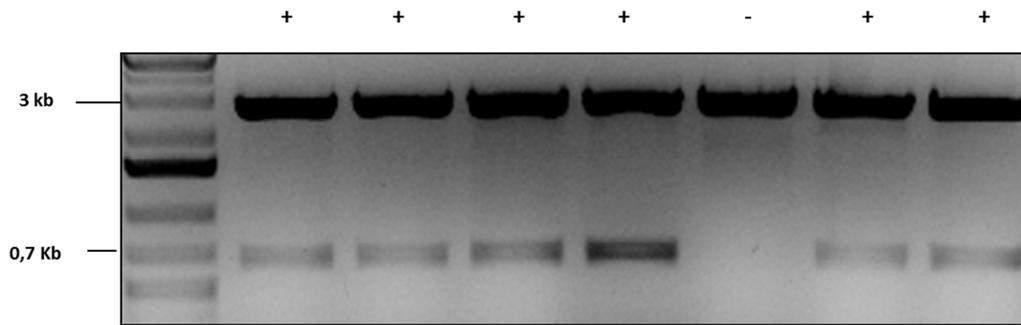


Figura 29. Imagen de las digestiones realizadas para comprobar la correcta ligación de los 6-mer mediante digestión con la enzima Mva1269I. Para las colonias positivas (+), obtuvimos dos bandas, una de alrededor de 2.700 pb y otra de alrededor de 700 pb. Cualquier otro patrón significa que la colonia es negativa (-).

A continuación, los fragmentos 6-mer fueron liberados mediante digestión con la enzima Mva1269I, tras lo cual y nuevamente por el proceso de auto-ligación, 3 de estos 6-mer fueron ligados al plásmido de nivel 2 (BBL2) previamente digerido con KpnI; de este modo se obtuvieron los dos plásmidos 18-mer finales. Finalmente, se realizó digestión de comprobación del correcto ensamblaje mediante digestión doble con las enzimas de restricción XbaI/XhoI, obteniendo fragmentos de aproximadamente 5.300 pb y 3.300 pb en las colonias positivas.

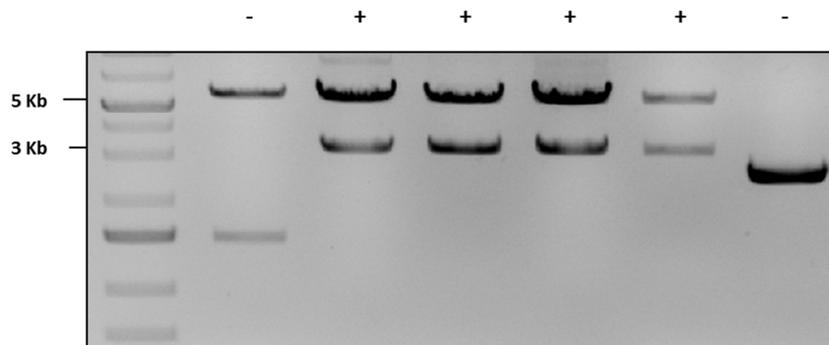


Figura 30. Imagen de las digestiones de comprobación de la ligación correcta de los 18-mer con las enzimas XhoI/XbaI, obteniendo en las colonias positivas (+) un patrón de bandas de 5.300 pb y 3.300 pb. Cualquier otro patrón de bandas significa que la colonia es negativa (-).

A partir de estas colonias bacterianas se obtuvieron los plásmidos finales de ambas TALENs que han sido utilizadas para generar una línea celular U2OS FASTKD3 KO.

1.2. Transfección y screening celular.

Una vez creadas nuestras herramientas de trabajo (TALENs y pAAV-MCS-FASTKD3), realizamos la transfección en células U2OS. Para ello, se usaron 200 ng de cada TALEN junto con 200 ng de nuestro plásmido pAAV-MCS-FASTKD3 usando

Lipofectamina 2000. Esta mezcla se realizó en OPTI-MEM, se dejó incubar durante 12 horas, tras las cuales se retiró el medio y se sustituyó por medio completo, se dejó incubar durante 48 horas, transcurrido este tiempo, se añadió la blasticidina (5 µg/ml) como antibiótico de selección, se dejó 48 horas y posteriormente se plaquearon las células en una placa de 96 pocillos, al que añadimos medio completo suplementado con blasticidina (5 µg/ml). Las células se mantuvieron en placas de 96 pocillos hasta que los clones ocupaban el 85-90% de la superficie del pocillo para ser analizados. Se extrajo el DNA de los pocillos policlonales obtenidos y se analizó mediante PCR, utilizando *primers* internos (P6 y P7) y externos a la secuencia insertada (P5 y P8), al igual que se utilizaron *primers* de blasticidina y externos a la secuencia insertada, para verificar su correcta inserción. La secuencia de los *primers* se indica en el anexo 1.

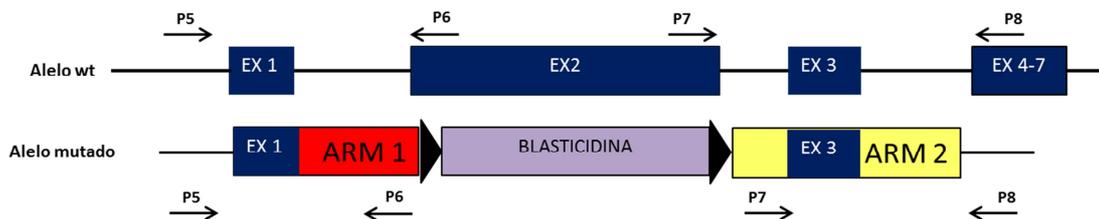


Figura 31. Esquema en el que se muestra la localización de los *primers* utilizados para el análisis mediante PCR.

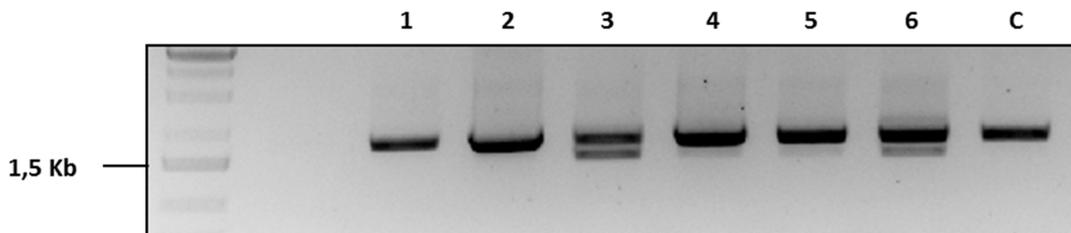


Figura 32. Imagen en la que se muestra los resultados obtenidos mediante PCR del brazo 2 (*ARM 2*) con los *primers* P7 y P8. El patrón de bandas esperado es de 1.750 pb para el alelo wt y 1.450 pb para el alelo ko. En esta imagen podemos observar poblaciones wt en las muestras 1 y 2 y poblaciones policlonales en las muestras 3, 4, 5 y 6.

Tras la obtención de pocillos en los que obtuvimos una población policlonal, se realizó dilución límite del pocillo número 3, que como se observa en la **figura 32**, había más posibilidad de aislar un clon heterocigoto único ya que la banda correspondiente al alelo mutado era más intensa que en resto de muestras. Posteriormente se volvió a realizar el análisis con los mismos *primers* mencionados anteriormente además de utilizar los *primers* localizados en la blasticidina (P9 y P10) y externos a nuestro plásmido (P5 y P11). Tras este análisis obtuvimos clones heterocigotos únicos. La secuencia de los *primers* se indica en el anexo 1.

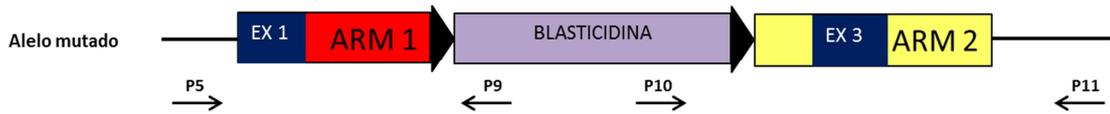


Figura 33. Esquema del alelo mutado en el que se indica la posición de los *primers* con los que hemos realizado los análisis para comprobar la presencia o ausencia de blasticidina.

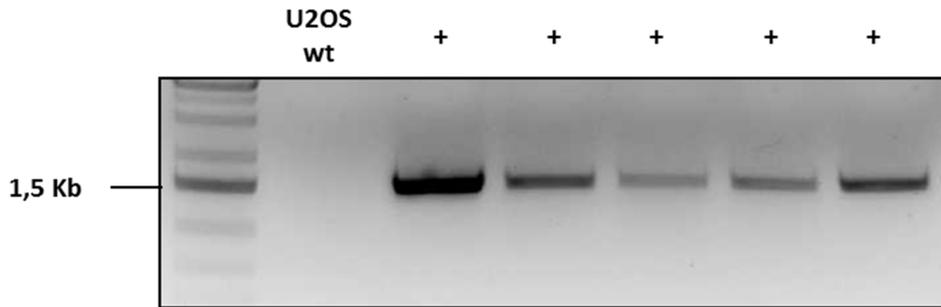


Figura 34. Comprobación de la presencia de blasticidina con los *primers* P5 y P9, obteniendo un amplificado de 1.451 pb para los clones que poseen la blasticidina (+). En las células U2OS wt no observamos ningún amplificado ya que no poseen el casete de resistencia a blasticidina.

El siguiente paso para conseguir nuestro propósito, fue tratar el clon seleccionado con Cre recombinasa, que es una proteína de fusión (His-TAT-NLS-Cre) producida en el laboratorio. Mediante el uso de la Cre recombinasa eliminamos el casete de blasticidina que se encuentra flanqueado por 2 sitios LoxP. Fue utilizada a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ en Opti-MEM, y se dejó actuar a 37°C y 7% de CO₂ durante una hora. Transcurrido este tiempo se eliminó la mezcla y se sustituyó por medio completo.

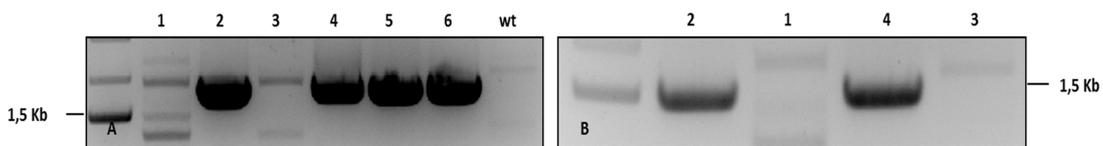


Figura 35. En ambas imágenes se muestran los resultados de la comprobación de la ausencia del casete de blasticidina mediante PCR. **A.** PCR con los *primers* P10 y P11. Observamos que las muestras con blasticidina, presentan un amplificado de 1.778 pb, mientras que la muestra wt y dos muestras más no presentan esa banda (1 y 3). **B.** PCR con los *primers* P5 y P9, esperando obtener un amplificado de 1.451 pb en las que poseen el casete de resistencia a blasticidina (muestras 2 y 4), mientras que en las otras dos muestras no observamos ese amplificado (muestras 1 y 3).

Cuando se obtuvieron clones en los que se había eliminado el casete de resistencia a blasticidina, se realizó la segunda transfección de la misma manera que se ha

descrito anteriormente, con el objetivo de mutar el otro alelo, y obtener células homocigotas para el gen deletado.

Una vez realizada la segunda transfección, se realizó nuevamente dilución límite y análisis mediante PCR con *primers* externos (P5 y P8) e internos (P6 y P7) a la secuencia insertada, hasta encontrar algún clon que poseyese los dos alelos mutados, lo que significa que nuestro clon es KO para FASTKD3.

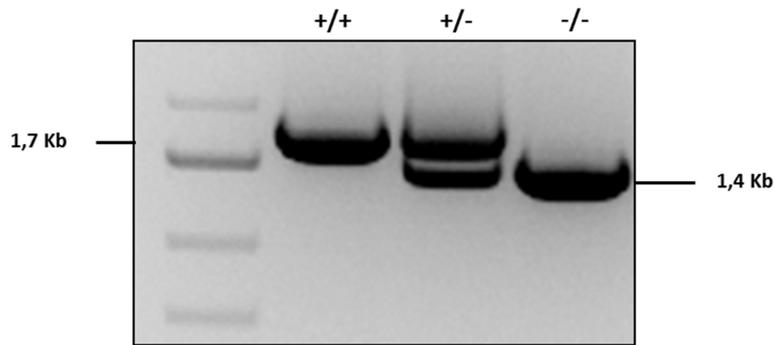


Figura 36. Imagen en la que se muestra el resultado de la PCR utilizando los *primers* P7 y P8. El patrón de bandas observado es el esperado, ya que obtuvimos un amplificado de 1.701 pb para el alelo wt (+/+) y otro de 1.449 pb para el alelo KO (-/-).

Finalmente obtuvimos un clon U2OS FASTKD3 KO (-/-), ya que observamos un único amplificado de 1.449 pb como resultado de la PCR con los *primers* P7 y P8 como observamos en la **figura 36**.

Una vez comprobado que nuestro clon era KO, ampliamos el *screening*, mediante el diseño una pareja de *primers* que nos permitieron determinar si los dos alelos presentaban o no el casete de blastocidina. Ambos *primers* se localizaron en las regiones de homología, el *primer* P14, se encuentra al final del brazo 1 (*ARM 1*), mientras que el P15 se situó al inicio del brazo 2 (*ARM 2*) como podemos observar en la **figura 37**.

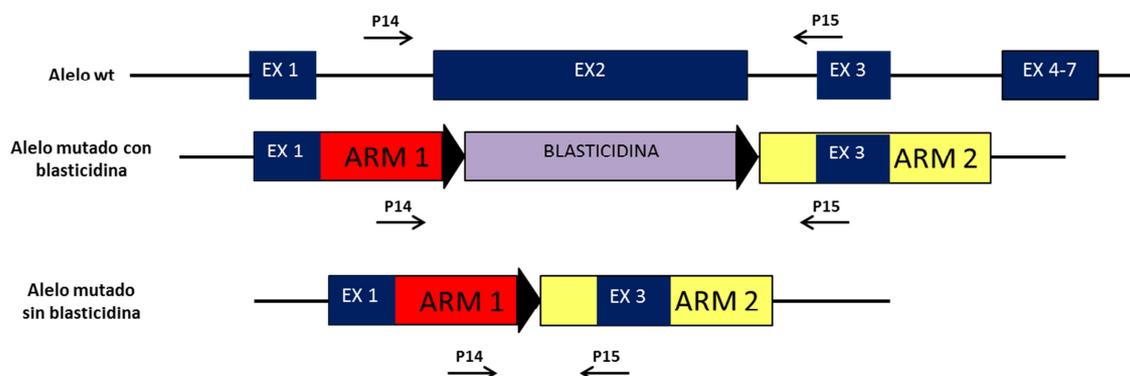


Figura 37. Imagen en la que se muestra la localización de los *primers* P14 y P15 en las tres posibles alternativas.

Una vez realizada la PCR con los *primers* P14/P15, observamos tres patrones de bandas diferentes en función de las características de cada alelo como podemos observar en la **figura 37**.

- ▶ Alelo wt: 2.700 pb.
- ▶ Alelo con blasticidina: 2.200 pb
- ▶ Alelo sin blasticidina: 700 pb.

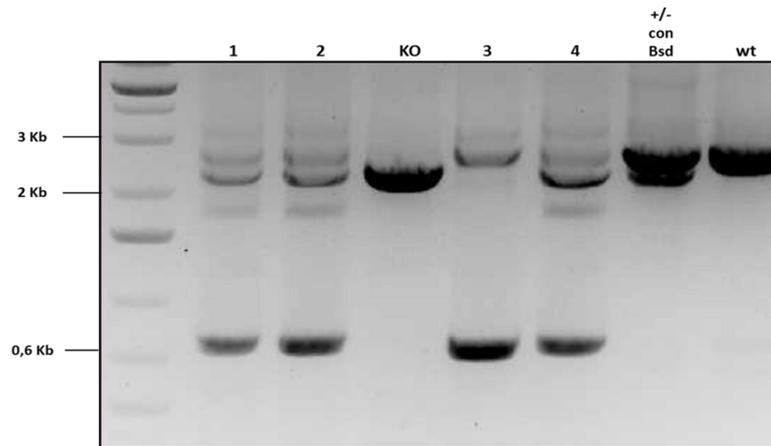


Figura 38. Imagen en la que se aprecia como las muestras 1, 2, 3 y 4 son una mezcla de células, mientras que los carriles KO, +/- con Bsd y wt presentan los patrones de bandas esperados.

Como resultado de la PCR que se muestra en la **figura 38**, observamos que nuestro clon KO poseía el casete de blasticidina en ambos alelos, lo cual fue un hallazgo inesperado, ya que este clon procedía de otro al cual habíamos eliminado previamente dicho casete. Por otro lado, la muestra heterocigota (+/-) con blasticidina presentaba el patrón de bandas esperado, ya que observamos la banda de 2.700 pb correspondiente al alelo wt y la banda de 2.200 pb correspondiente al alelo con blasticidina.

Para volver a corroborar mediante PCR que habíamos obtenido un clon U2OS FASTKD3 KO, se realizó otra PCR con *primers* situados en el exón 2 (P12 y P13), de esta manera, la ausencia de amplificado nos verificó la ausencia de nuestro gen de interés en el clon KO.



Figura 39. Esquema de la localización de los *primers* P12 y P13 en el gen FASTKD3 del alelo wt.

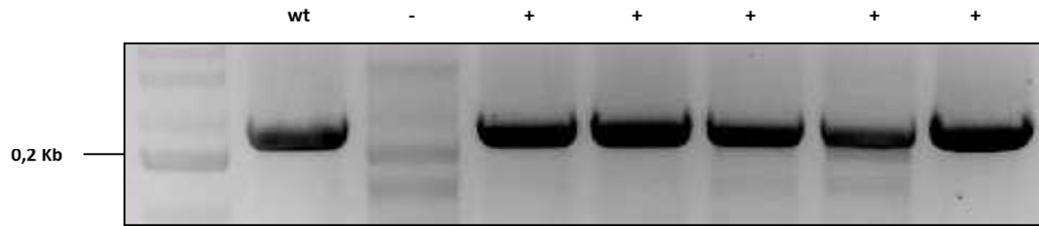


Figura 40. Imagen en la que se muestra el resultado de la PCR utilizando los *primers* P12 y P13. El amplificado obtenido en las células que presentan dicho exón es de 236 pb (+), mientras que hay ausencia de amplificado para las muestras que no poseen el exón 2 (-), que corresponde a nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO.

Mediante todas estas PCRs confirmamos que habíamos generado una línea celular U2OS FASTKD3 KO.

1.3. Comprobación de la ausencia de FASTKD3 mediante qRT-PCR y *Western-blot*.

Para demostrar la ausencia de mRNA de FASTKD3 en la línea celular U2OS FASTKD3 KO, realizamos una qRT-PCR con *primers* situados en el interior del exón 2 (P12 y P13), de este modo pudimos verificar la ausencia de mRNA de FASTKD3 en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO. Para ello, utilizamos los genes 18S y β -actina como normalizadores. El método de cuantificación utilizado fue $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en el que se compararon directamente los Cts del gen testado (FASTKD3) y los genes de referencia (18S y β -actina) (ΔCt) para cada muestra.

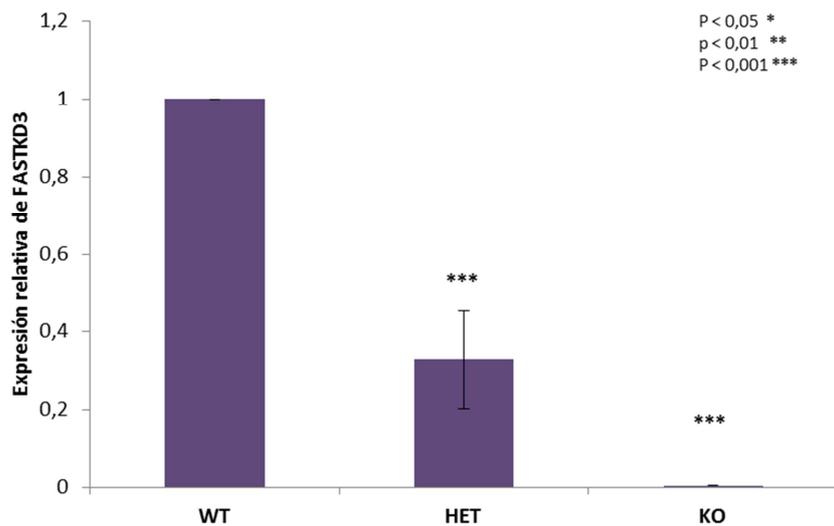


Figura 41. Representación gráfica de la expresión relativa de FASTKD3 obtenida mediante qRT-PCR.

Mediante este experimento se comprobó la ausencia total de mRNA FASTKD3 en la línea celular U2OS FASTKD3 KO, y una disminución de la expresión de FASTKD3 de aproximadamente el 60% en nuestra línea celular U2OS FASKTD3 heterocigota.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los estudios realizados de la expresión de FASTKD3 en las diferentes líneas celulares se realizó en el programa informático Excel mediante el cual se calculó la desviación estándar y el *test* de Student.

Para comprobar la ausencia de la proteína FASTKD3 en la línea celular U2OS FASTKD3 KO, se realizó un *Western-blot* usamos anticuerpo policlonal de conejo α -FASTKD3, que reconoce los últimos 350 aa del extremo carboxilo terminal de la proteína.

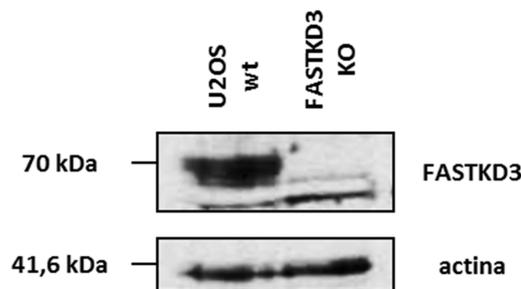


Figura 42. Imagen obtenida del análisis por *Western-blot* de FASTKD3 en células U2OS. En el primer carril se observa la presencia de la proteína FASTKD3 de 70 kDa en las células U2OS wt. En el segundo carril observamos la ausencia de la proteína FASTKD3 en la línea celular U2OS FASTKD3 KO.

El resultado del *Western-blot* demostró ausencia de la proteína FASTKD3 en la línea celular U2OS FASTKD3 KO y la presencia en la línea celular U2OS wt, lo cual corrobora los resultados obtenidos previamente mediante las diferentes PCRs y qRT-PCR.

1.4. Efectos de la ausencia de FASTKD3 sobre los mRNAs mitocondriales.

Estudios sobre alguno de los miembros de la familia FAST, han observado interacciones entre dichos miembros con mRNAs mitocondriales. Jourdain et al., en 2015 han observado que FAST regula la expresión del mRNA de ND6, la única secuencia codificante localizada en la hebra ligera del mtDNA. Antonicka et al., 2015, han descrito que FASTKD5 es necesario para la maduración de precursores de mRNAs que no se encuentran flanqueados por tRNAs y por lo tanto no pueden ser

procesados por la vía normal de maduración de mRNA. Mientras que FASTKD2 parece estar asociado con el rRNA mitocondrial 16S y ser imprescindible para su síntesis.

Por todos estos antecedentes, una vez generada nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO realizamos en primer lugar el análisis de los transcritos mitocondriales mediante *Northern-blot*.

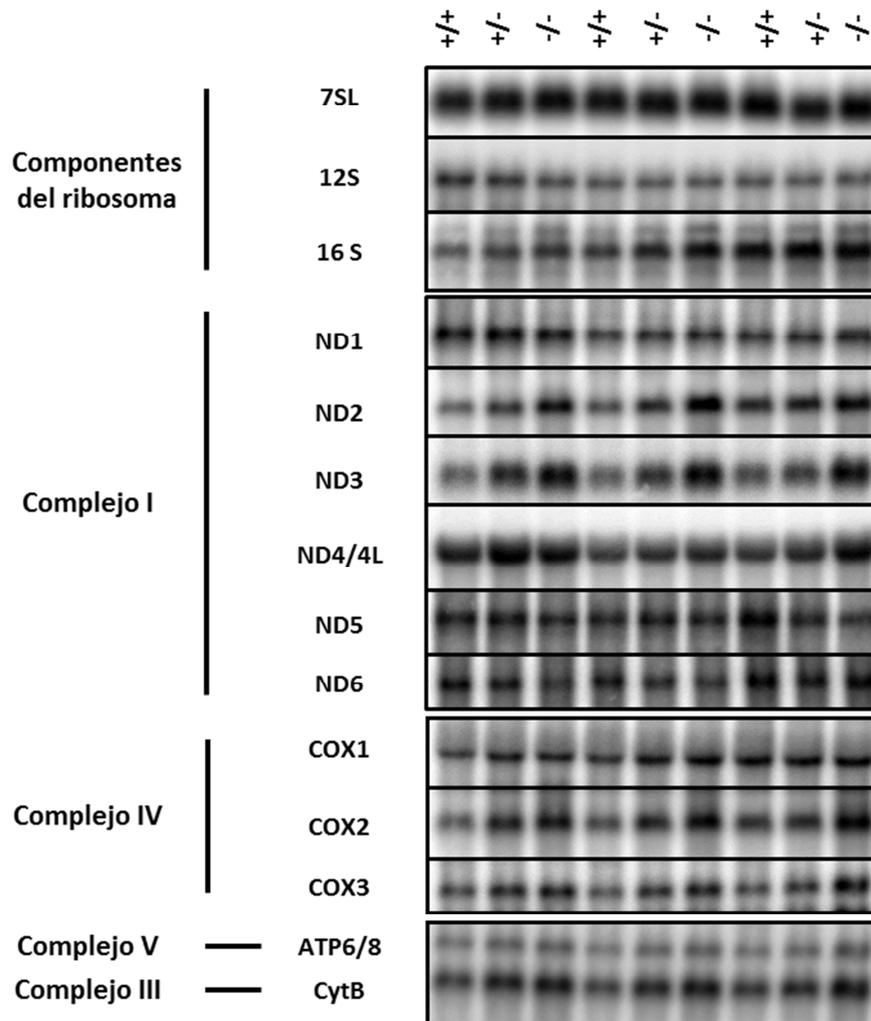


Figura 43. Análisis por *Northern-blot* realizado por triplicado.

Los resultados observados en la **figura 43** muestran mayor cantidad de mRNA maduro en la línea celular U2OS FASTKD3 KO (-/-) para COX2, COX3, ND2, ND3, ND4/4L, CytB y ATP6/8 que en la línea celular U2OS wt (+/+), mientras que en la línea celular U2OS heterocigota para FASTKD3 (+/-) observamos un aumento intermedio entre las líneas celulares wt y KO. Además, mediante esta técnica observamos que tanto la línea celular KO como la heterocigota no presentaban alteraciones en el mRNA maduro en ninguna de las subunidades ribosómicas 16S y 12S, lo que nos

sugirió que la biogénesis del ribosoma mitocondrial no se encontraba afectada. Tampoco se observó una alteración en el procesamiento de los mRNAs que no se encuentran flanqueados por tRNAs.

En paralelo, cuantificamos la expresión relativa de los transcritos mitocondriales mediante qRT-PCR utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando los *primers* indicados en Nagao et al., 2008, (sus secuencias se indican en el anexo 1). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

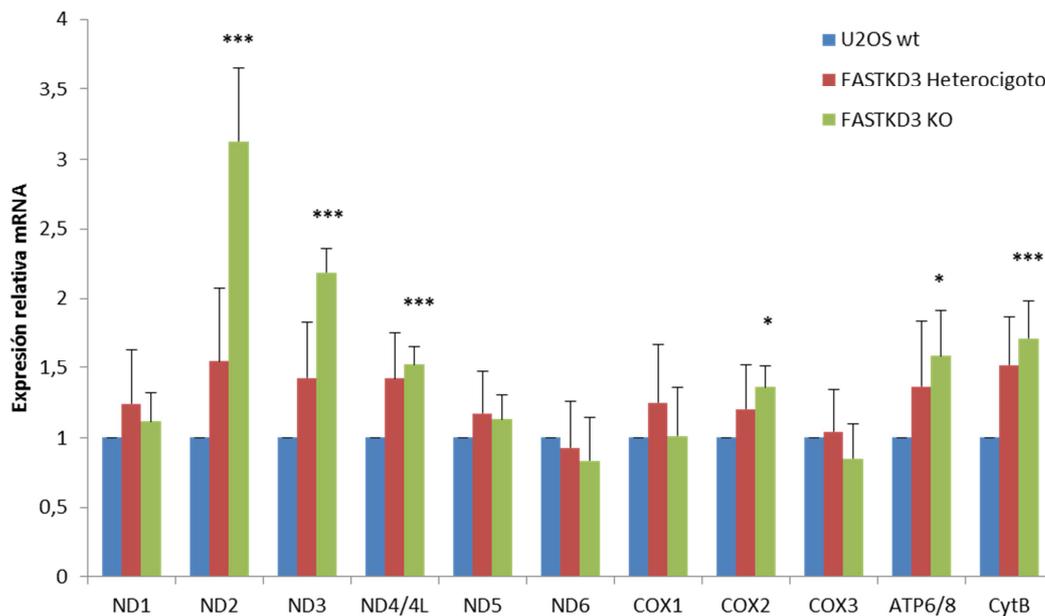


Figura 44. Gráfico en el que se muestra la expresión relativa de los diferentes transcritos mitocondriales mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** y $p < 0,001$ ***).

Los resultados obtenidos que se muestran en la **figura 44**, demuestran aumentos significativos en la expresión relativa de ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB en la línea celular U2OS FASTKD3 KO, mientras que en la línea celular U2OS FASTKD3 heterocigota observamos aumento en los mismo transcritos, pero dicho aumento no es significativo.

Los resultados obtenidos mediante qRT-PCR confirman los obtenidos mediante *Northern-blot*, ya que también observamos aumentos significativos para ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO (-/-), al igual que un aumento intermedio para nuestras células heterocigota U2OS FASTKD3 (+/-).

Para obtener valores numéricos a partir de los resultados obtenidos mediante *Northern-blot* de forma que pudieran ser comparados con los obtenidos mediante qRT-

PCR, realizados el estudio de densidades de las bandas obtenidas mediante el programa informático ImageJ, obteniéndose los resultados que se muestran en la **tabla 5**.

		qRT-PCR		<i>Northern-blot</i>	
		Aumento	SD±	Aumento	SD±
ND1	Hetero.	1,2402	0,3919	1,0163	0,1958
	KO	1,1162	0,2029	0,9566	0,0712
ND2	Hetero.	1,5402	0,5307	1,3891	0,2078
	KO	3,1271	0,5291	1,9652	0,1413
ND3	Hetero.	1,4229	0,4046	1,5577	0,1749
	KO	2,1855	0,1745	1,29	0,0289
ND4/4L	Hetero.	1,4193	0,333	1,2067	0,2942
	KO	1,5197	0,1378	1,2198	0,1733
ND5	Hetero.	1,1743	0,2987	0,9139	0,0293
	KO	1,1307	0,1754	0,779	0,0361
ND6	Hetero.	0,9306	0,3272	0,8778	0,0817
	KO	0,8292	0,3145	0,8445	0,1196
COX1	Hetero.	1,2496	0,4203	1,1735	0,1111
	KO	1,0141	0,3427	1,1564	0,1145
COX2	Hetero.	1,204	0,3125	1,4276	0,0922
	KO	1,3591	0,1491	1,8453	0,1867
COX3	Hetero.	1,0447	0,2979	1,2678	0,0828
	KO	0,8444	0,2572	1,0685	0,0285
ATP6/8	Hetero.	1,3622	0,4715	1,4091	0,0251
	KO	1,5892	0,32568	1,6365	0,1065
CytB	Hetero.	1,5148	0,3485	1,3167	0,0981
	KO	1,7131	0,2678	1,5811	0,1633

Tabla 5. Tabla en la que se muestran los valores obtenidos mediante qRT-PCR y mediante el estudio de densidad de las bandas obtenidas mediante *Northern-blot*. El estudio de densidad de las bandas se realizó mediante el programa informático ImageJ.

Como se observa en la **tabla 5**, al comparar los resultados de expresión relativa obtenidos mediante los dos experimentos, los aumento más importantes fueron observados en la línea celular U2OS FASTKD3 KO; para los transcritos ND2 y ND3, donde observamos un incremento de 3 veces superior mediante qRT-PCR y 2 veces superior mediante *Northern-blot* con respecto a la línea celular U2OS wt. Otra de las diferencias que se observaron entre ambos métodos, fue que mediante qRT-PCR obtuvimos un aumento significativo en ND4/4L, mientras que mediante *Northern-blot* esto no fue así. El resto de valores obtenidos para el resto de transcritos mitocondriales mediante ambos métodos fueron muy similares. Por todo ello pudimos

concluir que los transcritos mitocondriales alterados por la ausencia de FASTKD3 son ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB.

2. ENSAYOS DE RESCATE Y DETERMINACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL DOMINIO RAP.

Observadas todas las alteraciones mencionadas anteriormente debidas a la ausencia del gen FASTKD3 en las células U2OS, nos planteamos recuperar de nuevo los niveles basales de los mRNAs alterados en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO.

Además, quisimos ver si era posible la recuperación de dichos niveles con la presencia de mutaciones en el dominio RAP, ya que se sabe que todos los miembros de la familia FAST poseen un dominio de unión al RNA denominado dominio RAP (dominio de unión a RNA abundante en Apicomplexas) de aproximadamente 60 aa.

Para ello, realizamos la transducción en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO con lentivirus, ya que estos poseen ventajas frente a otros métodos: el patrón de integración es menos genotóxico, esqueleto más variable para modulaciones, y más resistentes al silenciamiento, expresión estable, una gran capacidad de transducir todo tipo de células independientemente de si se encuentran en división o no, larga expresión, baja inmunogenicidad, pueden introducirse en ellos grandes regiones codificantes y son altamente eficientes cuando se transducen células como neuronas, células de la retina y hepatocitos (Wanisch et al., 2009).

Por todos estos motivos mencionados anteriormente, generamos tres lentivirus diferentes, el primero, contiene el gen FASTKD3 completo, (a este le llamamos wt). El segundo, sabiendo que el dominio RAP en la proteína FASTKD3 consta de 57 aa, realizamos una delección de los 5 últimos aa del dominio RAP ($\Delta 53-57$). Ésta es una región muy conservada dentro del dominio RAP entre los miembros de la familia FAST. Además, Wolf et al., 2014 realizaron la sustitución por alaninas de 4 de estos últimos 5 aa, y observaron que dichas mutaciones no producían la recuperación de los niveles de mRNA. El último lentivirus poseía una delección completa del dominio RAP de la proteína FASTKD3 (Δ RAP).

El uso de estos tres lentivirus diferentes nos podría dar información de cómo es de importante el dominio RAP en FASTKD3 y a que RNAs está unido. Además, todos los lentivirus generados, presentan unido al extremo carboxilo terminal del gen FASTKD3 un Tag Flag-HA (FHA).

FAST	1	-RWHF---CRDGRVLLGSRALRERHIGLMGYQLLPLPFEELSQ--RGLPQLKSYLRQK
FASTKD1	1	LEFLDSKALCRNIPHMCKKSAMKRRHLEILGYRVIQISQFEWNSMALS TKDARMDYLRE-
FASTKD2	1	VLCVSRSAVCLGSSHPRCFLAMKMRHLNAMGFHVILVNNWEMDKL---EMEDAVTEFLKTK
FASTKD3	1	LCIDGPKRFCSNSKHLLEAKQRHLQLLGYQVVQIPYHEIGML--KSRRELVEYLQRK
FASTKD4	1	--WEFPN-ENSRSKDLLGRFVLARRHIVAAGFLIVDVPFYEWLEL--KSEWQKGAYLKDK
FASTKD5	1	VQFTNRNOVCYGSRDLLGLHNMKRRQLARLGYRVVELSYWEWLP L LKRTRLEKLAFLHEK

Figura 45. Se muestra la secuencia de aa que constituyen el dominio RAP de cada miembro de la familia FAST, señalando con gris y negro las regiones de mayor homología entre dichos miembros. Encuadrado en rojo se encuentran los 5 aa del dominio RAP que han sido eliminados.

2.1. Construcción de los plásmidos pFASTKD3-FHA wt, pFASTKD3-FHA-Δ53-57 y pFASTKD3-FHA-ΔRAP.

Para la construcción de estos plásmidos, el Tag Flag-HA fue obtenido mediante amplificación por PCR del plásmido pOZ-FH-C, utilizando los *primers* P16 y P17 (secuencia indicada en el anexo 1), el tamaño obtenido del amplificado fue de 123 pb. Al mismo tiempo el plásmido pEYFP-N-FASTKD3 fue digerido con *SacII/NotI*, y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 5.956 pb y otro de 749, este último correspondió al gen de YFP que fue eliminado. El fragmento de 5.956 pb se ligó con el Tag-Flag-HA, generando así el plásmido que llamamos pFASTKD3-FHA.

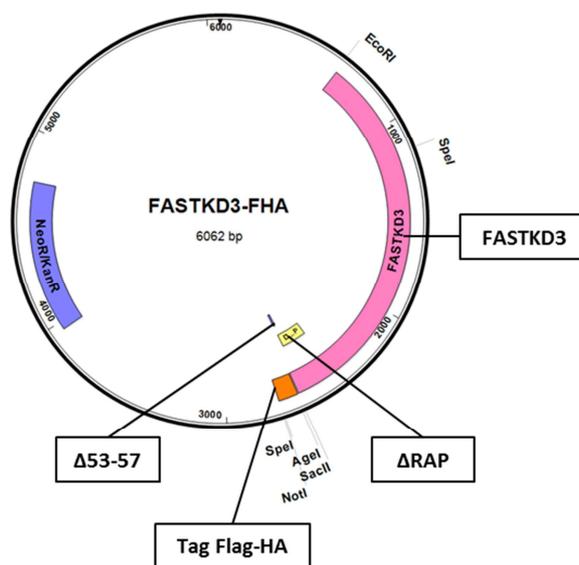


Figura 46. Imagen correspondiente al plásmido pFASTKD3-FHA, en el que se indica el gen FASTKD3, el Tag Flag-HA y el lugar donde se han realizado las deleciones (deleción de los últimos 5 aa del dominio RAP (Δ53-57) y deleción del dominio RAP (ΔRAP)).

Para comprobar que la ligación se produjo correctamente, se realizó corte con las enzimas de restricción *NotI/SacII*, obteniendo dos fragmentos de DNA, uno de 5.939

pb y otro de 123 pb, que nos indican que la clonación ocurrió correctamente. A este plásmido le llamamos pFASTKD3-FHA wt.

Una vez obtenido este vector, sobre él se realizaron dos reacciones diferentes de mutagénesis dirigida mediante las cuales obtuvimos los vectores lentivirales con las mutaciones descritas anteriormente.

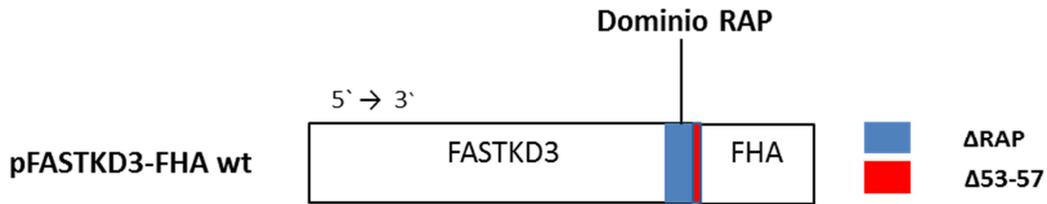


Figura 47. Imagen en la que se señala el lugar donde se han producido las dos reacciones de mutagénesis dirigida.

El producto de la reacción de mutagénesis fue comprobado mediante digestión con las enzimas de restricción EcoRI/AgeI y mediante reacción de secuenciación, para la que se utilizó el *primer* llamado SEQ MUTAGÉNESIS, cuya secuencia aparece en el anexo 1.

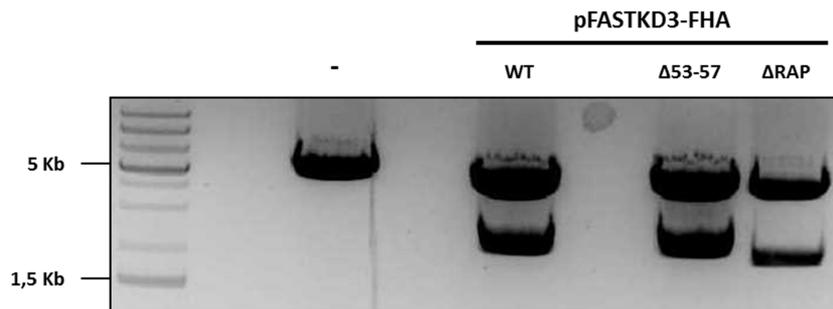


Figura 48. Imagen en la que se muestra el resultado obtenido mediante digestión con las enzimas de restricción EcoRI/AgeI de los plásmidos pFASTKD3-FHA-wt (4.053 pb y 2.009 pb), pFASTKD3-FHA-Δ53-57 (4.053 y 1.994 pb) y pFASTKD3-FHA-ΔRAP (4.053 y 1.838 pb).

2.2. Construcción de los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA.

Con el objetivo de producir lentivirus, mediante los cuales podamos obtener una línea celular estable que exprese FASTKD3, generamos tres plásmidos: pSin-Sox2-FASTKD3-FHA (pSin-Sox2-FASTKD3-FHA wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-Δ53-57 y pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-ΔRAP).

Para la producción de los tres plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA, utilizamos el plásmido comercial pSin-EF2-Sox2-pur que fue digerido con EcoRI/SpeI. Al mismo tiempo los plásmidos FASTKD3-FHA-wt, FASTKD3-FHA-Δ53-57 y FASTKD3-FHA-

Δ RAP, fueron digeridos con EcoRI/Spel obteniendo para cada uno de ellos tres fragmentos de DNA, siendo los 2 fragmentos de menor tamaño los de nuestro interés (marcados en azul).

FASTKD3-FHA-wt, EcoRI/Spel: 7.523 pb, 1.563 pb y 531 pb.

FASTKD3-FHA- Δ 46-50, EcoRI/Spel: 7.523 pb, 1.548 y 531 pb.

FASTKD3-FHA- Δ RAP, EcoRI/Spel: 7.523 pb, 1.392 pb y 531 pb.

Posteriormente, se procedió a la ligación de los dos fragmentos de menor tamaño con el fragmento de 7.523 pb obtenido de la digestión del plásmido pSin-EF2-Sox2-pur con EcoRI/Spel. Las colonias obtenidas como resultado de las diferentes ligaciones, se comprobaron mediante digestión con la enzima de restricción Agel. A estos plásmidos les llamamos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57 y pSin-Sox2-FASTKD3- Δ RAP.

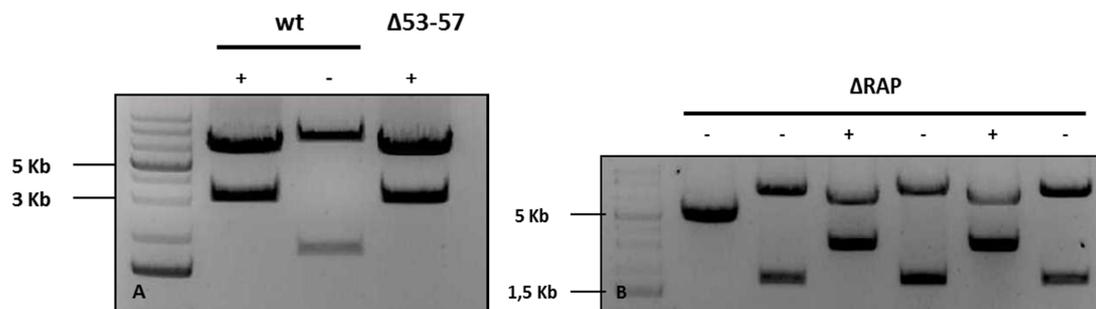


Figura 49. A. Imagen en la que se muestran los resultados de la digestión con la enzima de restricción Agel de los plásmidos pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57, en la que podemos ver diferentes tamaños en los productos de dicha digestión. Para pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-wt en las colonias positivas (+) observamos dos bandas de 6.506 pb y 3.111 pb y para pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57 6.506 pb y 3.096 pb. **B.** Imagen en la que se muestra el resultado obtenido por corte con la enzima de restricción Agel del pSin-Sox2-FASTKD3- Δ RAP, en esta imagen observamos que las colonias positivas (+) tienen unos fragmentos de DNA de 6.506 pb y 2.940 pb.

En ambas imágenes, cualquier otro patrón de bandas se considera una colonia negativa (-).

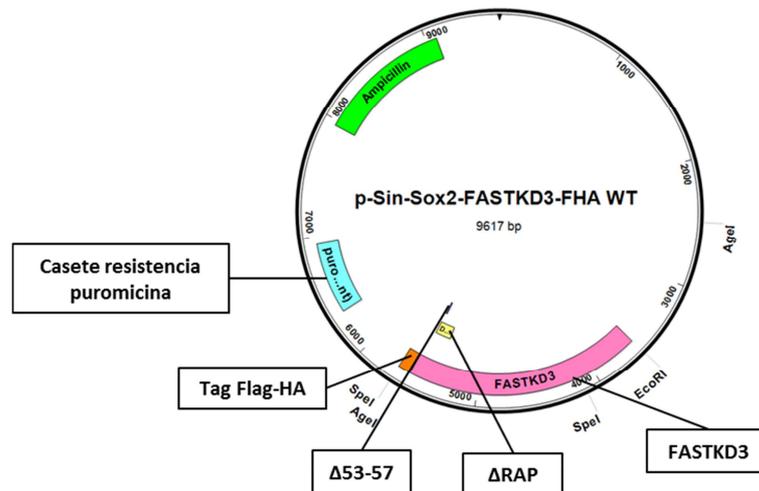


Figura 50. Esquema del plásmido final pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-wt. En él se indican los lugares en los que se realizaron las reacciones de mutagénesis dirigida ($\Delta 53-57$ y ΔRAP).

Una vez obtenidos estos plásmidos fueron utilizados para la obtención de lentivirus que fueron empleados para producir la recuperación de los niveles de mRNA mitocondrial en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO.

2.3. Obtención de líneas celulares que expresen FASTKD3 mediante el uso de lentivirus.

Para la obtención de los tres lentivirus diferentes, se utilizaron las células empaquetadoras 293FT, que se co-transfectaron con 3 plásmidos, dos de ellos comerciales. El plásmido pPAX2 que posee los genes que codifican para las proteínas Gag, Pol, que forman las proteínas de la envuelta, Tat es una proteína que regula el aumento de la eficiencia de la transcripción viral y Rev es una proteína que permite la exportación desde el núcleo al citoplasma de fragmentos de mRNA que contienen el elemento RRE para producir el genoma viral y el plásmido pMD2.G que posee el gen que codifica para la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular, que es una proteína involucrada en la formación de la envoltura viral, y el plásmido pSin-Sox2-FASTKD3-FHA-wt, pSin-Sox2-FASTKD3-FHA- $\Delta 53-57$ y pSin-Sox2-FASTKD3- ΔRAP respectivamente para así obtener nuestros tres vectores lentivirales. Los lentivirus fueron, finalmente, obtenidos por ultracentrifugación del sobrenadante del cultivo, según se explica en el apartado 8.1 de la sección de materiales y métodos.

El cálculo del título viral obtenido se realizó mediante qRT-PCR del cDNA obtenido a partir del vector lentiviral. Se realizó el análisis por triplicado, utilizando una curva patrón a partir de cantidades conocidas del plásmido pSin-EF2-Sox2-pur. El resultado

es de un título viral de 10^7 copias/ml, el cual se ajusta a los títulos obtenidos por otros autores (10^6 - 10^8 partículas virales/ml. Tang et al., 2015).

Con el objetivo de obtener una recuperación del fenotipo en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO, se realizaron transducciones con los 3 lentivirus diferentes a una MOI de 10^4 en presencia de polibreno. A las 48 h, se añadió puromicina a una concentración final de 2 μ g/ml lo que condujo a la obtención de poblaciones resistentes a este antibiótico de selección. A las líneas celulares obtenidas las llamamos Rescate FASTKD3 wt, Rescate FASTKD3 Δ 53-57 y Rescate FASTKD3 Δ RAP.

Para verificar si la expresión de FASTKD3 fue recuperada, realizamos una qRT-PCR utilizando los *primers* P12/P13, mediante la cual observamos alrededor de 100 veces más expresión de FASTKD3 en nuestras tres líneas celulares rescatadas, que en las células U2OS wt. Esta sobreexpresión pudo deberse a que varias partículas lentivirales se integraron en el genoma de la célula.

2.4. Expresión génica de los transcritos mitocondriales en las líneas celulares estables.

Una vez que obtuvimos dichas líneas celulares, nos propusimos estudiar los niveles de expresión de los transcritos mitocondriales en los cuales habíamos observado aumentos significativos en su expresión relativa (ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB). Para ello, realizamos otra qRT-PCR, utilizando los *primers* publicados en Nagao et al., 2008, su secuencia se indica en el anexo 1.

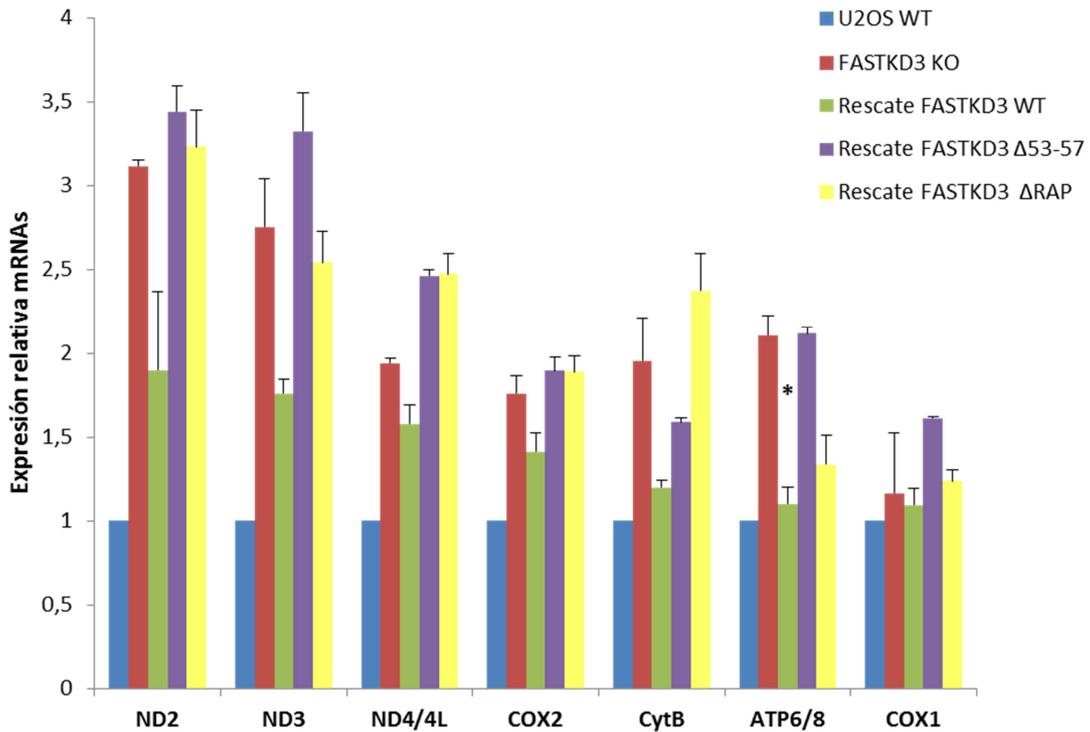


Figura 51. Gráfico en el que se muestra la expresión relativa de los diferentes transcritos mitocondriales obtenidas en las diferentes líneas celulares mediante qRT-PCR, aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. COX1 ha sido utilizado como transcrito control, ya que previamente no hemos visto alteraciones en él. ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** y $p < 0,001$ ***).

Los resultados que se observan en la **figura 51**, muestran como en la línea celular llamada Rescate FASTKD3 wt se produjo una recuperación parcial de la expresión de los transcritos mitocondriales que previamente habíamos visto alterados. Es destacable que para ATP6/8 se produjo una recuperación significativa de su expresión. Por otro lado, observamos que la expresión relativa de las líneas celulares llamadas Rescate FASTKD3 Δ53-57 y Rescate FASTKD3 ΔRAP, mantuvieron la sobreexpresión o incluso fue superior que en la línea celular U2OS FASTKD3 KO.

		EXPRESIÓN	SD±
ND2	FASTKD3 KO	3,1139	0,0351
	Rescate FASTKD3 WT	1,8993	0,4648
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	3,4416	0,1495
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	3,2319	0,2166
ND3	FASTKD3 KO	2,7558	0,2859
	Rescate FASTKD3 WT	1,7628	0,087
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	3,3239	0,2369
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	2,5388	0,1909
ND4/4L	FASTKD3 KO	1,9428	0,0303
	Rescate FASTKD3 WT	1,5784	0,1158
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	2,4631	0,0324
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	2,4717	0,1232
COX2	FASTKD3 KO	1,7642	0,1037
	Rescate FASTKD3 WT	1,4124	0,1134
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	1,8957	0,0892
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	1,8905	0,0959
CytB	FASTKD3 KO	1,9558	0,2507
	Rescate FASTKD3 WT	1,2003	0,0405
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	1,5882	0,0282
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	2,3725	0,2234
ATP6/8	FASTKD3 KO	2,1038	0,121
	Rescate FASTKD3 WT	1,0996	0,1048
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	2,1149	0,0396
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	1,3393	0,1717
COX1	FASTKD3 KO	1,168	0,3551
	Rescate FASTKD3 WT	1,0911	0,10522
	Rescate FASTKD3 Δ53-57	1,6108	0,0111
	Rescate FASTKD3 ΔRAP	1,2381	0,066

Tabla 6. Tabla en la que se indica el incremento de la expresión relativa y la desviación estándar de los mRNAs obtenida mediante el análisis de los datos obtenidos por qRT-PCR en las diferentes líneas celulares.

Con todos estos datos, pudimos concluir que una sobreexpresión de FASTKD3 nos asegura una recuperación total de la expresión relativa de los transcritos mitocondriales, al mismo tiempo que observamos que la ausencia total del dominio RAP o la eliminación de los 5 últimos aa del dominio RAP pueden estar asociadas a alteraciones en la expresión relativa de los transcritos mitocondriales.

Al igual que Wolf et al., 2014, las mutaciones producidas en el dominio RAP no produjeron una recuperación de los niveles de los transcritos mitocondriales.

3. COLOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL.

Otro de nuestros objetivos fue comprobar si la delección de los 5 últimos aa del dominio RAP ($\Delta 53-57$), así como la delección completa del dominio RAP (Δ RAP) alteraban la estabilidad o localización de FASTKD3 en la célula.

Para realizar el estudio de colocalización mitocondria, construimos tres plásmidos, los cuales tienen unido el gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) en el extremo carboxilo terminal de FASTKD3. De este modo y mediante la utilización de un microscopio confocal pudimos observar de color verde aquellas células que se transfecaron con estos plásmidos y que expresaban FASTKD3.

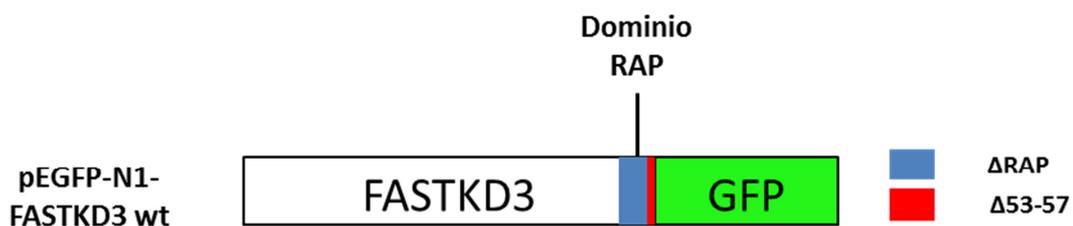


Figura 52. Representación esquemática de los plásmidos que han sido contruidos.

Para construir estos plásmidos, previamente obtuvimos el gen FASTKD3 wt y los dos mutantes descritos anteriormente mediante digestión doble con las enzimas de restricción EcoRI y Agel de los plásmidos llamados pFASTKD3-FHA-wt, pFASTKD3-FHA- $\Delta 53-57$ y pFASTKD3-FHA- Δ RAP. Al mismo tiempo digerimos el plásmido pEGFP-N1 con estas mismas enzimas, obteniendo dos fragmentos de DNA, siendo el de 4.696 pb el de nuestro interés. Una vez obtenidos todos los fragmentos, procedimos a la ligación del gen FASTKD3 wt en el fragmento de 4.696 pb obtenido del plásmido pEGFP-N1. Realizamos el mismo procedimiento para construir nuestros plásmidos con las mutaciones anteriormente descritas. Las colonias obtenidas de estas ligaciones, fueron comprobadas mediante corte con las enzimas de restricción EcoRI/Agel.

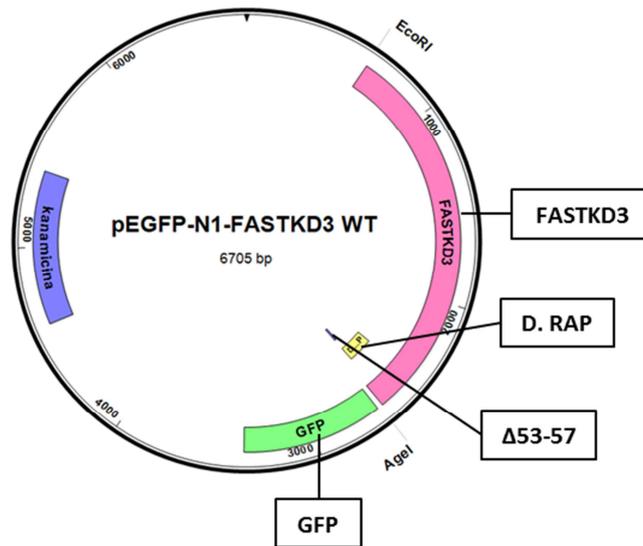


Figura 53. Imagen final del plásmido pEGFP-N1-FASTKD3 WT. Se indica la posición del gen GFP y los lugares donde se encuentran las deleciones de los dos plásmidos mutantes.

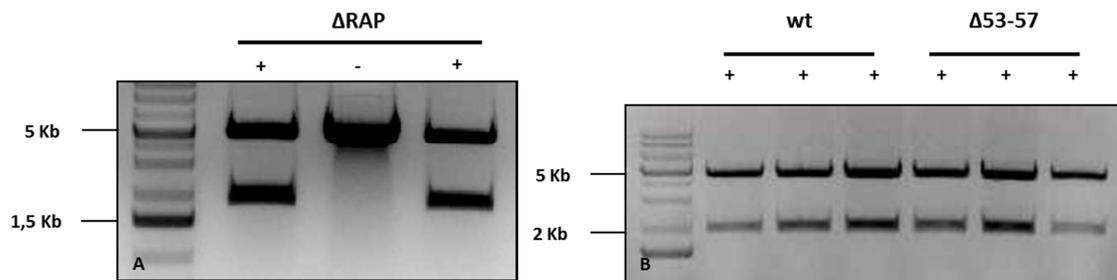


Figura 54. En ambas imágenes se muestra la comprobación de la ligación mediante digestión con las enzimas de restricción EcoRI/AgeI. **A.** Observamos como las muestras positivas (+) presentan el patrón de bandas esperado que es de 1.838 pb y 4.696 pb. Las muestras positivas representan el plásmido final llamado pEGFP-N1-FASTKD3-ΔRAP. **B.** En esta imagen observamos que todas las muestras son positivas, ya que presentan el patrón esperado, obteniendo para el plásmido llamado pEGFP-N1-FASTKD3-wt una banda de 2.009 pb y 4.696 pb, mientras que para el plásmido llamado pEGFP-N1-FASTKD3-Δ53-57 obtuvimos una banda de 1.994 pb y otra de 4.696 pb.

Células U2OS wt fueron transfectadas utilizando los plásmidos pEGFP-N1-FASTKD3-wt, pEGFP-N1-FASTKD3-Δ53-57, y pEGFP-N1-FASTKD3-ΔRAP y Lipofectamina 2000. Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células fueron tripsinizadas y fijadas sobre cristales de 12 mm de diámetro, 24 horas después, las mitocondrias fueron teñidas de rojo con MitoTracker (CMX-ROS) y los núcleos de azul con Hoechst 33258. Finalmente los cristales con las células se montaron sobre portaobjetos para que las células pudiesen ser observadas mediante el microscopio confocal utilizando los filtros adecuados.

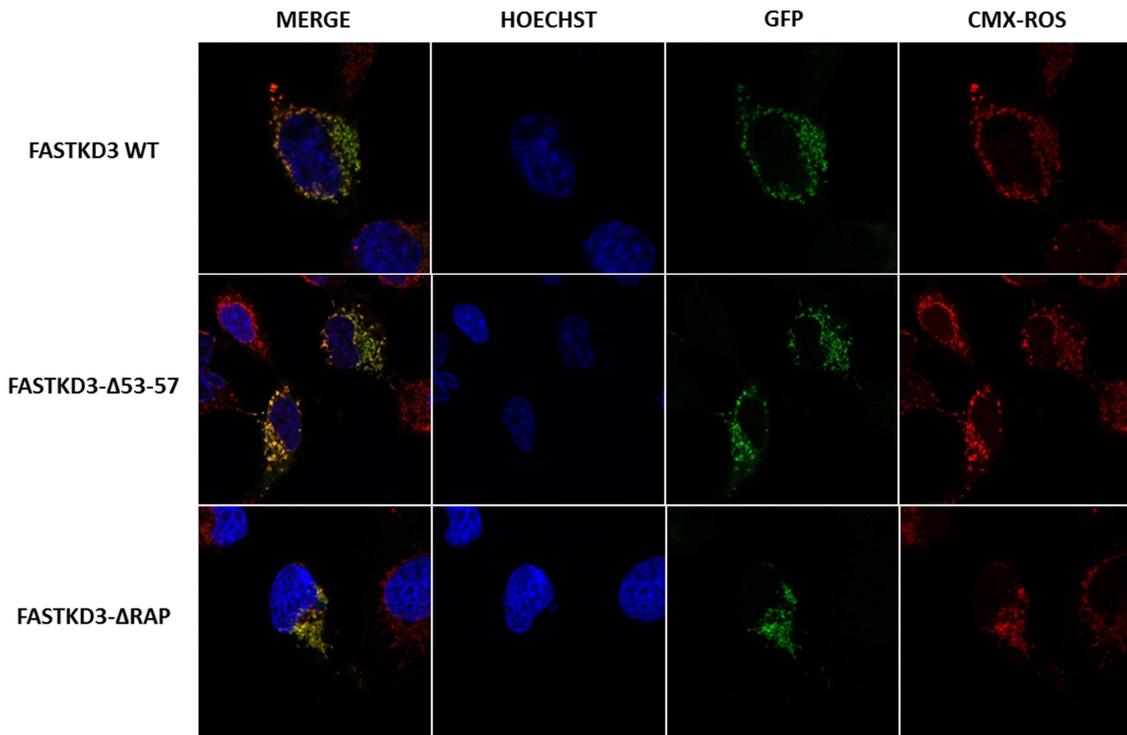


Figura 55. Imagen en la que observamos la localización mitocondrial de la proteína FASTKD3. Esta imagen se realizó a 63X.

Como podemos observar en la **figura 55**, la proteína FASTKD3 se encontraba estable dentro de la mitocondria. Además, estos resultados nos indican que la eliminación de una región muy conservada entre los miembros de la familia FAST del dominio RAP (5 últimos aa del dominio RAP ($\Delta 53-57$)) o eliminación total del dominio RAP no produce alteraciones en la localización intracelular de FASTKD3.

4. ESTUDIO DE LAS POSIBLES CAUSAS DEL AUMENTO EN LOS NIVELES DE LOS TRANSCRITOS MITOCONDRIALES.

4.1. Estudio de la vida media de los transcritos mitocondriales.

Algunos autores, como por ejemplo Nagao et al., 2008, sugieren que la medición de la vida media de los mRNAs mitocondriales es esencial para investigar los mecanismos moleculares de regulación de la estabilidad del mRNA en la mitocondria humana. Nagao et al., 2008 observaron que alteraciones en la expresión relativa de los transcritos mitocondriales estaban asociados a alteraciones en la vida media de dichos transcritos, por ello, nos planteamos realizar este estudio. Es importante destacar que la vida media de los transcritos mitocondriales es diferente dependiendo de la línea celular con la que se trabaje, además de que cada transcrito posee una

vida media diferente, lo que sugiere que hay otros factores proteicos involucrados en la regulación de la estabilidad post-transcripcional de cada transcrito mitocondrial.

Para el estudio de la vida media de los transcritos mitocondriales, recolectamos las líneas celulares U2OS FASTKD3 KO y wt a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 min). Ambas líneas fueron tratadas simultáneamente con 0,5 µg/ml de BrEt que inhibe selectivamente la transcripción de los DNAs circulares, como por ejemplo DNA mitocondrial produciendo alteraciones en la estructura terciaria de la molécula. Posteriormente se extrajo el RNA de dichas células y se realizó qRT-PCR, de los transcritos que previamente habíamos observado que se encontraban alterados y utilizamos como genes normalizadores el 18S y β-actina. La estimación de la vida media ($t_{1/2}$) fue obtenida mediante la fórmula $t_{1/2} = \ln 2/\lambda$, donde λ es el valor del exponente de e en la ecuación de la recta, obtenida a partir de la línea de tendencia exponencial. La obtención de la ecuación de la recta y análisis estadístico se realizaron con el programa informático Excel. Los resultados obtenidos se encuentran en la **tabla 7**.

mRNA	VIDA MEDIA (min)			
	U2OS WT	SD	FASTKD3 KO	SD
ND2	94,9	±6,41	308,1	±66,72
ND3	150,2	±17,89	269,5	±66,71
ND4	142,47	±29,07	211,79	±33,35
CytB	115,5	±0,29	250,3	±87,91
ATP	123,2	±13,34	231,04	±0,02
COX2	80,2	±20,02	123,1	±33,35
COX1	150,2	±5,56	159,4	±5,33

Tabla 7. Tabla en la que se presentan los resultados obtenidos del análisis de la vida media de los transcritos mitocondriales que encontraron alterados previamente de la línea celular U2OS FASTKD3 KO. En dicho estudio se utiliza COX1 como control.

El resultado de este análisis evidenció alteraciones en la vida media de los transcritos mitocondriales que tenían su expresión relativa aumentada, lo cual concuerda con los resultados obtenidos previamente mediante qRT-PCR.

4.2. Cuantificación del número de copias de mtDNA.

Después de observar todas las alteraciones en los experimentos descritos anteriormente, nos planteamos comprobar si el número de copias del mtDNA también estaba alterado en nuestras células U2OS FASTKD3 KO.

Para ello, realizamos la cuantificación relativa del número de copias de mtDNA frente al nDNA mediante qRT-PCR en las líneas celulares U2OS wt, U2OS FASTKD3 HT (heterocigota) y U2OS FASTKD3 KO.

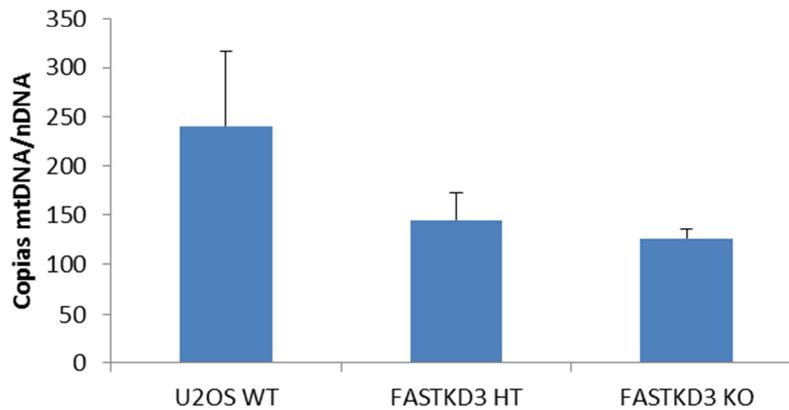


Figura 56. Gráfico en el que se muestran la cuantificación relativa de mtDNA frente a nDNA mediante qRT-PCR en nuestras tres líneas celulares.

Los resultados obtenidos en este experimento nos mostraron una depleción en el contenido relativo en el mtDNA de las células U2OS FASTKD3 HT y U2OS FASTKD3 KO, 146 y 126 copias respectivamente frente a 241 copias en las células U2OS wt. Aunque dicha depleción no es significativa, es una disminución importante.

4.3. Estudio mediante marcaje metabólico de proteínas de traducción mitocondrial.

Tras observar todas estas alteraciones en los transcritos mitocondriales en la línea celular U2OS FASTKD3 KO, nos planteamos realizar el estudio en la traducción mitocondrial para comprobar si podíamos encontrar alguna relación entre: los aumentos observados en la expresión relativa, la vida media de dichos transcritos mitocondriales y la traducción mitocondrial. Además este experimento nos podía aportar información sobre posibles defectos en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial debidos a alteraciones en la síntesis de proteínas mitocondriales.

Para ello, utilizamos DMEM sin metionina ni cisteína, con suero bovino fetal dializado. La traducción citoplasmática fue bloqueada con emetina a una concentración final de 100 µg/ml, dejando activa únicamente la traducción mitocondrial, la cual produjo las proteínas mitocondriales que fueron detectadas gracias a su marcaje con S³⁵.

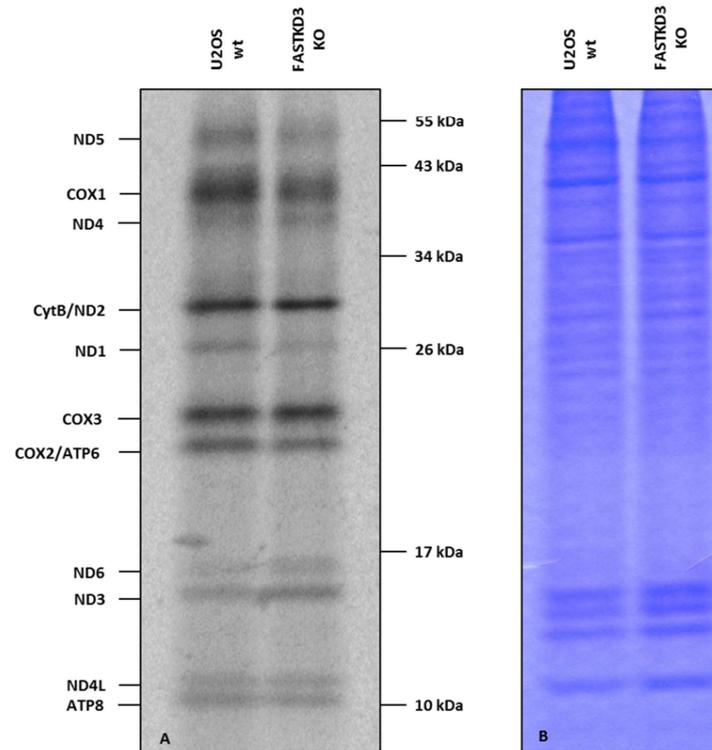


Figura 57. A. Imagen obtenida mediante auto radiografía. En el primer carril observamos la línea celular U2OS FASTKD3 KO (KO), mientras que en el segundo carril encontramos la línea celular U2OS wt (WT). **B.** Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

Los resultados de la **figura 57**, nos presentan una disminución en la traducción del transcrito COX1, siendo la más destacada y reproducible. De forma complementaria realizamos el estudio de densidad de la banda correspondiente a COX1 mediante el uso del programa informático ImageJ. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa informático Excel, obteniendo una disminución en la traducción del 15% y una desviación estándar (SD) de $\pm 0,024$. Debido al defecto en la traducción de COX1, pensamos que nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO podría tener alterada la actividad del complejo IV mitocondrial. Por el contrario la traducción en el resto de transcritos mitocondriales no se ve alterada.

Durante el desarrollo de todos los experimentos nos llamó la atención la diferencia morfológica y el lento crecimiento que observábamos en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO con respecto a la línea U2OS wt. Por ello nos planteamos realizar el estudio de proliferación celular. Para ello, las células se dejaron en cultivo y se contaron a los 3 y 6 días después de haber sido plaqueadas, de este modo pudimos observar una diferencia significativa en la proliferación celular entre las dos líneas celulares.

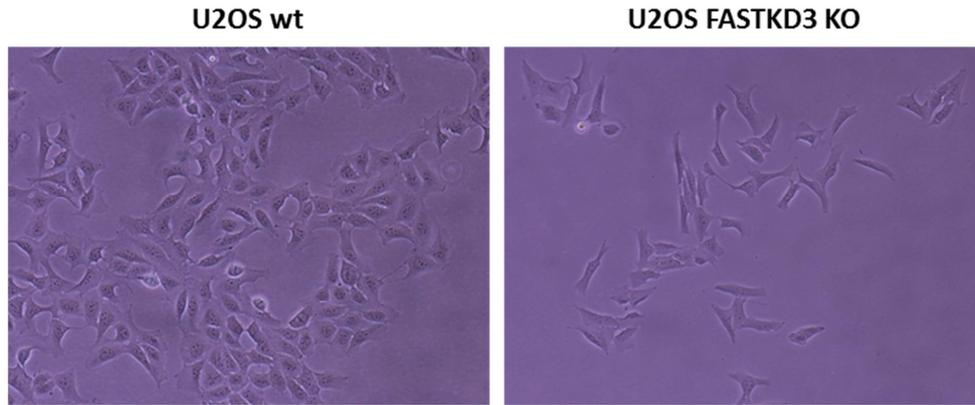


Figura 58. Ambas imágenes muestran la diferencia en el número de células a los tres días de estar en cultivo, tras haber sembrado 150.000 células de cada una de ellas al mismo tiempo.

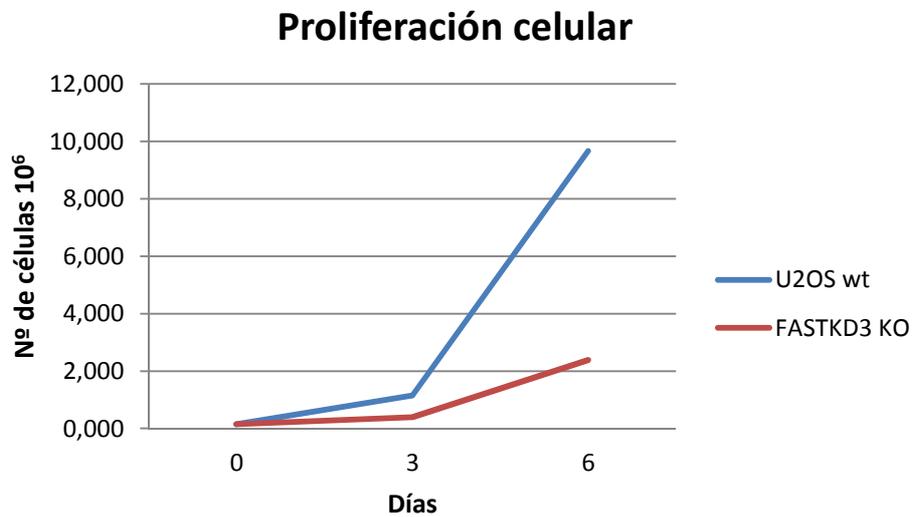


Figura 59. Gráfico en el que se muestran las diferencias en la proliferación celular, habiéndose realizado el recuento a los tres y seis días tras haber sido sembradas.

Estos datos obtenidos nos mostraron que la ausencia de FASTKD3 genera alteraciones en el crecimiento celular, ya que en la línea celular U2OS wt observamos un crecimiento 4 veces superior que en la línea celular U2OS FASTKD3 KO. Además la línea U2OS FASTKD3 KO presenta una morfología diferente, presentando una morfología más espiculada que las células U2OS wt.

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL.

Li et al., 2004, habían descrito que los miembros de la familia FAST poseen un dominio de localización mitocondrial rico en argininas y lisinas. Simarro et al., en 2010 demostraron la localización de todos los miembros de FAST en la mitocondria mediante inmunofluorescencia usando sobreexpresión de las correspondientes proteínas recombinantes que llevan en su extremo carboxilo terminal un tag fluorescente (GFP o YFP). Nosotros en este trabajo, con objeto de profundizar en la localización precisa de FASTKD3 dentro de la mitocondria hicimos experimentos para comprobar si esta proteína localizaba en los gránulos mitocondriales de RNA. Estos gránulos son lugares de procesamiento postranscripcional del mRNA, donde se inicia el ensamblado de los ribosomas mitocondriales, proceso regulado en parte por GRSF1 (G-Rich RNA Sequence Binding Factor 1). Antonicka et al., 2015 han demostrado mediante inmunofluorescencia que FASTKD2 y FASTKD5 colocalizan con GRSF1. También se ha descrito que FASTK localiza en dichos gránulos (Jourdain et al., 2015). Dado nuestro interés en el estudio de FASTKD3, nosotros examinamos si también esta molécula se encuentra en los gránulos, lo que estudiamos de forma indirecta mediante expresión simultánea de ambas, FASTKD2-HA y GFP-FASTKD3. Nuestros resultados demostraron claramente que estas proteínas no colocalizan por lo que concluimos que FASTKD3 no se encuentra en los gránulos mitocondriales de RNA. Se ha descrito que otro miembro de la familia, FASTKD4, tampoco se asocia a los gránulos y reside en la matriz mitocondrial (Wolf et al., 2014). Se están realizando experimentos actualmente para determinar la posible localización de FASTKD3, mediante el análisis de fracciones enriquecidas en mitocondrias mediante solución alcalina de carbonato sódico y tratamiento con proteinasa K de mitoplastos; mediante estos ensayos se podrá concluir si FASTKD3 se asocia a membranas o si se encuentra de forma soluble en el espacio intermembranal o en la matriz (este último es el caso de FASTKD4).

Otro aspecto que suscitó nuestro interés, fue estudiar si el dominio RAP de FASTKD3 es importante en la estabilidad y en la localización mitocondrial de la molécula. Para ello construimos 2 moléculas mutantes: en una de ellas se ha deletado el dominio RAP completo, mientras que la otra presenta una pequeña delección de 15 nucleótidos que da lugar a la ausencia de los cinco últimos aminoácidos del dominio RAP ($\Delta 53-57$). Ambos mutantes poseen además un tag GFP en el extremo carboxilo terminal, y se usa como control la molécula completa wt a la que también se ha añadido un tag GFP. Mediante microscopía confocal se comprueba

que los mutantes no pierden la característica localización mitocondrial normal y no se observan diferencias con la molécula completa control. Además no se observa variación significativa en la cantidad de señal que se acumula en la mitocondria en células transfectadas con ambos mutantes respecto del control, lo que indica que ninguna de las mutaciones induce cambios aparentes en la estabilidad de la proteína, y que no se ve afectada la translocación a la mitocondria como consecuencia de las deleciones.

2. LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 *KNOCKOUT*.

El interés por la familia de proteínas FAST es relativamente reciente, aunque se han hecho importantes progresos en el estudio de su función desde el 2007. Por ejemplo, en 2010, Simarro et al., exploraron el papel de FASTKD3 en la función mitocondrial y describieron una disminución muy significativa del consumo de oxígeno mitocondrial en la línea celular U2OS, mediante el uso de varios siRNA específicos que disminuyen la expresión de la proteína (*knockdown*). Una desventaja de este método es que el silenciamiento es transitorio y generalmente no es del 100%, y también y más importante, que siempre existe la posibilidad de inducir silenciamientos inespecíficos, es decir que disminuya la expresión de otros genes no deseados y desconocidos, lo que podría producir efectos fenotípicos que no fueran debidos solo a la proteína en estudio. Por ello decidimos emplear un método más fiable, que consiste en la edición génica de FASTKD3, o sea, la anulación de este gen mediante recombinación homóloga en presencia de un vector donante que incluye la mutación deletérea deseada, lo cual se ve enormemente facilitado por el uso simultáneo de una nucleasa específica para el gen diana. En nuestro caso elegimos las nucleasas TALEN, y generamos una línea celular U2OS FASTKD3 KO, que carece de la proteína FASTKD3 como se comprobó mediante qRT-PCR y *Western-blot*. Se dispone así de un reactivo celular muy valioso donde estudiar distintos aspectos de la función mitocondrial que pudieran estar afectados por la ausencia de la proteína.

Para obtener nuestra línea celular deficiente en FASTKD3 se indujo *gene targeting* mediante el uso de nucleasas TALEN en presencia de un vector donante (pAAV-MCS-FASTKD3); este vector consta de dos regiones de homología y un casete de selección positiva que confiere resistencia al antibiótico blasticidina. De modo que, como resultado de la edición génica, el exón 2 del gen (donde se encuentra el inicio de la traducción) queda sustituido por el casete de blasticidina lo que resulta en la anulación de dicho gen. Es muy destacable la introducción reciente de diversos métodos que logran crear roturas de la cadena del DNA, lo cual activa las vías de reparación génica

y resulta en la posibilidad de introducción de la mutación deseada dentro de la diana de DNA seleccionada. Nosotros hemos elegido el sistema TALEN (Humbert et al., 2012), debido a su versatilidad, y relativa facilidad de construcción, aunque ciertamente este campo tecnológico está evolucionando a gran velocidad y actualmente un nuevo sistema llamado CRISPR/Cas9 está demostrando mayor eficiencia de gene targeting y más facilidad de construcción, en un tiempo más reducido. El sistema TALEN ha funcionado de forma óptima en nuestro proyecto a pesar de que hay varias publicaciones recientes describiendo la relativamente alta frecuencia de eventos anómalos de corrección génica con este método que consisten en inserciones del DNA donante, en vez de recombinaciones. Sin embargo, nosotros hemos diseñado un sistema de *screening* mediante PCR que permite la selección de los mutantes deseados y diferencia adecuadamente la recombinación homóloga de la inserción.

La decisión de elegir la línea celular derivada de un osteosarcoma, U2OS como modelo de estudio se debe a la facilidad de su mantenimiento en cultivo además de haber sido ampliamente utilizada en estudios de la función mitocondrial. Esta línea celular fue derivada en 1964 de un sarcoma medianamente diferenciado de la tibia de una niña de 15 años de edad. Es una de las primeras líneas celulares generadas y se usa con frecuencia. Mediante análisis citogenético se ha observado inestabilidad cromosómica y alta incidencia de aneuploidias. Sin embargo se ha demostrado que ciertos genes supresores de tumores como p53 y pRb son funcionales en estas células (Niforou et al., 2008), mientras que en otras líneas de osteosarcoma más agresivas (como Saos2) estos dos genes están mutados. Comparadas con otras líneas de osteosarcoma, U2OS son las que tienen el menor número de variaciones cromosómicas numéricas probablemente debido a la posesión de p53 y pRb funcionales

Esta misma línea celular fue empleada por Simarro et al., en su trabajo sobre FASTKD3 y función mitocondrial publicado en 2010. Otros muchos laboratorios han utilizado esta línea celular en estudios mitocondriales (Doege et al., 2005, Ichim et al., 2015, entre otros). Estudios realizados en miembros de la familia FAST por Jourdain et al., 2013 (estudio de FASTK), y Antonicka et al., 2015, (estudio de FASTKD2 y FASTKD5), han utilizado una línea diferente llamada 143B, también derivada de un osteosarcoma, pero de características más agresivas. También han sido utilizadas otras líneas celulares para el estudio de miembros de la familia FAST; como por ejemplo la línea celular HEK293T, que procede de riñón humano, fue utilizada para el

estudio de FASTKD4 (Wolf et al., 2014) y la línea celular HeLa, que es una línea procedente de un adenocarcinoma, fue utilizada para el estudio de FASTKD2 por Ghezzi et al., 2008.

3. ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL RNA MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 KO.

En este trabajo demostramos mediante *Northern-blot* que en la línea celular U2OS FASTKD3 KO se produce un aumento en la expresión relativa del mtRNA de ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB; siendo los aumentos más destacados los de ND2 y ND3, que presentaban niveles casi 3 veces superiores a los obtenidos en nuestras células control. Los tamaños de los transcritos observados en el *Northern-blot* sugiere que ocurren aumentos en los mRNA maduros y no se deben al acúmulo de precursores. Estos resultados también fueron corroborados mediante qRT-PCR. Antonicka et al., en 2015 han publicado un estudio de silenciamiento mediante siRNAs de varios miembros de la familia FASTK en células 143B. En dicho estudio se mide la abundancia relativa de los mtRNAs en células tratadas con siRNA específico de FASTKD2, y se ha observado una acumulación de los transcritos ND1, ND2 y ND3, además de una leve disminución de los correspondientes a la subunidad 16S y COX1, mientras que para el resto de mRNAs no hay cambios significativos. También se estudiaron los niveles de mtRNA en el *knockdown* de FASTKD5, y dio como resultado un aumento de 3 a 7 veces de los niveles normales para ND1, ND2, COX2, ND3, ND4/4L, ND5, ND6 y CytB. Como podemos observar, hay ciertas similitudes entre sus datos y los nuestros, ya que tanto el *knockdown* de FASTKD2 y FASTKD5 como la ausencia de FASTKD3 (nuestros resultados) dan lugar a un aumento sobre todo de los niveles de ND2 y ND3.

Los estudios previos describían que FASTKD3 interacciona con moléculas relacionadas con el procesamiento del mtRNA, como son: LRPPRC, DHX30, PNPasa. Además también se ha descrito una posible asociación con varias proteínas involucradas en el proceso de traducción mitocondrial: MRPS2, MRPS22, MRPS31, TUFM, GFM1, PTCD1, TARS2, MTO1 y IARS2. De estas posibles proteínas asociadas una de las más estudiadas hasta la fecha ha sido LRPPRC (*leucina-rich PPR cassette*); recordemos que esta proteína pertenece a la familia de las PPR (*pentatricopeptide repeat*), y que se une a RNA (Xu et al., 2008). Se ha descrito también que LRPPRC promueve la poliadenilación de los mRNAs mediada por la MTPAP in vitro y es necesaria para regular la traducción mitocondrial en mamíferos.

Se ha demostrado que LRPPRC forma un complejo con SLIRP (*SRA stem-loop interacting RNA-binding protein*), lo cual sirve para estabilizar los mtRNAs de vida media larga, uniéndose el complejo a la región codificante de dichos mtRNAs; además LRPPRC/SLIRP suprime la degradación de los extremos 3' de los mtRNA que ocurre en el degradosoma, mediada por PNPasa y Suv3 (Chujo et al., 2012).

Mutaciones en el gen LRPPRC, son la causa de un subtipo de la enfermedad neurológica llamada síndrome de Leigh (en concreto de la variedad canadiense, más prevalente en la región francófona de Quebec, producida por una transición C>T en la posición 1.119 de LRPPRC). El síndrome de Leigh es un desorden neurológico severo que se manifiesta típicamente en el primer año de vida. Se caracteriza por una pérdida progresiva de las capacidades mentales y de movimiento y lleva generalmente a la muerte en dos años, usualmente de fallo respiratorio. Un pequeño número de afectados desarrollan los síntomas en la edad adulta o tienen síntomas que se van agravando lentamente. El síndrome de Leigh está causado por mutaciones de más de 30 genes diferentes, la mayoría son genes nucleares pero alrededor del 20-25% tienen mutaciones en genes mitocondriales. La mayoría de genes implicados tiene que ver con el proceso de producción energética mitocondrial y afectan a proteínas de los complejos de la cadena respiratoria I, II IV o V; muchas de estas mutaciones reducen o eliminan la actividad de estos complejos, lo que da lugar a la enfermedad. La disrupción del complejo IV también llamado citocromo c oxidasa es la causa más común del síndrome (Chujo et al., 2012), y dentro de este complejo la más frecuente es la del gen SURF1, gen nuclear que codifica para una proteína que participa en el ensamblaje del complejo IV y su alteración puede causar la disminución de producción de energía en la mitocondria.

Teniendo en cuenta la posible interacción entre FASTKD3 y LRPPRC será de mucho interés por tanto examinar si hay una asociación directa o indirecta entre las dos proteínas y analizar en el futuro como pueda afectar esta interacción a las funciones descritas para ambas proteínas.

4. RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO DE LA LÍNEA CELULAR U2OS FASTKD3 *KNOCKOUT*.

Con el objetivo de demostrar la especificidad del fenotipo observado en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO, nos propusimos re-introducir el DNA de FASTK3 en dicha línea mutante, para lo cual generamos vectores lentivirales, ya que como se ha descrito anteriormente, tienen una alta eficiencia de transducción tanto en células en división como en células en reposo y además se integran en el genoma del huésped

de forma que se consigue expresión continua y estable del gen de interés con cierta facilidad. (Blömer et al., 1997; Kafri et al., 1998; Naldini et al., 1996; Sutton et al., 1998). Además pueden introducirse en ellos grandes regiones codificantes y tienen un amplio tropismo celular, es decir pueden infectar la mayoría de tipos celulares (incluidas neuronas, células de la retina o hepatocitos), y además son poco inmunogénicos, o sea inducen escasa respuesta inmune en el huésped. (Wanisch et al., 2009).

Los lentivirus se generaron mediante cotransfección con el plásmido empaquetador y el plásmido de la envuelta junto con nuestro plásmido donante, el cual posee el gen FASTKD3 modificado que contiene un Tag-Flag-HA unido a su extremo carboxilo terminal. Hay que señalar, en relación a la bioseguridad, que este virus recombinante se produce a partir del vector pSin-EF2, que tiene ciertas modificaciones en su secuencia que impiden la replicación del gen una vez integrado, y reciben el nombre de autoinactivables (*self-inactivating*, SIN), lo cual es deseable cuando se usan lentivirus.

Una vez obtenido nuestro lentivirus con la proteína FASTKD3 wt, nos planteamos además generar otros lentivirus adicionales que contuvieran mutaciones en el dominio RAP (*acrónimo de RNA-binding domain abundant in Apicomplexans*), debido a la potencial capacidad de unión a RNA de este dominio.

RAP es un dominio muy infrecuente que está presente solo en un reducido número de proteínas en humanos, concretamente en los miembros de la familia FAST así como en una proteína hipotética (MGC5297) de función desconocida hasta el momento (Lee et al., 2004). Se encuentra sobre todo en un tipo de células eucariotas clasificadas dentro de los protistas, llamadas Apicomplexans, que se caracterizan por ser endoparásitos obligados y algunos de ellos producen enfermedades humanas como malaria (*Plasmodium*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*), babesiosis (*Babesia*). Los dominios RAP poseen múltiples bloques de aminoácidos aromáticos cargados y su estructura probablemente consiste de hélices alfa y láminas beta; tiene dos regiones ricas en glicina y triptófano que flanquean una lámina beta central (Lee et al., 2004). Las proteínas con dominios RAP en estos organismos parece mediar la interacción parásito-célula hospedadora.

Mediante el estudio comparativo de la secuencia de aminoácidos de los dominios RAP de todos los miembros de la familia FAST, se observa que existe una gran homología entre ellos (**figura 59**). Esto, junto con los antecedentes de la posible función del dominio RAP llevaron a proponer y ensayar si los miembros de la familia

de proteínas FAST interactúan con RNA mitocondrial. Así por ejemplo, Baltz et al., 2012, describieron que FASTKD1, FASTKD2 y FASTKD5 poseen el dominio RAP para unirse al RNA. También Ghezzi et al., en 2008 y Castello et al., 2012, observaron que una mutación que introducía un stop prematuro en la proteína FAST y como consecuencia daba lugar a la producción de una proteína truncada que carece del dominio RAP, tenía como consecuencia una menor susceptibilidad a estímulos proapoptóticos. En concreto se usó staurosporine, un inhibidor potencial de la *protein kinasa c*, conocido por inducir apoptosis a través de la activación de la vía de la caspasa-3 y por causar estrés oxidativo generando especies reactivas de oxígeno (ROS). Jourdain et al., 2015 comprobaron que el dominio RAP es esencial para la interacción entre FASTK y el mtRNA ND6, y la delección de RAP produce una marcada disminución del mtRNA ND6, además de pérdida de la asociación de FASTK con los gránulos de RNA mitocondriales. Por otro lado, recientemente han sido identificadas en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*, proteínas que contienen el dominio RAP; estas proteínas parecen unirse al extremo 5' del rRNA 16S de la planta y regular su procesamiento, de manera que la pérdida de estas proteínas produce un defecto en el procesamiento del rRNA 16S y resulta en una disminución en la traducción en el cloroplasto y una disminución paralela en su capacidad fotosintética (Kleinknecht et al., 2014).

Wolf et al., 2014 generaron un *knockdown* para FASTKD4 mediante shRNAs. Estudios de los niveles de los transcritos mitocondriales en dicho *knockdown* mostraron una disminución en la expresión relativa de COX1, COX2, COX3, ATP6/8, CytB y ND3, mientras que ND1 se encuentra aumentado, y ND2, ND4/4L y ND5 no presentan cambios. Para confirmar la especificidad del fenotipo, re-introdujeron en las células un cDNA de FASTKD4 que poseía mutaciones en 4 de los cinco últimos aa del dominio RAP de FASTKD4, sustituyéndoles por alaninas como se muestra en la **figura 59** (Y616A, L617A, K618A y K620A). Aunque todavía no se ha demostrado que la capacidad de unión del dominio a RNA dependa críticamente de la presencia de estos pocos residuos, estos autores no observaron recuperación del fenotipo con la expresión de este mutante, lo que indica el papel clave de esos residuos en la función de FASTKD4.

Nosotros también quisimos comprobar si los aumentos observados en expresión relativa de ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO eran debidos al *knockout*, por ello, en primer lugar, realizamos la delección de los últimos 5 aa del dominio RAP (Δ 3-57). En segundo lugar,

delecionamos el dominio RAP completo con la intención de detectar posibles alteraciones en FASTKD3 o en las uniones con los diferentes mtRNAs mitocondriales.

FAST	1	-RWHF----	CRDGRVLLGSRALRERHLGLMGYQLLPLPFELESQ--	RGLPQLKSYLRQK
FASTKD1	1	LEFLDSKALCRNIPHMKCKSAMKKRHLEILGYRVIQISQFEWNSMALSTKDARMDYLRE-		
FASTKD2	1	VLCVSRSAAYCLGSSHPRCFLAMKMRHLNAMGFHVILVNNWEMDKL---	EMEDAVTFLKTK	
FASTKD3	1	LCIDGPKRFCSNSKHLGKBAIKQRHLQLLGYQVVQIPYHEIGML--	KSRRELVEYLQRK	
FASTKD4	1	--WEFPN-FNSRSKDLLGRFVILARRHIVAAGFLIVDVPFYEWLEL--	KSEWQKGAAYLKDK	
FASTKD5	1	VQFTNRNQYCYGSRDLLGLHNMKRRQLARLGYRVVELSYWEWLPFLKRTREKLAFLHEK		

Figura 59. Imagen en la que se muestra la secuencia de aa que poseen todos los miembros de la familia FAST. Se encuentra marcado en rojo la secuencia de 5 aa delecionada en FASTKD3 y en verde se encuentran marcados los 4 aa que han sido mutados en FASTKD4.

Nosotros analizamos el fenotipo de 3 líneas celulares derivadas de U2OS FASTKD3 KO que expresan de forma estable FASTKD3: a) una expresa la forma completa wt de FASTKD3, b) otra la forma con deleción del dominio RAP, y c) la tercera, una forma con una minideleción de 15 nucleótidos al final del dominio RAP. Llamamos a estas formas, Rescate FASTKD3 wt, Rescate FASTKD3 ΔRAP y Rescate FASTKD3 Δ53-57 respectivamente. Estas líneas reconstituidas fueron estudiadas mediante qRT-PCR para comparar la expresión relativa de los transcritos mitocondriales en cada una de ellas, incluyendo también como control la línea original mutada que no expresa FASTKD3. Observamos que en la línea celular Rescate FASTKD3 wt, se producía una recuperación parcial del fenotipo observado en la célula deficiente en FASTKD3 en cuanto que disminuyen los niveles de expresión de los transcritos mitocondriales alterados, mientras que en las líneas Rescate FASTKD3 ΔRAP y Rescate FASTKD3 Δ53-57 no observamos cambios significativos en la expresión relativa de los transcritos estudiados. Es decir, el efecto de FASTKD3 sobre los niveles de mtRNA posiblemente depende de la presencia de un dominio RAP funcional; como también había observado Wolf et al. (2014) para FASTKD4.

5. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES DE LA TRADUCCIÓN MITOCONDRIAL DE NOVO.

Un vez observada la alteración en los niveles de ciertos mtRNAs, nos preguntamos si esto daba lugar a un cambio en los niveles de las proteínas correspondientes, para lo cual se llevaron a cabo experimentos de marcaje metabólico *in vitro* mediante metionina-S³⁵ en presencia de emetina que es un conocido inhibidor de la traducción de genes nucleares y permite así apreciar mejor cambios en la traducción mitocondrial.

Antonicka et al., 2015, realizaron experimentos similares de traducción en células con expresión silenciada de FASTKD2 o FASTKD5. En el knockdown de FASTKD2 en células 134B observaron una disminución en la traducción mitocondrial de ND5, ND4, COX2 y ND6, con respecto a las células control. Mientras que en las células 134B con FASTKD5 silenciado, se observó una disminución generalizada de todas las proteínas mitocondriales de aproximadamente el 50%, aunque COX1, fue la más afectada, pues su expresión era solo del 7% respecto a la de las células control.

En nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO, a pesar del aumento de los niveles de los transcritos mitocondriales ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB, el análisis de los niveles de las correspondientes proteínas revela una disminución solo de COX1. La disminución de esta proteína podría implicar alteraciones en el ensamblaje de los complejos OXPHOS y potencialmente ocasionar alteraciones en la actividad enzimática de dichos complejos. Nuestros datos preliminares sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria (**figura 60**), nos muestran disminuciones importantes en la actividad enzimática del complejo II en las células U2OS FASTKD3 heterocigotas (-38,72) y en la línea celular U2OS FASTKD3 KO (-35,12) y del complejo IV tanto para la línea celular U2OS FASTKD3 heterocigota (-26,62) como para la línea celular U2OS FASTKD3 KO (-33,82). Hay que recordar que el complejo II únicamente está constituido por proteínas codificadas por el núcleo. No se puede descartar sin embargo que la ausencia de FASTKD3 afecte la estequiometría del complejo II o que pudiera alterar también la expresión de proteínas codificadas por el núcleo puesto que al igual que FAST, FASTKD3 también puede poseer localización citoplasmática. No obstante, como el complejo IV se encuentra alterado en ausencia de FASTKD3 y observamos una disminución significativa de los niveles de una de las proteínas que forman parte de este complejo, COX1, hipotetizamos que ésta disminución explique al menos parcialmente el defecto observado. Hay experimentos en marcha para repetir y ampliar estos estudios y confirmar si la disminución de la proteína COX1 en este rango puede explicar por sí sola la afectación del complejo IV.

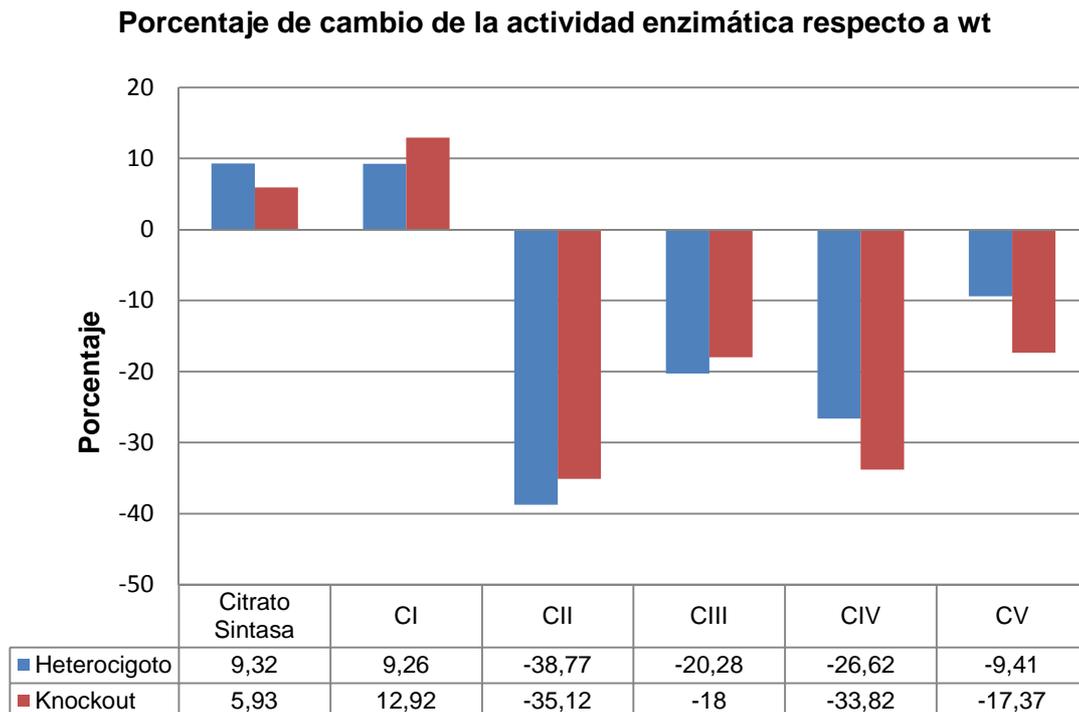


Figura 60. Gráfico en el que se muestran las actividades enzimáticas de los complejos mitocondriales en las líneas celulares U2OS FASTKD3 heterocigoto y U2OS FASTKD3 KO con respecto a la línea celular U2OS wt.

6. VIDA MEDIA DE LOS mRNAs MITOCONDRIALES.

Con objeto de explicar las alteraciones de expresión de los diferentes mtRNAs, estudiamos primero el número de copias de mtDNA, y no observamos aumento, sino al contrario, una pequeña disminución en las copias de mtDNA en la línea celular U2OS FASTKD3 KO y también en la línea celular U2OS FASTKD3 heterocigota con respecto a nuestras células control U2OS wt; si bien estos cambios no alcanzaron significación estadística.

Otra posibilidad que podría explicar las alteraciones de expresión de los diferentes mtRNAs podrían ser cambios en la vida media de estos transcritos. Por ello, nos planteamos estudiar la vida media para cada uno de los mRNAs en los que apreciamos alteraciones. Tratamos las células con bromuro de etidio con objeto de inhibir la transcripción de DNAs circulares, como es el mtDNA; esta inhibición se produce por la alteración molecular de su estructura terciaria (Hayashi et al., 1990). En nuestros experimentos se usa a concentración final de 0,5 µg/ml, que se ha demostrado efectiva, sin producir todavía muerte celular (Nagao et al., 2008).

Se realizó una cinética con recogida de muestras a varios tiempos entre 0 y 360 min y se observó como iban disminuyendo los niveles de mtRNA. La degradación fue más rápida en U2OS wt que en U2OS FASTKD3 KO lo que indica una vida media prolongada para los transcritos que se habían hallado elevados en la línea celular U2OS FASTKD3 KO. Otras publicaciones y también nuestros propios experimentos en células demuestran que la vida media de los transcritos mitocondriales es diferente dependiendo de la línea celular con la que se trabaje, lo que sugiere que hay otros factores proteicos involucrados en la regulación de la estabilidad post-transcripcional de cada transcrito mitocondrial. Autores como Piechota et al., (2006), realizaron el estudio de la vida media de los transcritos mitocondriales en células HeLa, utilizando tianfenicol a una concentración final de 50 µg/ml, que al igual que el bromuro de etidio produce la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales. Además, también se han realizado mediciones de la vida media mediante el marcaje con 4-Tiouridina, que permite al marcaje del nuevo RNA que está siendo transcrito sin interrupciones, lo que puede usarse para diferenciarlo del RNA total mediante biotinización y su consecuente separación mediante bolas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Esto permite separar el RNA total en RNA que está siendo transcrito nuevamente y RNA preexistente que no está marcado (Dolken et al., 2008, Borowski et al., 2013).

Los datos de la vida media de los diferentes transcritos mitocondriales obtenidos por Nagao et al., 2008 en células HeLa, fueron clasificados por Wolf et al., en 2014 en diferentes categorías: ND1-3, ND5 y CytB como transcritos de vida media corta ($t_{1/2}$ =68-94 min) y COX1-3, ND4/4L y ATP6/8 como transcritos de vida media larga ($t_{1/2}$ =138-231 min). Otros autores, como es el caso de Piechota et al., 2006, también utilizaron células HeLa, en las que estudiaron ocho transcritos de la cadena pesada. Estos fueron clasificados según su vida media en tres categorías; en el grupo más números se encontraban ND1, ND2, COX1, ND5 y CytB, presentando una vida media entre 2 y 3 horas. El segundo grupo sólo se encontraba ND3 con una vida media de 1 hora y en el tercer grupo se encontraban COX2 y ATP6/8, con una vida media 2 veces mayor a la obtenida en los miembros del primer grupo. Como podemos observar, el estudio de la vida media en la misma línea celular pero mediante diferentes métodos, también aporta diferencias, como ya habíamos mencionado anteriormente que podía suceder.

Nuestros datos han sido comparados con los obtenidos por Nagao et al., 2008, ya que aunque hemos utilizado una línea celular diferente, el método utilizado y los tiempos en el que se realizó la toma de muestras fueron los mismos. Encontramos

variaciones en el valor de la vida media obtenido en alguno de los transcritos la línea celular U2OS wt con respecto a la clasificación mencionada anteriormente y que fue realizada por Wolf et al., 2014, observando las diferencias más destacables para ND3 y COX2. En nuestro caso ND3 tiene vida media larga ($t_{1/2}=138$ min) y COX2 tiene vida media corta ($t_{1/2}=81$ min), mientras que los datos obtenidos en células HeLa, muestran una vida media larga para COX2 y corta para ND3.

7. ALTERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

La ralentización en el crecimiento de las células U2OS FASTKD3 KO es un fenómeno muy llamativo por lo que decidimos hacer estudios de proliferación celular. Observamos que la proliferación en nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO está muy alterada, siendo su tiempo de duplicación 4 veces más largo que el de las células U2OS wt. No se observa en los cultivos incremento en el número de células muertas o apoptóticas. Además, también podemos apreciar alteraciones en su morfología, ya que presentan un aumento en la formación de lamelipodios y filopodios, que pueden tener relación con la posible acción de FASTKD3 sobre el citoesqueleto de actina, campo este, pendiente de estudio.

Estos hallazgos también nos llevan a hipotetizar una posible relación de FASTKD3 con la polinucleótido fosforilasa (PNPasa). Cabe recordar que PNPasa está involucrada en la homeostasis de la cola de poli(A), y forma parte del degradosoma mitocondrial cuando se une a la helicasa Suv3 (Chujo et al., 2012). Szczensny et al., 2010 y Borowki et al., 2013 describieron que el silenciamiento de PNPasa, produce una disminución en el crecimiento celular acompañado de cambios en la morfología. Además de los datos que demuestran que la PNPasa es esencial para la degradación del RNA en la mitocondria humana, es muy probable que existan otras RNasas (ribonucleasas) involucradas, como por ejemplo REXO2 o HRSP12, las cuales son importantes para el metabolismo del RNA mitocondrial. Cabe mencionar, que REXO2 está localizada en el citosol y en el espacio intermembrana de la mitocondria, expresándose de forma ubicua en todos los tejidos y organismos. Su eliminación producía cambios en la morfología celular y bloqueo de la proliferación en células wt (HeLa, HEK293), mientras que en las células rh0 (carecen de mtDNA) su crecimiento era normal (Bruni et al., 2013). Además, Khidr et al., en 2008 estudiaron los efectos de la ausencia de helicasa Suv3 en células U2OS. Estas células presentaban una disminución en la expresión de los niveles de los componentes de la fosforilación oxidativa con un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras el potencial de membrana y la producción de ATP se encontraban

disminuidos. Esta acumulación de defectos dio lugar a efectos pleiotrópicos en la mitocondria como por ejemplo la disminución en el número de copias de mtDNA y cambio en la morfología de la mitocondria, pasando de una forma tubular a granular, la cual se manifiesta eventualmente con senescencia o muerte celular.

En nuestros estudios además de la ralentización celular y cambio en la morfología mencionados anteriormente, observamos que nuestra línea celular U2OS FASTKD3 KO posee una disminución en el número de copias de mtDNA con respecto a las células U2OS wt. Todos estos hallazgos y los antecedentes descritos anteriormente nos llevan a plantear el estudio futuro de las potenciales interacciones entre FASTKD3 y PNPasa y Suv3, de modo que podamos describir más en detalle las rutas del metabolismo mitocondrial en las que FASTKD3 interviene.

CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las conclusiones obtenidas para cada uno de los objetivos planteados:

1. FASTKD3 es de localización mitocondrial pero no se encuentra asociado a los gránulos mitocondriales de RNA, lo que indica que no está involucrado en el procesamiento de los mtRNAs. Además, la ausencia total o parcial del dominio RAP (Δ RAP y Δ 53-57), no produce cambios en la localización celular de FASTKD3.
2. Se ha generado con éxito una línea celular U2OS FASTKD3 *knockout* mediante el uso de un vector donante en el que el exón 2 ha sido sustituido por un casete de resistencia a blasticidina junto con nucleasas TALENs específicas.
3. Se han observado aumentos significativos en la expresión relativa de ND2, ND3, ND4/4L, COX2, ATP6/8 y CytB en la línea celular U2OS FASTKD3 *knockout*. Estos aumentos se asocian con una vida media alargada de dichos mRNAs.
4. La línea celular U2OS FASTKD3 KO presentó una disminución significativa en la síntesis de la proteína COX1, que puede estar asociada a la reducción en la actividad enzimática del complejo IV mitocondrial observada.
5. La ralentización de la proliferación celular, y pequeños cambios en la morfología celular sugieren que FASTKD3 interacciona con moléculas involucradas en la estabilización del mRNA, como pueden ser PNPasas, REXO2 o LRPPRC, o actuando como una nucleasa.
6. Se han transducido células U2OS FASTKD3 KO con lentivirus que expresan FASTKD3 wt o mutantes del dominio RAP.
 - a. Las células transducidas con el lentivirus Sin-Sox2-FASTKD3 wt recuperaron parcialmente el fenotipo para aquellos mRNAs mitocondriales que previamente se encontraban alterados.
 - b. Las células transducidas con los lentivirus Sin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ 53-57 y Sin-Sox2-FASTKD3-FHA- Δ RAP, mantuvieron la misma expresión relativa de los mRNAs mitocondriales que la línea celular U2OS FASTKD3 KO, lo que sugiere que el dominio RAP de FASTKD3 es necesario para el normal metabolismo de diferentes mRNAs mitocondriales.

ANEXOS

1. NOMBRE Y SECUENCIA DE *PRIMERS*.

<i>Primers para el screening</i>	
NOMBRE	SECUENCIA
P5	5'-CCCATGAAACACACATCCTG-3'
P6	5'-GCTCTATGCATCTGAAAATCAG-3'
P7	5'-TAGAAAGCTGGAAAACGTGC-3'
P8	5'-TTTGATTAGTGAGTCTCATTCC-3'
P9	5'-TAATGCACATTGGCAACAGC-3'
P10	5'-GGAAAGTCCCTATTGGCGTT-3'
P11	5'-GCATTCCCAGATAGAGACAAAA-3'
P12	5'-TCACTGCCCTGGTGGTTCTT-3'
P13	5'-GCAGTACTCCATGACCCTGC-3'
P14	5'-CCGTCTGTCTGTCTTGACA-3'
P15	5'-CCCTCTCTTGCCACCAATG-3'

<i>Primers para la obtención de Tag FLAG-HA</i>	
NOMBRE	SECUENCIA
P16	5'-GTACCGCGGGCCCGGATCCACCGTCCGCGGAGACTACAAGGACGACG-3'
P17	5'-AGTCGCGGCCGCACTAGTCTACTAGGCGTAGTCGGGCACG-3'

<i>Primers para la reacción mutagénesis y secuenciación</i>	
NOMBRE	SECUENCIA
del 46-60 FASTKD3 SEN	5'-AATCAAGACGTGAATTGGTGGAACTGTTTTCTCAAAACACTGTTC-3'
del 46-60 FASTKD3 ATS	5'-GAACAGTGTTTTGAGAAAACAGTTCCACCAATTCACGTCTTGATT-3'
del FASTKD3 RAP SEN	5'-GAAGATATCCATAAAAGGATAGCACTGTTTTCTCAAAACACTGTTCAT-3'
del FASTKD3 RAP ATS	5'-ATGAACAGTGTTTTGAGAAAACAGTGCTATCCTTTTATGGATATCTTC-3'
SEQ MUTAGENESIS	5'-CTATTGTTATACAATAGATGTTG-3'

<i>Primers genes normalizadores</i>	
NOMBRE	SECUENCIA
Beta actin (H) 229 SEN	5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA-3'
Beta actin (H) 420 ATS	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'
(h)18S 361 SEN	5'-TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT-3'
(h)18S 468 ATS	5'-TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'

Primers para qRT-PCR de mRNA mitocondriales	
NOMBRE	SECUENCIA
ND1F	5'-GAGCAGTAGCCCAAACAATCTC-3'
ND1R	5'-GGGTCATGATGGCAGGAGTAAT-3'
ND2F	5'-TACGCCTAATCTACTCCACTC-3'
ND2R	5'-GGAGATAGGTAGGAGTAGCGTG-3'
ND3F	5'-CCACCCCTTACGAGTGCGGCTT-3'
ND3R	5'-TTGTAGGGCTCATGGTAGGGGT-3'
ND4/4LF	5'-ACCTACTGGGAGAACTCTCTGT-3'
ND4/4LR	5'-GGTGAGTGAGCCCCATTGTGTT-3'
ND5F	5'-ACCGCACAATCCCCTATCTAGG-3'
ND5R	5'-TTGGGTTGAGGTGATGATGGAG'-3'
ND6F	5'-TGGGGTTAGCGATGGAGGTAGG-3'
ND6R	5'-AATAGGATCCTCCCGAATCAAC-3'
CO1F	5'-GGAGCAGGAACAGGTTGAACAG-3'
CO1R	5'-GTTGTGATGAAATTGATGGC-3'
CO2F	5'-CCCTTACCATCAAATCAATTGGCC-3'
CO2R	5'-ATTGTCAACGTCAAGGAGTCGC-3'
CO3F	5'-TCCTCACTATCTGCTTCATCCG-3'
CO3R	5'-CCCTCATCAATAGATGGAGACA-3'
ATP6/8F	5'-CACAACTAAAGGACGAACCT-3'
ATP6/8R	5'-GGGATGGCCATGGCTAGGTTTA-3'
CytBF	5'-CTGATCCTCAAATCACCACAG-3'
CytBR	5'-GCGCCATTGGCGTGAAGGTA-3'

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson P. and Kedersha N.** RNA granules. *JCB*. 2006. Vol. 172, N°6.
- Andrews B., Carroll J., Ding S., Fearnley I. M., and Walker J. E.** Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *PNAS*. 2013. Vol. 110, N°7, 18934-18939.
- Antonicka H., and Shoubridge E. A.** Mitochondrial RNA granules are centres for posttranscriptional RNA processing and ribosome biogenesis. *Cell Report*. 2015. 920-932.
- Antonicka H., Sasarman F., Nishimura T., Paupe V., and Shoubridge E. A.** The mitochondrial RNA-Binding Protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 17, 386-398.
- Attardi G., and Schatz G.** Biogenesis of mitochondria. *Annual Review. Cell Biology*. 1988. Vol. 4, 289-333.
- Baltz A. G., Munschauer M., Schwanhäusser B., Vasile A., Murakawa Y., Schueler M., et al.** The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Molecular Cell*. 2012. Vol. 46. 674-690.
- Baughman J. M. , Nilsson R., Gohil V. M., Arlow F. H., Gauhar Z., and Mootha V. K.** A computational screen for regulators of Oxidative Phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *Plos Genetics*. 2009. Vol. 5.
- Belhaj K., Chaparro-García A., Kamoun S., Patron N. J., and Nekrasov V.** Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current opinion in Biotechnology*. 2015. Vol. 32:76-84.
- Bhaya D., Davison M., Barrangou R.** CRISPR-Cas systems in Bacteria and Archaeas: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 2011. 45:273-97.
- Blömer U., Naldini L., Kafri T., Trono D., Verma I. M., and Gage F. H.** Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with lentivirus vector. *Journal of Virology*. 1997. P. 6641-6649.
- Borowski L. S., Dziembowski A., Hejnowicz M. S., Stepień P. P., and Szczesny R. J.** Human mitochondrial RNA decay mediated by PNPase-hSuv3 complex takes place in distinct foci. *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41, No. 2, 1223-1240.

Bruni F., Gramegna P., Oliveira J. M. A., Lightowers R. N., and Chrzanoswka-Lightowers Z. M. A. REXO2 is an oligoribonuclease active in human mitochondria. *Plos One*. 2013. Vol. 8, Issue 5.

Brzezniak L. K., Bijata M., Szczesny R. J. and Stepień P. P. Involvement of human ELAC2 gene product in 3' end processing of mitochondrial tRNAs. *RNA Biology*. 2011. Vol. 8:4, 616-626.

Buchsacher G. L., Jr, and Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*. 2000. Vol. 95, Number 8.

Bultmann S., Morbitzer R., Schmit C.S., Thanisch K., Spada F., et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetics modifiers. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, 5368-77.

Burns J. C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., and Yee J-K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Genetics*. 1993. Vol. 90, pp. 8033-8037.

Cámara Y., Asin-Cayuela J., Park C. B., Metodiev M. D., Shi Y., Ruzzenente B., et al. MTERF4 Regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metabolism*. 2011. Vol. 13, 527-539.

Capecchi M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetic*. 6, 507-512. 2005.

Carew J. S. and Huang Peng. Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer*. 2002. 1:9.

Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell*. 2012. Vol. 119, 1-14.

Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39, No. 12.

Chapman J. R., Taylor M. R. G. and Boulton S. J. Playing the end game: DNA Double-Strand Break repair pathway choice. *Molecular Cell*. 2012. Vol. 47.

Chomyn A. In vivo Labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods in enzymology*. 1996. Vol. 264.

Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., and Voytas D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010. Vol. 186, 757-761.

Chujo T., Ohira T., Sakaguchi Y., Goshima N., Nomura N., Nagao A., and Suzuki T. LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, No. 16, 8033-8047.

Clayton D. A. Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises. *Experimental Cell Research*. 2000. Vol. 255, 4-9.

Colas E., Pérez C., Cabrera S., Pedrola N., Mong M., Castellvi J., et al. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *International Journal of Cancer*. 2011. Vol. 129, 2435-2444.

Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. Multiplex genome Engineering Using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013. Vol. 15, 339 (6121): 819-823.

Davies S. M., Rackham O., Shearwood A. M., Hamilton K. L., Narsai R., Whelan J. and Filipovska A. Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Lett*. 2009. Vol. 583, 1853-1858.

Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The Journal Gene of Medicine*. 2004. Vol. 6, S125-138.

Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J-K., Shi Y., and Yan N. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*. 2012. 15 (6069): 720-723.

Ding Q., Lee Y-K., Schaefer E., Peters D., Veres A. et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*. 2013. Vol. 12, 238-251.

Doege K., Heine S., Jensen I., Jelkmann W., and Metzen E. Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact. *Blood Journal*. 2005. 106 (7).

Dolken L., Ruzsics Z., Radle B., Friedel C. C., Zimmer R., Mages J., et al. High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA*. 2008. Vol. 14, 1959-1972.

Felice B., Cattoglio C., Cittaro D., Testa A., Miccio A., Ferrari G., Luzi L., Recchia A., Mavilio F., Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. *Plos One*. 2009. Vol. 4.

Fernandez Silva P., Enriquez J. A. and Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*. 2003. Vol 88. 41-56.

Gaj T., Gersbach C. A., and Barbas C. F. ZFN, TALEN, and CRISP/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013. Vol. 31, No. 7.

Gallay P., Hope T., Chin D., and Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Scic*. 1997. Vol. 94, pp. 9825-9830.

Garesse R., and Vallejo C. G. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene*. 2001. Vol. 263, 1-16.

Ghezzi D., Saada A., D'Adamo P., Fernandez-Vizarra E., Gasparini P., Tiranti V., Elpeleg O., and Zeviani M. FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with Cytochrome C oxidase deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 2008. Vol. 83, 415-423.

Grivell L. A. Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Critic Review Biochemical Molecular Biology*. 1995. Vol. 30, 121-164.

Hayashi J., Tanaka M., Sato W., Ozawa T., Yonekawa., Kagawa Y and Ohta S. Effects of ethidium bromide treatment of mouse cells on expression and assembly of nuclear-coded subunits of complexes involved in the oxidative phosphorylation. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 1990. Vol. 167, 216-221.

Hess J. F., Paris M. A., Bennett J. L., and Clayton D. A. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the

MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*. 1991. Vol 351, 236-239.

Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C. S., Gao Q., Cassady J. P., Cost G. J., Zhang L., Santiago Y., Miller J. C. et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*. 2011. Vol. 29, 731-734.

Holzmann J., Frank P., Löffler E., Bennett K. L., Gerner C., and Rossmanith W. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*. 2008. Vol. 135, 462-474.

Humphrey S. E, and Kasinski A. L. RNA-guided CRISPR-Cas technologies for genome-scale investigation of disease processes. *Journal of hematology & oncology*. 2015. 8:31.

Ichim G., López J., Ahmed S. U., Muthalagu N., Ciampazolias E., Delgado M. E. et al. Mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Molecular Cell*. 2015. Vol. 57, 860-872.

Izquierdo J. M., and Valcárcel J. Fas-activated Serine/Threonine Kinase (FASTK) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282, Nº. 3.

Jankele R. and Svoboda P. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Griefings in Functional Genomics*. 2014.

Jourdain A. A., Koppen M., Rodley C. D., Maundrell K., Gueguen N., Reynier P., et al. A mitochondrial-specific isoform of FASTK is present in mitochondrial RNA granules and regulated gene expression and function. *Cell Reports*. 2015. Vol. 10, 1110-1121.

Jourdain A. A., Koppen M., Wydro M., Rodley C. D., Lightowlers R. N., Chrozanowska-Lightowlers Z. M., and Martinou J. C. GRSF1 Regulates RNA Processing in Mitochondrial RNA Granules. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 17, 399-410.

Kafri T, Van Praag H., Ouyang L., Gage F. H., and Verma I. M. A packing cell line for lentiviral vectors. *Journal of Virology*. 1999. P. 576-584.

Khidr L., Wu G., Davila A., Procaccio V., Wallance D., and Lee Wen-Haw. Role of SUV3 helicase in maintaining mitochondrial homeostasis in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 200. Vol. 283, No. 40, pp. 27064-27073.

Kleinknecht L., Wang F., Stübe R., Philippar K., Nichelsen J., and Bohne A. V. RAP, the sole octotricopeptide repeat protein in Arabidopsis, is required for chloroplast 16S rRNA maturation. *Plant Cell*. 2014. Vol. 26, 777-787.

Koc E. C and Spremulli L. L. Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *Journal Biology Chemical*. 2002. Vol. 277, 35541-35549.

Krajewska M., Fehrmann R. S. N., Vries E. G. E. and Van Vugt M. A. T. M. Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment. *Frontiers in Genetics*. 2015. Vol. 6, Article 96.

Kruse B., Narasimhan N., and Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*. 1989. Vol. 58, 391-397.

Langerak P. and Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philosophical transactions of the Royal Society*. 2011. Vol. 366, 3562-3571.

Lee I. and Hong W. RAP- a putative RNA-binding domain. *Trends in Biochemical Science*. 2004. Vol. 29, 567-570.

Leonard J. V., Schapira A. H. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *The Lancet*. 2000. Vol 355.

Li T., Huang S., Jiang W. Z., Wright D., Spalding M. H., Weeks D. P., and Yang B. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39, 143-148.

Li W., Kedersha N., Chen S., Gilks N., Lee G. and Anderson P. FAST is a BCL-X_L associated mitochondrial protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. Vol. 318, 95-102.

López Sanchez M. I., Mercer T. R., Davies S. M. K., Shearwood A-M J., Nygard K. K. A., and Richman T. R., et al. RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle*. 2011. 10:17, 2904-2916.

Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. RNA-guide Human Genome Engineering via Cas9. *Science*. 2013. Vol. 15; 339(6121): 823–826.

Merante F., Petrova-Benedict R., MacKay N., Mitchell G., Lambert M., Morin C. et al. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay Lac Saint Jean region of Quebec. *The American Journal of Human Genetics*. 1993. Vol. 53, 481-487.

Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*. 2011. Vol. 29, 143-148.

Miyoshi H., Blömer U., Takahashi M., Gage F. H., and Verma I. M. Development of a Self-Inactivating Lentivirus vector. *Journal of virology*. 1998. P. 8150-8157.

Mojica F. J. M., Diez-Villaseñor C., García-Martínez J. and Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009. Vol. 155, 733-740.

Mootha V. K., Lepage P., Miller K., Bunkenborg J., Reich M., Hjerrild M., et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100, 605-610.

Moriya J., Yokogawa T., Wakita K., Ueda T., Nishikawa K., and Crain P. F. et al. A novel modified nucleoside found at the first position of the anticodon of methionine tRNA from bovine liver mitochondria. *Biochemistry*. 1994. Vol. 33, 2234-2239.

Mussolino C., and Cathomen T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Current opinion in Biotechnology*. 2012. Vol. 23, 644-650.

Nagaike T., Suzuki T., Katoh T. and Ueda T. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *Journal of Biology Chemistry*. 2005 Vol. 280, 19721-19727.

Nagao A., Hino-Shigi N., and Suzuki T. Measuring mRNA Decay in Human Mitochondria. *Methods in Enzymology*. 2008. Vol. 447.

Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage FH., and et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996. Vol. 272. N° 5259, 263-267.

Niforou K. N., Anagnostopoulos A. K., Vougas K., Kittas C., Gorgoulis V. G., and Tsangaris G. T. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2008. Vol. 5: 63-78.

Ojala D., Montoya J., and Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 1981. Vol. 290, No. 5806, 470-474.

Piechota J., Tomecki F., Gewartowski K., Szczesny R., Dmochowska A., Kudla M., et al. "Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells". *Acta Biochimica Polonica*. 2006. Vol. 53. N° 1, 157-167.

Pluta K. and Kacprzak M. M. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochimica Polonica*. 2009. Vol. 56 No.4, 531-595. 2009.

Radecke S., Radecke F., Cathomen T., Schwarz K. Zinc-finger nuclease induced gene repair with oligodeoxynucleotides: Wanted and unwanted target locus modifications. *Molecular Therapy*. 2010. 18:743-753.

Ran F. A., Hsu P., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., and Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013. Vol. 8, No. 11.

Reyon D., Tsai S. Q., Khayter C., Foden J. A., Sander J. D., and Joung J. K. FLASH assembly of TALENs enable high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*. 2012. Vol. 30(5): 460-465.

Rivier C., Goschmidt-Clermont M., and Roxhaix J. D. Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Embo Journal*. 2001. Vol. 20. 1765-1773.

Rossmann W., and Holzmann J. Processing mitochondrial (t)RNAs. *Cell cycle*. 2009. Vol. 8:11 1650-1653.

Rossmanth W. Localization of human RNase Z isoforms: Dual nuclear/mitochondrial targeting of the ELAC2 gene product by alternative translation initiation. *Plos One*. 2011.

Sasarman F., Brunel-Guitton C., Antonicka H., Wai T. and Shoubridge E. A. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondrial. *Molecular Biology Cell*. 2010. Vol. 21, 1315-1323.

Sastry L., Johnson T., Hobson MJ., Smucker B. and Cornetta K. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Therapy*. 2002. Vol. 9, 1155-1162.

Schambach A., Zychlinsky D., Ehrnstroem B., and Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Human gene therapy*. 2013. Vol. 24, 132-142.

Schapira A. H. V. Mitochondrial disease. *The Lancet*. 2006. Vol 368.

Schmid-Burgk J. L., Schmidt T., Kaiser V., Höning K. and Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature Biotechnology*. 2013. Vol. 31, No. 1.

Sekar S., McDonal J., Cuyugan L., Aldrich J., Kurdoglu A., Adkins J., et al. Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiology of aging*. 2015. 583-591.

Shrivastav M., De Haro L. P., and Nickoloff J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*. 2008. Vol. 18:134-147.

Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau P., Pâques F. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Perspectives and challenges for gene therapy. *Current Gene Therapy*. 2011. Vol. 11, 11-27.

Simarro M., Gimenez-Cassina A., Kedersha N., Lazaro J-B., Adelmant G. O., Marto J. A. et al. Fast kinase domain-containing protein 3 is a mitochondrial protein essential for cellular respiration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. Vol. 401, 440-446.

Simarro M., Giorgio G., De la Fuente M. A., Benarafa C., Subramanian K. K., Ishizawar R., et al. Fas-Activated Serine/Threonine Phosphoprotein promotes immune-mediated pulmonary inflammation. *The Journal of Immunology*. 2010.

Simarro M., Mauger D., Rhee K., Pujana M. A., Kedersha N., Yamasaki S., et al. Fas-activated serine/threonine phosphoprotein (FAST) is a regulator of alternative splicing. *PNAS*. 2007. Vol. 104. No. 21, 11370-11375.

Sinkunas T., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., and Siksnys V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *The EMBO journal*. 2011. Vol. 30, 1335-1342.

Smits P., Smeitink J., and Van den Heuvel L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010.

Sun N. and Zhao H. Transcription Activator-Like effector Nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013.

Sutton R. E., Wu T. T., Rigg R., Bohnlein E., and Brown P. O. Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *Journal of Virology*. 1998. Vol. 72, 5781-5788.

Suzuki K., Yamauchi M., Suzuki M., Oka Y., and Yaashita S. Involvement of Non-homologous End-Joining in Radiation-Induced genomic instability. *Intech open books*. 2011.

Szczesny R. J., Borowski L. S., Brzezniak L. K., Dmochowska A., Gewartowski K., Bartnik E., and Stepień P. P. Human mitochondrial RNA turnover caught in flagranti: involvement of hSuv3p helicase in RNA surveillance. *Nucleic Acids Research*. 2010. Vol. 38. No. 1, 279-298.

Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1410, 103-123.

Tang Y., Garson K., Li L., and Vanderhyden B. C. Optimization of lentiviral vector production polyethylenimine-mediated transfection. *Oncology letters*. 2015. Vol. 9, 55-62.

Temperley R. J., Wydro M., Lightowlers R. N., and Chrzanowska-Lightowlers Z. M. Human mitochondrial mRNAs like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010. Vol. 1797, 1081-1085.

Terzioglu M., Ruzzenente B, Harmel J, Mourier A, Jemt E, Dávila López M, Kukat C., Stewart JB, Wibom R, Meharg C, Habermann B, Falkenberg M., Gustafsson CM, Park CB, and Larsson NG. MTERF1 Binds mtDNA to Prevent Transcriptional Interference at the Light-Strand Promoter but Is Dispensable for rRNA Gene Transcription Regulation. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 17, 618-626.

Tu Y-T. and Barrientos A. The human mitochondrial DEAD-Box protein DDX28 resides in RNA granules and functions in mitoribosome assembly. *Cell Reports*. 2015. Vol. 10, 854-864.

Vasquez K. M., Marburger K., Intody Z., Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. Vol. 98: 8403-8410.

Wanisch K. and Muñoz-Yáñez R. J. Integration-deficient Lentiviral Vectors: a slow coming of age. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. 2009. Vol. 17 no 8, 1316-1332.

Weigl S., Paradiso A. and Tommasi S. Mitochondrial and familial predisposition to breast cancer. *Current Genomics*. 2013. 14, 195-203. 2013.

Wilkinson R. and Wiedenheft B. A CRISPR method for genome engineering. *F1000Prime Reports*. 2014.

Wolf A. R., and Mootha V. K. Functional genomic analysis of human mitochondrial RNA processing. *Cell Report*. 2014. 918-931.

Xu F., Ackerley C., Maj C. C., Addis J. B. L., Levandowskij V., Lee J., MacKay N., Cameron J. M., and Robinson B. H. Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome b expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochemical Journal*. 2008. Vol. 416, 15-26.

Yeung K. T., Das S., Zhang J., Lomniczi A., Ojeda R. S., Xu C-F., Neubert A. T., and Samuels H. H. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Molecular Cell Biology*. 2011. 31 (11): 2287-2298.

Zufferey R., Nagy D., Mandel R. J., Naldini L., Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature biotechnology*. 1997. Vol 15.