



---

# Universidad de Valladolid

## Trabajo de Fin de Máster

**Generación de un modelo celular para la caracterización funcional de mutaciones en la succinato deshidrogenasa asociadas a cáncer y a enfermedades neurodegenerativas**



Valladolid, Septiembre 2022

**Autor: Juan de Paz Gutiérrez**

**Directores: Dra. María Simarro Grande**

**Dr. Miguel Ángel de la Fuente García**

# Indice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
1) MATERIALES .....	6
1.1) Línea celular .....	6
1.2) Cepa bacteriana .....	6
1.3) Plásmidos.....	6
1.4) Reactivos.....	6
1.4.1) Medios de cultivo .....	6
1.4.2) Proteínas recombinantes .....	7
1.4.3) Tampones y soluciones .....	7
1.4.4) Kits comerciales .....	7
1.4.5) Anticuerpos .....	8
1.4.6) Equipos .....	8
1.4.7) Otros .....	8
2) MÉTODOS .....	8
2.1) Diseño y generación de U2OS SDHA <sup>-/-</sup> .....	8
2.2) Análisis de los clones:.....	10
2.2.1) Extracción de DNA genómico .....	10
2.2.2) PCR .....	10
2.2.3) Extracción de proteínas .....	11
2.2.4) Western blot .....	12
2.3) Generación del plásmido de rescate SDHA-WT.....	12
2.3.1) Obtención del inserto de SDHA.....	12
Extracción de RNA de U2OS .....	12
Síntesis de cDNA.....	12
2.3.2) Obtención del inserto de resistencia a puromicina .....	13
2.3.3) Digestión del plásmido donante .....	14
2.3.4) Síntesis del plásmido pSDHA WT.....	15
2.3.5) Purificación del plásmido a pequeña escala y comprobación de la ligación .....	16
2.3.6) Purificación del plásmido a gran escala .....	16
2.4) Mutagénesis del pSDHA WT.....	16
2.5) Transfección con pSDHA WT, pSDHA 1351 C>T y pSDHA 1765 C>T.....	17
2.5.1) Western blot .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
1) GENERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR SDHA <sup>-/-</sup> .....	18
2) GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO DE RESCATE PSDHA-FLAG WT .....	19
3) GENERACIÓN DE LOS MUTANTES SDHA C.1351C>T Y C.1765C>T .....	21
4) ENSAYOS DE RESCATE CON LOS PLÁSMIDOS PSDHA WT, PSDHA 1351C>T Y PSDHA 1765C>T.....	22
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>26</b>

## Abreviaturas

**ADP/ATP:** Di/Trifosfato de adenosina (Adenosin Di/TriPhospate)

**CRISPR:** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

**DNA/RNA:** Ácido desoxi/(r)ribonucleico (Deoxy/RiboNucleic Acid)

**EGFP:** Proteína fluorescente verde mutada para aumentar su actividad (Enhanced Green Fluorescent Protein)

**ETC:** Cadena de transporte de electrones (Electron Transport Chain)

**FAD/FADH<sub>2</sub>:** Dinucleótido de flavina y adenina, forma oxidada/reducida (Flavin Adenine Dinucleotide)

**g/cDNA:** DNA genómico/complementario (Genomic/Complementary DNA)

**gRNA:** RNA guía (Guide RNA)

**HIF:** Factor inducible por hipoxia (Hipoxic Inducible Factor)

**NAD/NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina, forma oxidada/reducida (Nicotin Adenine Dinucleotide)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

**SDH:** Succinato DesHidrogenasa

**SDHAF:** Factor de ensamblaje de SDH (SDH Assembly Factor)

## Resumen

La mitocondria es un orgánulo que desempeña un papel fundamental en el funcionamiento celular. Defectos en su funcionamiento generan multitud de patologías. Entre las causas de estas patologías mitocondriales se encuentran las mutaciones en genes que codifican para enzimas mitocondriales, en especial en las de los complejos de la cadena respiratoria. Mutaciones en la succinato deshidrogenasa se han descrito asociadas a enfermedades neurodegenerativas y a cáncer. Los mecanismos que explican estas asociaciones no están claros. Este trabajo pretende generar un modelo celular para el estudio de mutaciones en la succinato deshidrogenasa y avanzar en los mecanismos moleculares que las conectan a estas patologías. Para ello, se generó una línea celular *SDHA*<sup>-/-</sup> mediante complejos gRNA/Cas9. Además, se sintetizó un plásmido de rescate con la secuencia codificante de *SDHA*, sobre el cual se realizó mutagénesis dirigida para introducir las mutaciones c.1351C>T y c.1765C>T. Estos plásmidos se usaron para los ensayos de rescate en las células U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup> y se analizó la expresión de SDHB y la de los complejos de la cadena respiratoria.

## Abstract

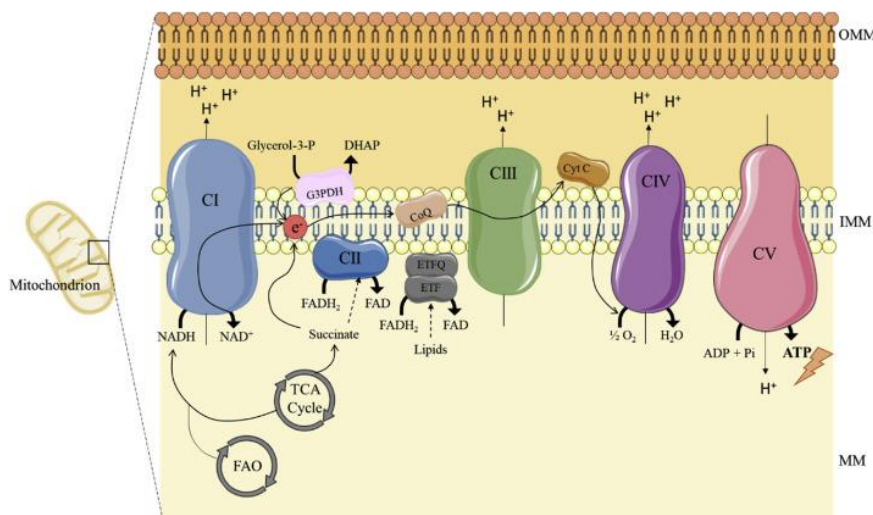
The mitochondria is an organelle that plays an essential role in cell function. Mitochondrial dysfunction is behind a variety of pathologies. Among the causes of these mitochondrial pathologies are mutations in genes encoding for mitochondrial enzymes, especially those of the respiratory chain complexes. Mutations in succinate dehydrogenase have been associated with neurodegenerative diseases and cancer. The mechanisms behind these observations remain poorly understood. This work aims to generate a cellular model to study succinate dehydrogenase mutations and thus deepen into the molecular mechanisms that connect them to these pathologies. For that purpose, *SDHA*<sup>-/-</sup> cellular line was developed using gRNA/Cas9 complexes. Furthermore, a rescue plasmid with the sequence encoding SDHA was synthesized. Site-directed mutagenesis was performed introducing c.1351C>T and c.1765C>T mutations. These plasmids were used in rescue assays in the U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup> cells and SDHB and electron transport chain complexes expression were analyzed.

## Introducción

Las mitocondrias son orgánulos especialmente conocidos por su papel en la respiración celular, proceso en el cual los electrones de moléculas reducidas como el NADH y el FADH<sub>2</sub> son transportados hasta un aceptor final, el oxígeno, a través de un conjunto de enzimas. Estas se agrupan en cuatro complejos, formados por varias subunidades proteicas y ancladas a la membrana mitocondrial interna. Estos complejos catalizan la reacción de transporte de electrones hacia la ubiquinona, el citocromo c y finalmente el O<sub>2</sub>. Este proceso, energéticamente favorable, posibilita el transporte de protones por parte de los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana para generar un gradiente de protones. Finalmente, el complejo V permite el paso de protones hacia la matriz, a favor de gradiente electroquímico, usando la energía del proceso para fosforilar el ADP y sintetizar ATP (figura 1).

La mitocondria, además, juega un papel esencial en muchos otros procesos celulares como la apoptosis, la síntesis e interconversión de múltiples metabolitos, el manejo del Ca<sup>2+</sup> o la producción de ROS. Por ello, defectos en el funcionamiento de estas organelas generan patologías de diversa índole con diversas formas de presentación (1,2). Estas enfermedades surgen de mutaciones en genes, ya sean mitocondriales como es el caso de varias subunidades del complejo I (3), una subunidad del complejo III, tres subunidades del complejo IV y dos subunidades del complejo V (4,5) o nucleares como es el caso de las subunidades del complejo II. Estas mutaciones se caracterizan principalmente por defectos en la fosforilación oxidativa y disminución del consumo de O<sub>2</sub> y comúnmente dan lugar a enfermedades como miopatías y las neuropatías, así como a desórdenes metabólicos (2).

Este trabajo se centra en profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a enfermedades asociadas al mal funcionamiento de la respiración mitocondrial como consecuencia de mutaciones en la subunidad A del complejo II (*SDHA*).



**Figura 1: Representación de los complejos de la cadena respiratoria. Imagen de Rossignol R, 2020 (2)**

El complejo II o complejo de la succinato deshidrogenasa (SDH) está formado por cuatro subunidades (SDHA, SDHB, SDHC y SDHD). Interviene en el ciclo de Krebs y en la

cadena respiratoria. En el ciclo de Krebs, cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato, lo que da lugar a la generación de FADH<sub>2</sub>. En la cadena respiratoria, cataliza la reducción de la ubiquinona a ubiquinol con la transferencia de electrones procedentes del FADH<sub>2</sub>.

Estructuralmente se distinguen dos partes en el complejo II, una porción hidrofóbica y una hidrofílica. La porción hidrofóbica está formada por las subunidades C y D y se encuentra embebida en la membrana mitocondrial interna. La porción hidrofílica, formada por las subunidades A y B, protruye hacia la matriz mitocondrial. Las subunidades C (15 kD) y D (12,5 kD) ayudan a estabilizar la unión a la membrana de la subunidad B (30 kD) y junto con esta última permiten la unión con la ubiquinona (6). La subunidad A (70kD) contiene una molécula de FAD unida covalentemente y el sitio de unión al succinato, mientras que la subunidad B contiene los centros Fe-S responsables del transporte de electrones a la ubiquinona (7).

Debido a que todas las subunidades del complejo II son codificadas por genes nucleares, estas contienen una secuencia de localización mitocondrial que permite su transporte a este orgánulo, donde se va a producir su ensamblaje por medio de diversos factores como SDHAF1-4 (7,8). Un paso imprescindible para la función catalítica del complejo es la unión covalente de la subunidad A a una molécula de FAD mediante un residuo de histidina. La ausencia de este residuo genera una subunidad que, si bien se ensambla y se une FAD no covalentemente en la mitocondria, es incapaz de oxidar el succinato (9). La unión covalente de SDHA a FAD requiere del factor SDHAF2, así como de la interacción con varios ligandos como succinato, oxalacetato o malato (10). Además, el ensamblaje de todo el complejo está condicionado por la correcta expresión y ensamblaje de cada una de sus subunidades. Así, la mutación c.1765C>T en *SDHA* que vuelve a la proteína más inestable al generar un cambio de residuo de Arg a Trp en la posición 589, está asociada también a una pérdida de expresión en *SDHB* en paragangliomas, aunque el gen *SDHB* es normal (11), lo mismo ocurre en ciertos tumores del estroma gastrointestinal (12). Además, en modelos celulares la expresión de *SDHB* y *C* se reduce al disminuir la expresión de *SDHA*, mientras que la expresión de la subunidad *A* no varía al manipular la expresión de las otras subunidades (13). La pérdida de expresión de *SDHB* al inhibir la subunidad *A* también se ve en modelos de levadura con sus respectivos ortólogos, *sdh2* y *sdh1* (14). En este mismo trabajo los autores observaron que al inhibir el factor de ensamblaje *sdha5* (*SDHAF2*) se perdía la formación del complejo II y disminuía la expresión de todas sus subunidades debido a su inestabilidad, aunque en el caso de la subunidad *A* esta reducción era menor, posiblemente por la existencia de una fracción soluble (13,14). En otra muestra de pacientes con paragangliomas, la expresión de *SDHB* era indetectable mediante inmunohistoquímica en todas las muestras de pacientes con mutaciones en *SDHB*, *C* o *D*, mientras que *SDHB* estaba presente en tumores con alteraciones genéticas en genes distintos de la *SDH* (15).

El complejo II había sido considerado clásicamente como una ruta alternativa de entrada de electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC), sin relación estructural con los demás complejos, ya que a diferencia de estos, no forman estructuras supramoleculares (16). Sin embargo, varios trabajos apuntan a que existe una relación entre la expresión de subunidades del complejo II y otros complejos de la cadena respiratoria, especialmente el I. En células renales de origen murino la pérdida de *SDHB* generaba una disminución de la función respiratoria mitocondrial y disminución de la expresión y actividad catalítica del complejo I (17). Además, estas células mostraban un aumento del metabolismo glucolítico, conforme con lo observado en paragangliomas y

feocromocitomas (18) y en una línea celular de carcinoma renal humano con una mutación en *SDHB* que afecta dramáticamente a su unión con los centros Fe-S y a sus niveles de expresión (19). Las muestras de paragangliomas y feocromocitomas con mutaciones en *SDHB* también presentan disminución en la expresión de los complejos III y IV (18), aunque esto no se ha observado en una línea celular de cáncer de mama deficiente en *SDHB* (13). La pérdida de la capacidad respiratoria mitocondrial no puede achacarse únicamente a la pérdida de función catalítica del complejo II, ya que esta no es requerida para el transporte de electrones que entran en forma de NADH por el complejo I. En línea con este concepto, la inhibición farmacológica de la función del *SDHB* o *SDHA*, al contrario que su manipulación genética, no altera significativamente la respiración mitocondrial ni la fosforilación oxidativa (20).

Desde hace varias décadas se conoce que defectos en el funcionamiento del complejo II son causa de varias enfermedades y síndromes muy infrecuentes que cursan con diversos signos y síntomas, siendo frecuentes las alteraciones neurológicas y musculares (21–24). Desde la primera vez que se asoció un mutación en un gen nuclear, concretamente en *SDHA*, con una deficiencia en la función de la cadena respiratoria (24), varias mutaciones en este gen han sido descritas en pacientes con diversas afectaciones (20,25–27) como síndrome de Leigh, leucodistrofia, miopatías incluyendo cardiomiopatías...etc. Por otro lado, también se han identificado varias mutaciones de *SDHA* que se asocian a cánceres como tumores del estroma gastrointestinal, paragangliomas y feocromocitomas (tabla 1).

**Tabla 1: Lista de varias mutaciones descritas en *SDHA* junto con las condiciones a las que se asocia. GIST: tumores de estroma gastrointestinal, PCC: feocromocitomas, PGL: paragangliomas**

Mutación	Condición asociada	Referencia
91C>T/R31x	Varios tipos de cáncer	(28)
565T>G/C189G	Síndrome de Leigh	(29)
818C>T/T273I	GIST	(30)
1351C>T/R451C	Enfermedad neurodegenerativa	(23,31)
1523C>T/T508I	Leucodistrofia	(26)
1526C>T/S509L		
1660C>T/R554W	Síndrome de Leigh	(24)
1664G>A/G555E	Cardiomiopatía	(32)
1765C>T/R589W	GIST, PCC, PGL	(11,33)

De forma general, las mutaciones asociadas a cáncer parecen generar, o bien una proteína truncada por aparición de un codón de STOP prematuro como en el caso de c.91C>T, o bien una disminución de la expresión de *SDHA* (11,30). En ambos casos, esto genera una pérdida de la expresión de *SDHB*, un evento ampliamente documentado en estos tipos de cánceres, junto con otros cambios en la expresión de subunidades de complejo I, III o IV (17,18). Por ello, es posible que la relación entre los distintos tipos de mutaciones y las distintas consecuencias a nivel patológico, sean debidas al menos en parte a la expresión de otras subunidades del complejo II o incluso de otros complejos de la cadena respiratoria. El estudio de estas interacciones puede ayudar a comprender los mecanismos moleculares que llevan a la aparición de estas enfermedades.

## Objetivos

Este trabajo pretende generar un modelo celular humano para el estudio de mutaciones en *SDHA* y explorar los mecanismos que las relacionan con diferentes enfermedades. Para ello se establecieron tres objetivos específicos:

1. Generar una línea celular estable *SDHA*<sup>-/-</sup>. Esta línea celular puede ser usada en estudios funcionales de respiración mitocondrial, análisis de expresión de otras subunidades de SDH o de otros complejos de la ETC, entre otros experimentos.
2. Sintetizar un plásmido de rescate con la secuencia codificante de *SDHA* normal (WT) para la realización de ensayos de rescate y confirmar que el fenotipo observado se debe a la ausencia de *SDHA*.
3. Generar dos plásmidos de *SDHA* con las mutaciones c.1351C>T y c.1765C>T para la caracterización funcional de estas dos mutaciones, asociadas a enfermedad neurodegenerativa y cáncer, respectivamente.

Aunque el trabajo se centra en la generación del modelo, los resultados exploratorios se espera que validen los resultados observados en la literatura. Así, es previsible que el ensayo de rescate con el plásmido con la mutación c.1351C>T lleve a la recuperación de la expresión de *SDHA*, *SDHB* y complejo I (de manera similar al rescate con el plásmido de *SDHA* WT), al contrario que el plásmido con c.1765C>T.

## Materiales y métodos

### 1) Materiales

#### 1.1) Línea celular

Se usó una línea celular de osteosarcoma primario humano, U2OS (ATCC: HTB-96). Son células adherentes, con morfología epitelial y muy usadas en investigación biomédica al ser una de las primeras líneas celulares disponibles y comúnmente empleadas en estudios sobre función mitocondrial.

#### 1.2) Cepa bacteriana

Se usaron bacterias competentes *E. coli* DH10 $\beta$  para la clonación y amplificación de plásmidos (Thermo Fisher Scientific)

#### 1.3) Plásmidos

*pEGFP-N1*: plásmido de expresión en mamíferos (*Addgene* #6085-1; Clontech). Contiene un casete de resistencia a la kanamicina y la secuencia codificante de pEGFP con un promotor de CMV. Tiene una longitud de 4733 pb.

*Px333 Cas9 puro*, derivado del plásmido *Px333 Addgene* #64073 que fue modificado por la clonación del casete de resistencia a la puromicina en el laboratorio de los directores de este trabajo. *pX333* fue donado por Andrea Ventura (*Addgene* plasmid # 64073; <http://n2t.net/addgene:64073> ; RRID:*Addgene\_64073*)(34).

#### 1.4) Reactivos

##### 1.4.1) Medios de cultivo

*Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomina, 2mM L-Glutamina, 1%



de solución de aminoácidos no esenciales, 1mM de solución de piruvato sódico. Este medio se denominó medio DMEM completo de ahora en adelante y se usa para el cultivo de las líneas celulares. El medio y los suplementos se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific

*Medio Lysogeny Broth (LB)* o Caldo de Lisogenia que se usa para el crecimiento de bacterias. Se obtuvo de Thermo Fisher Scientific.

#### **1.4.2) Proteínas recombinantes**

*Cas9 v2 TrueCut™* (Thermo Fisher Scientific)

*DNA polimerasa Phusion™ hot start II high-fidelity DNA Polymerase y Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific)

Enzimas de restricción *EcoRV, BamHI, y AflIII* (Thermo Fisher Scientific).

Fosfatasa alcalina *FastAP* (Thermo Fisher Scientific) Para la desfosforilación de vectores y evitar la autoligación de estos.

Enzima Polinucleótido Quinasa T4 (*Polynucleotide Kinase, PNK*) (Thermo Fisher Scientific) para la fosforilación de los extremos 5' de los oligonucleótidos de la mutagénesis.

*T4 DNA ligasa* (Thermo Fisher Scientific).

#### **1.4.3) Tampones y soluciones**

*TRIzol* (Thermo Fisher Scientific), para la extracción del RNA de las células U2OS.

*Tampón de extracción de DNA* (1 ml): 1 ml de tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, SDS 0,5%) y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml)

*4x SDS Sample Buffer* (50 ml): 10 ml de Tris-HCl 1M pH6,8; 4 gr de SDS; 20 ml de glicerol; 5 ml de 4M DTT, completar con ddH<sub>2</sub>O.

*Tampón de transferencia* (1L): 3,03 g de Trizma base, 14,4 g de Glicina, 100 ml de MetOH en ddH<sub>2</sub>O. En el caso de la membrana para analizar la expresión de los complejos de la fosforilación oxidativa se usó una concentración de MetOH del 20% (200 ml de MetOH).

*Running Buffer* (1L): 3 g de Trizma base, 14,4 g de Glicina y 1 g de SDS en ddH<sub>2</sub>O.

*TTBS* (1L): 2,41 g de Trizma base, 8 g de NaCl, 1,45 ml de HCl 12M, 1 ml de Tween 20, en ddH<sub>2</sub>O.

*RIPA* (50 ml): 1,5 ml de NaCl 5M; 0,1 ml de EDTA 0,5M; 1 ml de Tris-HCl pH7,1M; 0,5 ml de SDS; 0,5 g de desoxicolato de sodio; 2,5 ml de NP-40 al 20%, en ddH<sub>2</sub>O.

*Inhibidores de proteasas* (Thermo Fisher Scientific).

*TE* (100 ml): 1 ml de Tris-HCl 1M pH8, 0,2 ml de EDTA 0,5M en ddH<sub>2</sub>O.

*Western Blotting Luminol Reagent* (ImmunoCruz™).

#### **1.4.4) Kits comerciales**

*GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific)

*RT-PCR kit First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) que contiene la transcriptasa reversa M-MuLV para la síntesis del cDNA de SDHA

*Neon™ Transfection System Kit* de 100 µl (Thermo Fisher Scientific) para la transfección de los complejos Cas9/gRNA.

*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit* (Promega) para la purificación de bandas de gel o productos de PCR

*PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep/Midiprep Kit* – (Thermo Fisher Scientific)

*ThermoScientific Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit* (Thermo Fisher Scientific)

*Bradford Assay Reagent* (Thermo Fisher Scientific)

#### 1.4.5) Anticuerpos

Anticuerpo	Compañía	Número de Catálogo
Anticuerpo monoclonal de conejo anti-SDHA	Cell Signalling Technology	#11998
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-β - Actina marcado con peroxidasa	Sigma-Aldrich	#3864
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-SDHB	Thermo Fisher Scientific	#459230
Cocktail de Anticuerpos de roedor anti-OXPHOS	Thermo Fisher Scientific	#45-8099
Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa	Thermo Fisher Scientific	#31461
Anticuerpo secundario de oveja anti-ratón marcado con peroxidasa	Cytiva	#NA9310V

#### 1.4.6) Equipos

*NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific)

#### 1.4.7) Otros

*Kanamicina*: antibiótico utilizado como marcador de selección de las bacterias transformadas con el plásmido pEGFP-N1.

*Puromicina*: antibiótico usado como marcador de selección de las células transfectadas con los plásmidos pSDHA WT, tanto WT como los dos mutantes generados.

## 2) Métodos

### 2.1) Diseño y generación de U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup>

Se utilizó la línea celular U2OS para eliminar el gen *SDHA* mediante el uso de complejos gRNA/Cas9, para realizar dos cortes separados por unas 2200 pb, entre el final del intrón 1 (In1) y el exón 4 (E4) del *SDHA*. Las guías se sintetizaron mediante un sistema de transcripción *in vitro* usando el kit *GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit* con los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 2

Tabla 2: Oligonucleótidos usados para la transcripción *in vitro* de las gRNA In1 y E4. El color azul representa la porción del promotor de la T7, el verde la región constante y el rojo la secuencia diana.

<b>gRNA I1:</b>
<b>IVT gRNA SDHA In1 SEN</b> 5' TAATACGACTCACTATAGAACCTGAAGGCAGCCCAAG 3'
<b>IVT gRNA SDHA In1 ATS</b> 5' TTCTAGCTCTAAACCTTGGGCTGCCTTCAGGGTT 3'
<b>gRNA E4:</b>
<b>IVT gRNA SDHA E4 SEN</b> 5' TAATACGACTCACTATAGGGCCTGCTCCGTCATGTAG 3'
<b>IVT gRNA SDHA E4 ATS</b> 5' TTCTAGCTCTAAACCTACATGACGGAGCAGGCC 3'

Los oligonucleótidos se resuspendieron en TE para lograr una concentración de 10 µM y posteriormente en agua libre de nucleasas, resultando en una concentración final de 0,3 µM. Para sintetizar el DNA molde se mezcló 1 µl de una mezcla de los oligonucleótidos sentido y antisentido con 1 µl de una mezcla de los oligonucleótidos de la T7 y del TracrNA, que contienen las regiones constantes de las guías, 10,5 µl de agua libre de nucleasas y 12,5 µl de Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2X). Las condiciones de la reacción fueron: 10 s a 98°C y 32 ciclos de: 5 s a 98°C y 15 s a 55°C, finalizando con 1 min a 72°C. Esta reacción se realizó en un total de dos ocasiones debido al tamaño reducido de la secuencia a sintetizar.

Una vez sintetizado el DNA molde se realizó la transcripción *in vitro* para sintetizar las guías de RNA. Para ello se mezclaron 2 µl de *TranscriptAid™ Enzyme Mix*, 4 µl de *TranscriptAid™ Reaction Buffer (5X)*, 8 µl de NTPs y 6 µl del DNA molde sintetizado anteriormente. La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C, posteriormente se añadió 1 µl de DNasa I (1U/ µl) durante 15 min para eliminar los restos de DNA. Por último, el resultado de la reacción se purificó a través del *gRNA Clean Up Kit*. Como resultado, se generaron dos guías con las secuencias que se muestran en la tabla 3. Las secuencias diana de las dos gRNA se encuentran a 2200 pb (figura 2).

Tabla 3: Secuencia de las gRNA utilizadas

<b>gRNA In1</b>
5' CTTGGGCTGCCTTCAGGGTT 3'
<b>gRNA E4</b>
5' CTACATGACGGAGCAGGCC 3'

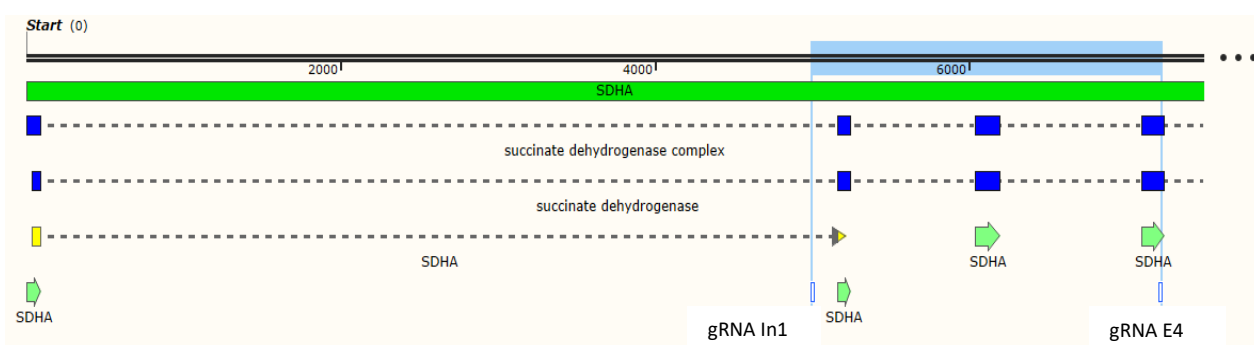


Figura 2: Representación del lugar de unión de las gRNA en el gen SDHA.

Una vez sintetizadas las guías se mezclaron 2 µg de cada gRNA, 1U (5mg/ml) de la nucleasa *Cas9 v2 TrueCut™* y 50 µl de tampón R del *Neon™ Transfection System Kit de 100 µl* y esto a su vez se mezcló con 70 µl de tampón R en el que se había resuspendido un *pellet* de 10<sup>6</sup> de células previamente despegadas. Se usó el electroporador *Neon Transfection System* según las indicaciones del comerciante. Después de la electroporación las células se sembraron en placas de 6 pocillos con 3 ml de medio y 3 días más tarde se hizo la dilución límite en placas de 96 pocillos. Se analizaron los pocillos al microscopio seleccionando aquellos en los que había crecido una sola colonia.

## 2.2) Análisis de los clones:

### 2.2.1) Extracción de DNA genómico

Se retiró el medio de los clones aislados en placas de 96 pocillos, se despegaron con 50 µl de tripsina diluida al 0,05%, e inactivada posteriormente con 100 µl de medio completo. Después de centrifugar y retirar el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió con 200 µl de tampón de lisis con proteinasa K a una concentración final de 200 µg/ml y se dejó incubar durante 1 h a 56°C. Posteriormente, se añadieron 20 µl de NaCl 5M, 600 µl de Etanol 100% y 2 µl de glucógeno de un stock a 20 mg/ml. Después de incubar a -20°C durante una hora para favorecer la precipitación del DNA se centrifugaron los microtubos durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* resultante se lavó con 500 µl de Etanol 70% y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderlo en 40 µl de TE.

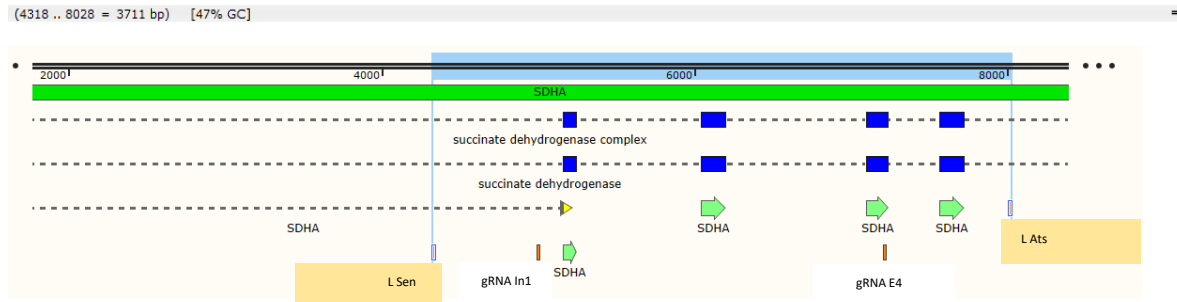
### 2.2.2) PCR

Los clones se analizaron por PCR para comprobar si se había producido una delección entre los dos puntos de corte de la Cas9. Para ello, se usaron dos parejas de oligonucleótidos que hibridan por fuera de la zona de unión de las guías (tabla 4, figura 3)

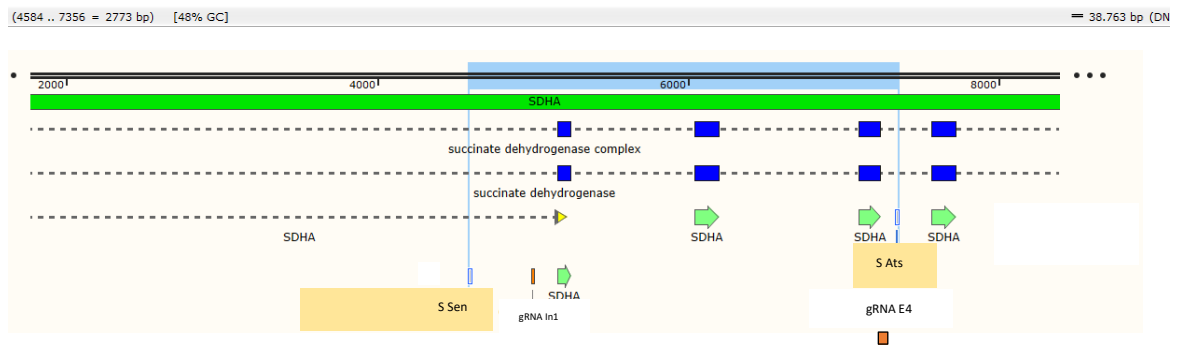
**Tabla 4: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de los clones de U2OS**

<b>PCR1:</b>
<b>S Sen</b> 5´ GAGTGTGCATCCGACATCCTC 3´
<b>S Ats</b> 5´ CCTCTTGTTCCCATCAACAGTGAAG 3´
<b>PCR2:</b>
<b>L Sen</b> 5´ AATGCGGCCGCCCCTAAACTATTCTTGATGAT 3´
<b>L Ats</b> 5´ AATGCGGCCGCTTGCTCTGCTCTTGATGTTG 3´

a)



b)



**Figura 3: Representación de la zona de hibridación de los oligonucleótidos usados para el análisis de los clones.**

La reacción se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l, usando 10  $\mu$ l de *HF Phusion buffer* 5x, 1  $\mu$ l de dNTPs, 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido, 4  $\mu$ l de DNA y 0,3  $\mu$ l de la polimerasa *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Hot Start* (2 U/ $\mu$ L) completando con agua. Las condiciones de la reacción fueron: 1 min 30 s a 98°C y 40 ciclos de: 10 s a 98°C, 15 s a 62°C y 1 min a 70°C, finalizando con 5 min a 72°C. El producto de la PCR se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, los fragmentos amplificados con la primera pareja de oligonucleótidos tenían un tamaño esperado de 500 pb en el caso de las células KO y de 2700 pb en el caso de la línea parental, mientras que con la segunda pareja de oligonucleótidos el tamaño era de 1500 y 3700 pb para los KO y la parental respectivamente.

### 2.2.3) Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de células sembradas en placas de 24 pocillos. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con 200  $\mu$ l de PBS y se despegaron con 200  $\mu$ l de tripsina al 0,05% inactivada posteriormente con 400  $\mu$ l de medio completo. Después de centrifugar y retirar el sobrenadante, el *pellet* se lavó con PBS y se resuspendió en 50  $\mu$ l de RIPA con inhibidores de proteasas (1:1000) incubando en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron los lisados 15 min a 4°C y se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas.

#### **2.2.4) Western blot**

Las proteínas extraídas anteriormente fueron cuantificadas mediante el método de Bradford para estandarizar la cantidad de proteína usada para el Western blot en 20 µg. Posteriormente, se mezclaron con el tampón de carga 4x en proporción 3:1 (lisado: buffer de carga) y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, y se cortaron las membranas para incubar cada anticuerpo en la zona de la membrana correspondiente según los marcadores de peso molecular. Las membranas se bloquearon durante una hora con leche desnatada al 5% en TTBS y se incubaron con anticuerpo primario anti-SDHA a una dilución 1:1000 en BSA al 5% en TTBS durante la noche. Después de los lavados se incubó cada porción de la membrana correspondiente con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa a una dilución 1:3000 en leche al 3% en TTBS y anticuerpo anti-actina 1:20000 en leche al 3% en TTBS

### **2.3) Generación del plásmido de rescate SDHA-WT**

#### **2.3.1) Obtención del inserto de SDHA**

##### **Extracción de RNA de U2OS**

En primer lugar, se realizó la extracción de RNA con el reactivo de TRIzol de las células U2OS parentales sembradas en placas de 24 pocillos. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se despegaron con 200 µl de tripsina 0,05% inactivada posteriormente con 400 µl de medio. Después de centrifugar y retirar el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió con 300 µl de TRIzol incubando después durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 60 µl de cloroformo, incubando 3 min a RT después de agitar y se centrifugó a máximas revoluciones durante 15 min a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se añadieron 3 µl de glucógeno a 2 µg/µl, seguido de 150 µl de isopropanol. Después de mezclar e incubar durante 10 min se realizó una segunda centrifugación de 10 min. El *pellet* resultante se lavó con etanol 70% y se volvió a centrifugar durante 5 min, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se dejó secar el *pellet*. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 20 µl de agua libre de RNasa y se incubó 10 min a 60°C.

##### **Síntesis de cDNA**

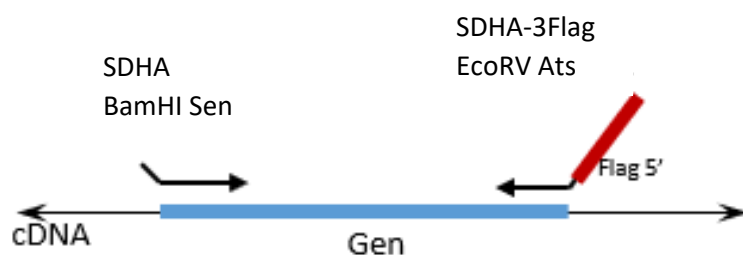
A partir del RNA extraído previamente se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* usando 1,2 µg de RNA diluidos en un volumen final de 10 µl de TE y se añadieron 1 µl de oligonucleótidos de secuencia aleatoria. Posteriormente se añadieron 4 µl de buffer 5x, 1 µl del inhibidor de RNasa RiboLock (20 U/µl), 2 µl de dNTPs 10mM y 2 µl de la transcriptasa inversa M-MuLV (20 U/µl). La reacción de transcripción inversa se inició a 25°C durante 5 min, seguido de 60 min a 37°C, acabando con 5 min a 70°C. El producto se conservó a -20°C.

Se amplificó la región codificante del *SDHA* a partir del cDNA sintetizado, introduciendo un punto de corte para la enzima de restricción BamHI en el extremo del oligonucleótido 5' y una secuencia 3Flag con un punto de corte para EcoRV en el extremo 3', como se muestra en la figura 4. Para ello se realizó una PCR con los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 5:

**Tabla 5: Oligonucleótidos usados para la síntesis mediante PCR del fragmento SDHA-3Flag. Se muestra en rojo la secuencia diana de las enzimas de restricción BamHI y EcoRV respectivamente, marcando con un espacio la zona de corte. La secuencia correspondiente a 3Flag se encuentra subrayada en el oligonucleótido número 2.**

<b>1) SDHA BamHI Sen</b>
5' ATTG <b>GATCC</b> GGCAACAGCAGACATGTC 3'
<b>2) SDHA-3Flag EcoRV Ats</b>
5' ATT <b>GAT ATC</b> ATGATCCTTATAATCTCCGTCGTGGTCCTTATAGTC <u>CGTAGGAGCG</u> AATGGCTGGC 3'

La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, usando 10 µl de buffer *HF Phusion* 5x, 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada oligonucleótido, 4 µl del cDNA molde y 0,3 µl de la polimerasa *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µL) completando con agua. Las condiciones de la reacción fueron: 10 s a 98°C y 40 ciclos de: 10 s a 98°C, 15 s a 62,5°C y 1 min a 70°C, finalizando con 5 min a 72°C. El producto de la PCR se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura 4: Esquema del proceso de obtención del inserto de SDHA-3Flag mediante PCR**

Posteriormente se purificó por columna el producto de la PCR mediante el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* se cuantificó usando *NanoDrop ND-1000* y se realizó la digestión con BamHI y EcoRV (10U/µl) proporción 1:2, usando el tampón *Tango* (20%  $V_i$ ) y añadiendo 3 µg de DNA de la PCR. Se incubó durante 2 h a 37°C.

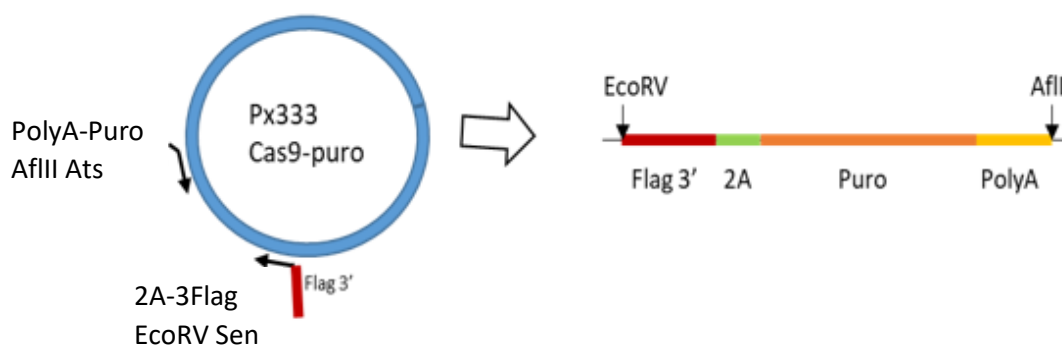
### **2.3.2) Obtención del inserto de resistencia a puromicina**

A partir del plásmido Px333 Cas9-puro, obtenido a partir del plásmido comercial Px333 se sintetizó un inserto que contiene un gen que confiere resistencia a la puromicina, una porción del 3Flag con un sitio de corte para EcoRV, para ligar en ese punto con el inserto del *SDHA* creado anteriormente y un sitio de corte para AflII después de la señal de poliadenilación de bGH como se muestra en la figura 5. Para ello se realizó una PCR con los oligonucleótidos mostrados en la tabla 6:

**Tabla 6: Oligonucleótidos usados para la síntesis mediante PCR del fragmento 3Flag-2A-PuroPolyA. Se muestra en rojo la secuencia diana de las enzimas de restricción EcoRV y AflIII respectivamente, marcando con un espacio la zona de corte. La secuencia correspondiente a 3Flag se encuentra subrayada en el oligonucleótido número 1.**

<b>1) 2A-3Flag EcoRV Sen</b>
5' ATT <u>GAT ATC</u> GATTACAAAGACGATGACGATGGCAGTGGAGAGGGGCAGAG 3'
<b>2) PolyA-Puro AflIII Ats</b>
5' ATTC TTAAG TTCCTGCGGCCGCTCCCC 3'

La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, usando 10 µl de *HF Phusion buffer* 5x, 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada oligonucleótido, 4 µl del cDNA molde y 0,3 µl de la polimerasa *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2U/µL) (completando con agua. Las condiciones de la reacción fueron: 10 s a 98°C y 40 ciclos de: 10 s a 98°C, 15 s a 62°C y 1 min a 72°C, finalizando con 5 min a 72°C. El producto de la PCR se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura 5: Esquema del proceso de obtención del inserto de 3Flag-2A-Puro-PolyA a través de PCR sobre el plásmido Px333 Cas9-Puro**

Posteriormente se purificó por columna el producto de la PCR mediante el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, se cuantificó usando *NanoDrop ND-1000* y se realizó la digestión de 3 µg del DNA producto de la PCR con las enzimas AflIII y EcoRV (10U/µl), en proporción 1:2, usando el tampón *O* (10%  $V_f$ ) y añadiendo 3µg de DNA de la PCR. Se incubó durante 2 horas a 37°C.

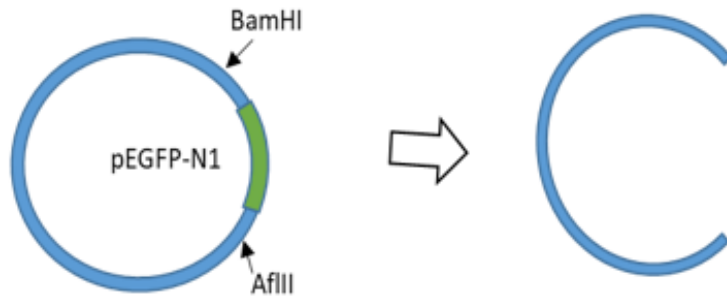
### 2.3.3) Digestión del plásmido donante

Se usó el plásmido pEGFP-N1, con resistencia a la kanamicina, para introducir los insertos creados. El plásmido se linearizó usando las enzimas de restricción BamHI y AflIII (10U/µl) (figura 6), en proporción 1:1, usando el tampón *Tango* (20%  $V_f$ ) y añadiendo 3µg de DNA de la PCR. Se incubó durante 2 horas a 37°C.

Una vez acabada la digestión se añadieron 2 µl de fosfatasa alcalina *Fast AP* (1U/µl) para evitar la auto-ligación del plásmido y se dejó incubando durante 30min más. El



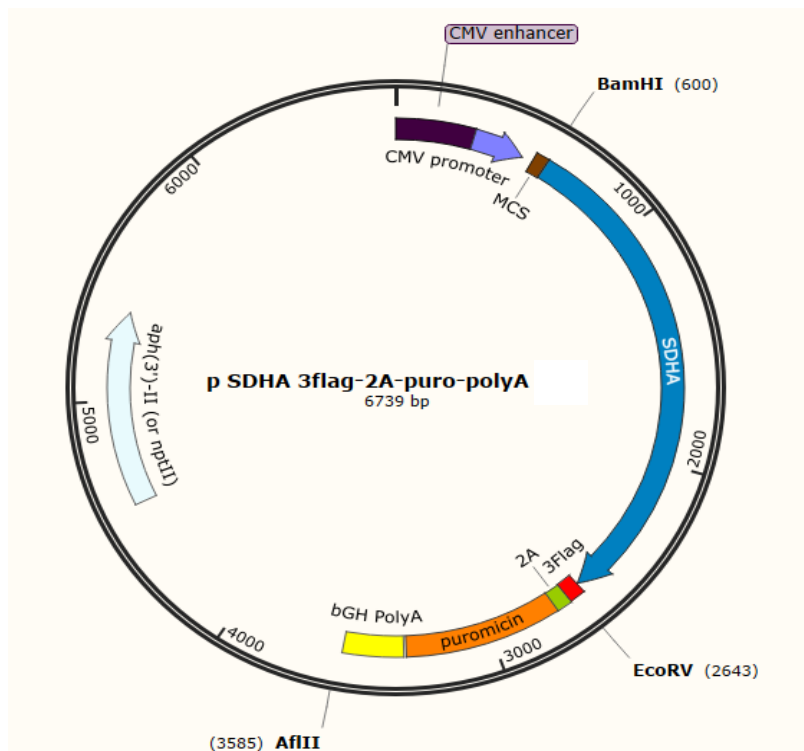
producto de la digestión se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recortó la banda correspondiente al plásmido digerido (3700 pb). La banda se purificó usando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* y se cuantificó usando *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific).



**Figura 6: Esquema del proceso de obtención del plásmido donante a través de digestión enzimática del plásmido pEGFP-N1**

### 2.3.4) Síntesis del plásmido pSDHA WT

Se utilizaron los insertos anteriormente sintetizados para realizar una ligación con el vector digerido previamente. Se usaron 1,5 µl de *T4 DNA Ligase* (1U/µl), 10 µl de *T4 DNA Ligase buffer 5x*, 40 ng del plásmido vector y los insertos en proporción molar vector/inserto 3:1 y se dejó a temperatura ambiente durante 30min. De la misma forma se preparó una reacción equivalente en ausencia de los insertos como control negativo. Posteriormente se transformaron 50 µl de bacterias competentes DH10β con todo el volumen de la reacción de ligación mediante un shock térmico de 43°C durante 45 s. Las bacterias se dejaron en el medio de cultivo para bacterias LB a 37°C en agitación y se sembraron en placas de kanamicina (30 µg/ml) para seleccionar las transformadas. El plásmido resultante se muestra en la figura 7.



**Figura 7: Representación del plásmido pSDHA WT**

### 2.3.5) Purificación del plásmido a pequeña escala y comprobación de la ligación

Las colonias resultantes se picaron y se cultivaron en 3 ml de LB líquido con 3 µl de kanamicina de un stock a 50 mg/ml durante 16 h a 37°C y con agitación. Después, se tomó 1 ml del LB, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de tampón P1 con RNasa. Posteriormente se añadieron otros 100 µl de tampón de lisis P2 y tras 4min se detuvo la reacción con el tampón P3. Después de centrifugar y conservar el sobrenadante donde se encuentra el DNA plasmídico, este se precipitó mediante 1 ml de etanol 100%, se centrifugó y se lavó el *pellet* con etanol 70%, por último, se resuspendió en TE.

Para comprobar el éxito de la ligación se realizaron dos digestiones del plásmido resultante con las enzimas EcoRV y BamHI y BamHI y AflII, con las condiciones descritas anteriormente. El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, obteniendo bandas de ≈ 2000 y 3000 pb respectivamente, comprobando así que se introdujeron los dos insertos.

### 2.3.6) Purificación del plásmido a gran escala

Una vez comprobado el éxito de la ligación y de la transformación bacteriana, las bacterias se cultivaron en 75 ml de LB líquido con 75 µl de kanamicina (50 mg/ml) durante 16 h como anteriormente. A continuación, se usó el kit *PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit* según las indicaciones del fabricante para la extracción del plásmido a gran escala. El plásmido se secuenció por el método de secuenciación de Sanger en la empresa de genómica Macrogen Spain (Madrid).

## 2.4) Mutagénesis del pSDHA WT

Una vez secuenciado el plásmido Wt se usó el protocolo de *ThermoScientific Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit* para introducir, en el inserto del *SDHA*, las mutaciones c.1351C>T (R451C) y c.1765C>T (R589W). El protocolo comienza con una PCR que amplifica el plásmido parental (pSDHA WT) introduciendo la mutación deseada. Para ello se usan dos oligonucleótidos contiguos, uno de ellos es complementario a la secuencia original mientras que el otro introduce la mutación (tabla 7)

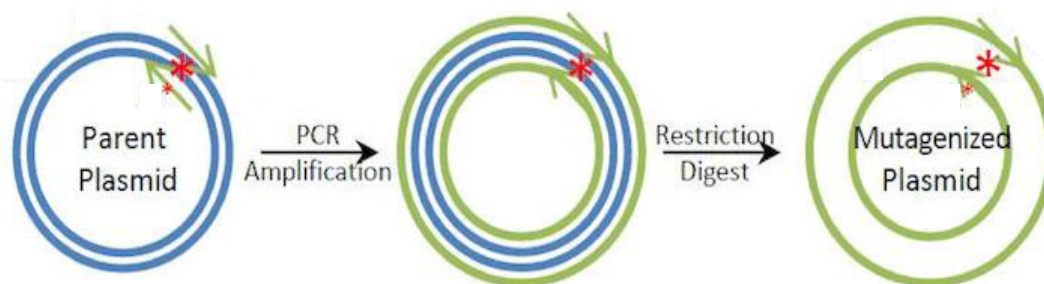
**Tabla 7: Oligonucleótidos usados para el protocolo de mutagénesis dirigida mediante PCR. En rojo se encuentra marcada la base a modificar de la secuencia original.**

<b>SDHA 1351C&gt;T ATS</b>
5' AGGCAGTTGGCACCATGTACCGAGG 3'
<b>SDHA 1351C&gt;T SEN</b>
5' CGGGGCAAACCTCGCTCTTGGA 3'
<b>SDHA 1765C&gt;T ATS</b>
5' CCCATGACTCCTTCCGTGCCTCTG 3'
<b>SDHA 1765C&gt;T SEN</b>
5' GCGCGCATGCCAGGGAAGACT 3'

De esta manera, se sintetizó la secuencia con la mutación de forma lineal. Estos oligonucleótidos se fosforilaron previamente siguiendo el protocolo del kit para poder realizar posteriormente la ligación.

La PCR se preparó usando 30 ng del plásmido parental, 10  $\mu$ l de *GC Buffer 5x*, 3  $\mu$ l de dNTPs, 5  $\mu$ l de la mezcla de los dos oligonucleótidos previamente fosforilados, 1,5  $\mu$ l de *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ l de DMSO para un volumen total de 50  $\mu$ l.

Las condiciones de la reacción fueron: 15 s a 98°C y 30 ciclos de: 10 s a 98°C, 30 s a 68°C y 3 min 30 s a 72°C, finalizando con 5 min a 72°C. El producto de la PCR se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de 10  $\mu$ l del producto de la reacción, para comprobar la síntesis de la secuencia lineal.



**Figura 8:** Esquema que representa el proceso de mutagénesis mediante PCR. Imagen modificada de Addgene Blog (35)

Para eliminar el plásmido parental se usó la enzima *DpnI* (Thermo Fisher Scientific), que digiere solamente los plásmidos sintetizados por bacterias debido a sus patrones de metilación, añadiendo 1  $\mu$ l al producto de la PCR. A continuación, se realizó la ligación a partir de 5  $\mu$ l del producto de PCR digerido, usando 1,5  $\mu$ l de *T4 DNA Ligase* para un volumen final de 10  $\mu$ l y se realizó la transformación y purificación del plásmido como está descrito anteriormente. El plásmido se secuenció en Macrogen Spain (Madrid).

## 2.5) Transfección con pSDHA WT, pSDHA 1351 C>T y pSDHA 1765 C>T

Se sembraron células U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup> en placa de 24 pocillos en medio completo 24 horas antes de la transfección. Se usó *Turbofect Transfection Reagent* según el protocolo comercial para células adherentes. Se mezclaron 3  $\mu$ l del reactivo con 100  $\mu$ l de medio *Optimem* sin suero y 1,5  $\mu$ g de los plásmidos pSDHA WT, pSDHA 1351 C>T y pSDHA 1765 C>T, en condiciones separadas. Después de mezclar e incubar 15 min se añadió la mezcla a los pocillos correspondientes y las células se incubaron para posteriormente analizar la expresión de proteínas por Western Blot. En el día 2 después de la transfección se reemplazó el medio con medio con puomicina a 1 ng/ml para seleccionar las células transfectadas y se sembraron en placas de 6 pocillos. El día 5 se cambió de nuevo a medio sin puomicina. Las células se despegaron el día 12 para la extracción de proteínas.

### 2.5.1) Western blot

Se siguió el protocolo explicado anteriormente para la extracción, separación y transferencia de proteínas a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con anticuerpo anti-SDHA y anti-actina al igual que en la verificación de los clones KO.

Además, se incubó con anticuerpos anti-SDHB en dilución 1:500 en leche al 3 % en TTBS y anticuerpos antiOXPHOS. En el caso del gel usada para la membrana con el anticuerpo antiOXPHOS se usó un gel al 12,5% de acrilamida debido al menor tamaño de las proteínas buscadas. La membrana con el anticuerpo antiOXPHOS y la porción de la membrana con el anticuerpo anti-SDHB se incubaron durante una hora con anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa.

## Resultados

### 1) Generación de la línea celular *SDHA*<sup>-/-</sup>

Existen en la literatura muy pocos trabajos con knockouts o knockdowns de *SDHA* en modelos celulares humanos, en comparación con *SDHB*. Generar una línea estable *U2OS SDHA*<sup>-/-</sup> permite estudiar aspectos relevantes de la interacción de esta subunidad con las otras subunidades del complejo II y con los demás complejos de la ETC, principalmente. Además, es la base sobre la que expresar diversas mutaciones en este gen para su posterior caracterización funcional y así comprender la patogénesis de las enfermedades asociadas a estas. Se usó la endonucleasa Cas9, formando complejos con las gRNAln1 y E4 para generar dos cortes en la secuencia genómica de *SDHA*, con la idea de inducir una delección entre los dos puntos de corte que lleve a la inactivación del gen. Varios días después de la transfección de los complejos, se analizaron los clones derivados de una única célula mediante PCR usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 4. Estos oligonucleótidos hibridan en los intrones 1 y 5 en el caso de la pareja L y en los intrones 1 y 4 en el caso de la pareja S (figura 3). Los fragmentos amplificados con la pareja de oligonucleótidos L y S tenían una longitud de a 3700 y 2700 pb respectivamente en la reacción control con DNA de células parentales (WT) y en el clon 32A, mientras que en los clones 25A, 27A y 40A se confirmó la delección en el gen de *SDHA* al visualizar un fragmento de 1500 y 500 pb con la pareja de oligonucleótidos L y S, respectivamente (figura 9). El clon 25A fue utilizado para realizar los experimentos que se exponen.

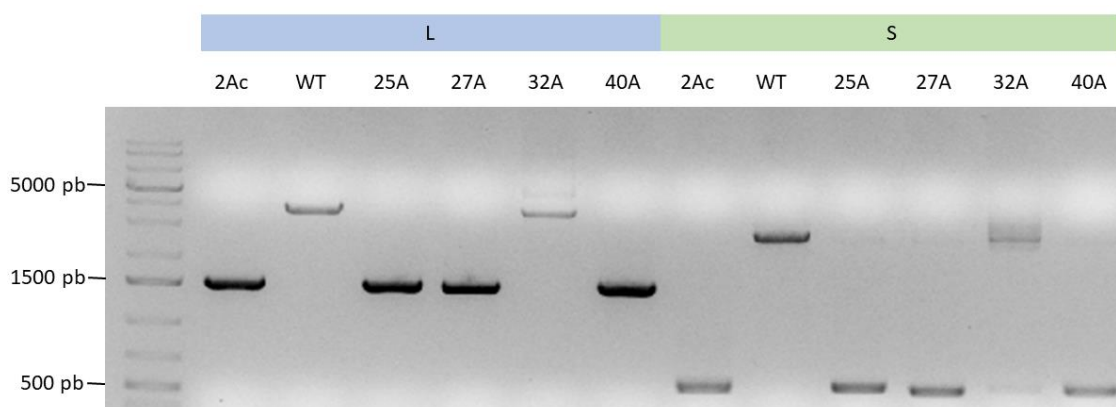
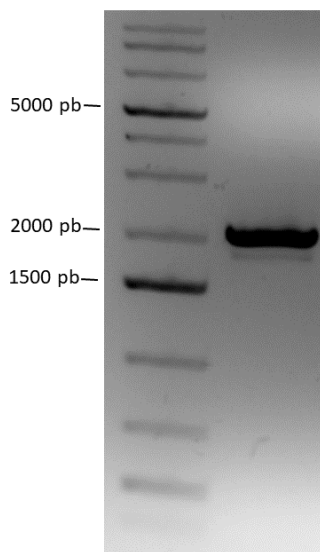


Figura 9: Resultados de la PCR para el análisis de los clones de U2OS

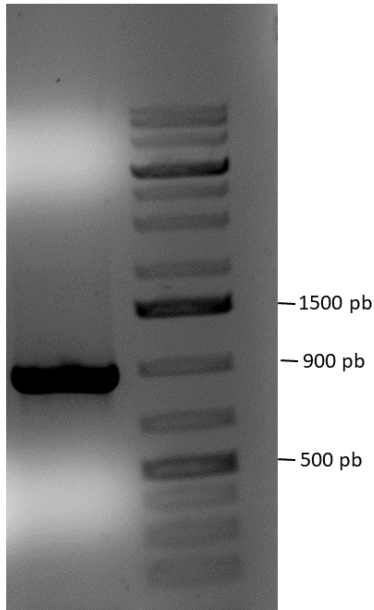
## 2) Generación del plásmido de rescate pSDHA-Flag WT

Una vez generada la línea celular *SDHA*<sup>-/-</sup>, se sintetizó un plásmido de rescate con la secuencia codificante de *SDHA*, para poder realizar la recuperación de la proteína y al mismo tiempo ser el molde para la generación de mutantes de interés. A partir del cDNA de *SDHA* previamente sintetizado, se realizó la PCR con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 4 para la síntesis del inserto *SDHA*-3Flag. Este fragmento contiene la región codificante del *SDHA* y parte de la secuencia de 3Flag. 3Flag es un péptido para el que se dispone de anticuerpos específicos con los que detectar la proteína lo que permite cuantificar la expresión sin usar anticuerpos anti-*SDHA* que podrían no funcionar en determinados mutantes. La secuencia resultante tiene un tamaño aproximado de 2000 pb como se muestra en la figura 10 tras correr en un gel de electroforesis de agarosa al 1%.



**Figura 10: Resultados de la PCR para la generación del fragmento *SDHA*-3Flag**

Siguiendo la estrategia representada en la Figura 4, se hizo una PCR sobre el plásmido Px-333 Cas9 puro con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 5 para sintetizar el fragmento 3Flag-2A-Puro-PolyA, que contiene una parte de la secuencia 3Flag, la secuencia para la resistencia a la puromicina y una señal de poliadenilación; además contiene el péptido de autoescisión 2A para permitir que el *SDHA* y la proteína de resistencia a la puromicina se sinteticen como proteínas independientes. La secuencia resultante tiene un tamaño aproximado de 900 pb como se muestra en la figura 11 tras correr en un gel de electroforesis de agarosa al 1%.



**Figura 11: Resultados de la PCR para la generación del fragmento 3Flag-2A-Puro-PolyA**

Una vez obtenidos los insertos y habiendo realizado la digestión enzimática del plásmido original pEFGP N1, se realizó la ligación para la síntesis del plásmido pSDHA WT. Después se comprobó el resultado de la ligación mediante digestión con BamHI y EcoRV, se transformaron bacterias DH10 $\beta$  y se cultivaron un total de 12 colonias. Tras la amplificación del plásmido a pequeña escala, el resultado se comprobó mediante digestión con las enzimas BamHI y EcoRV, obteniendo fragmentos a 5000 y 2000 pb aproximadamente, como se muestra en la figura 12. Las colonias 4,6,8 y 12 fueron positivas y se confirmaron por secuenciación Sanger. El plásmido de la colonia 6 fue utilizado para realizar la mutagénesis *in vitro* mediante PCR en el siguiente paso.



**Figura 12: Resultado de la digestión enzimática para la comprobación de la síntesis del plásmido pSDHA WT.**



### 3) Generación de los mutantes *SDHA* c.1351C>T y c.1765C>T

Después de sintetizar el plásmido con la secuencia de *SDHA*, se realizó un proceso de mutagénesis *in vitro* para la introducción de dos mutaciones asociadas a distintas enfermedades. La mutación c.1351C>T genera un cambio de un residuo arginina por un residuo de cisteína en la posición 451 de la secuencia de aminoácidos del *SDHA*. Este residuo está localizado muy cerca de la zona de unión a FAD y se ha descrito que el cambio de arginina a cisteína tiene un efecto negativo en la interacción de esta proteína con el oxalacetato, afectando al proceso de unión covalente al FAD (10,27). Como resultado, esta mutación se asocia a una disminución de la actividad del complejo II y múltiples defectos a nivel neurológico, cardíaco ocular o muscular, entre otros (27,31). Por otro lado, la mutación c.1765C>T genera un cambio de un residuo arginina por un residuo de triptófano en la posición 589 de la secuencia de aminoácidos del *SDHA*, sin afectar a la zona de unión al succinato o al FAD, pero generando una proteína más inestable (11). Esta mutación se ha asociado a tumores como paragangliomas (11). Una vez completado el proceso de mutagénesis dirigida y tras haber realizado la purificación a gran escala de los plásmidos resultantes, se comprobó mediante secuenciación Sanger, usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 6, que se había producido la mutación deseada (figura 13). En los casos en los que se había generado la mutación de interés, se realizó la secuenciación del *SDHA* completo para asegurarnos de que no se habían introducido otras mutaciones no deseadas.

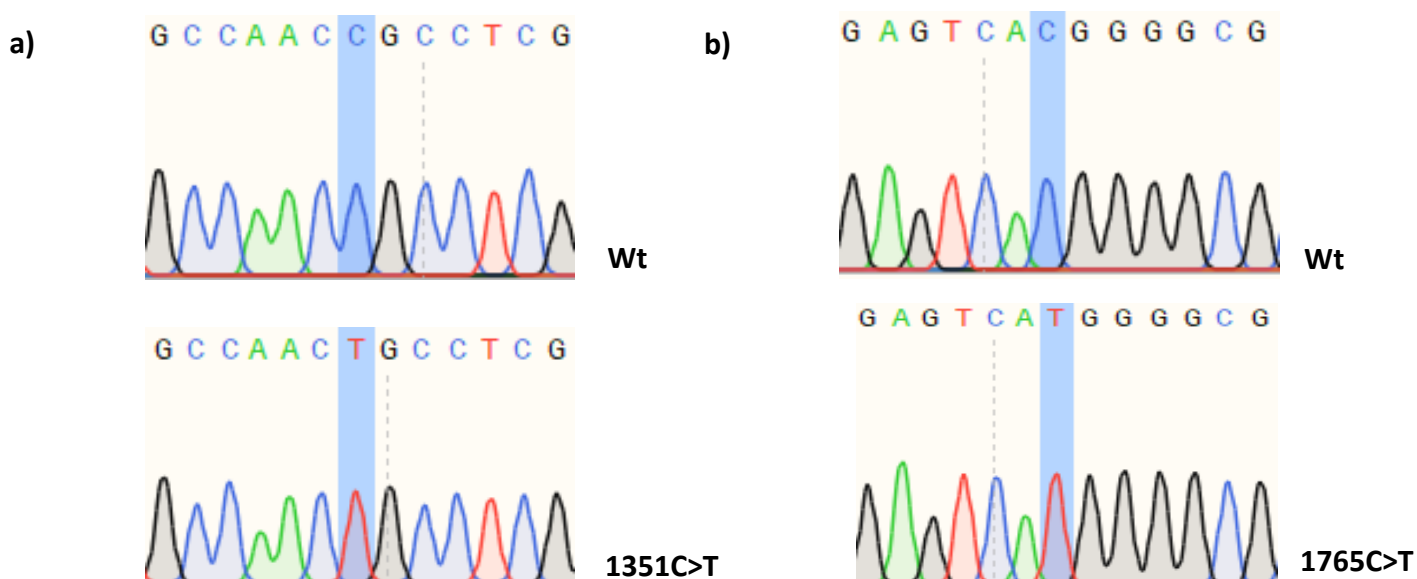


Figura 13: Resultados de la secuencia del plásmido pSDHA WT y 1351C>T (a) y pSDHA WT y 1765C>T (b)

#### 4) Ensayos de rescate con los plásmidos pSDHA WT, pSDHA 1351C>T y pSDHA 1765C>T.

En la Figura 14 panel a, se muestran dos clones en los que se confirmó la ausencia de expresión de SDHA, posteriormente fueron analizados y confirmados como KO por PCR. Estos clones también habían perdido la expresión de la subunidad B (SDHB) del complejo II, tal y como había sido descrito anteriormente (13,14). Uno de ellos, el 25A fue transfectado con los plásmidos pSDHA WT, pSDHA 1351C>T y pSDHA 1765C>T para estudiar la recuperación del fenotipo y las posibles diferencias de cada mutación respecto al gen sin alterar. La transfección se comprobó mediante un análisis de la recuperación de la expresión del SDHA (figura 14 paneles a y b). En la figura 14b se puede observar que, mientras que las células transfectadas con el plásmido WT y 1351C>T recuperaban la expresión del SDHB, esto no sucedía en el caso de las células transfectadas con el plásmido 1765C>T.

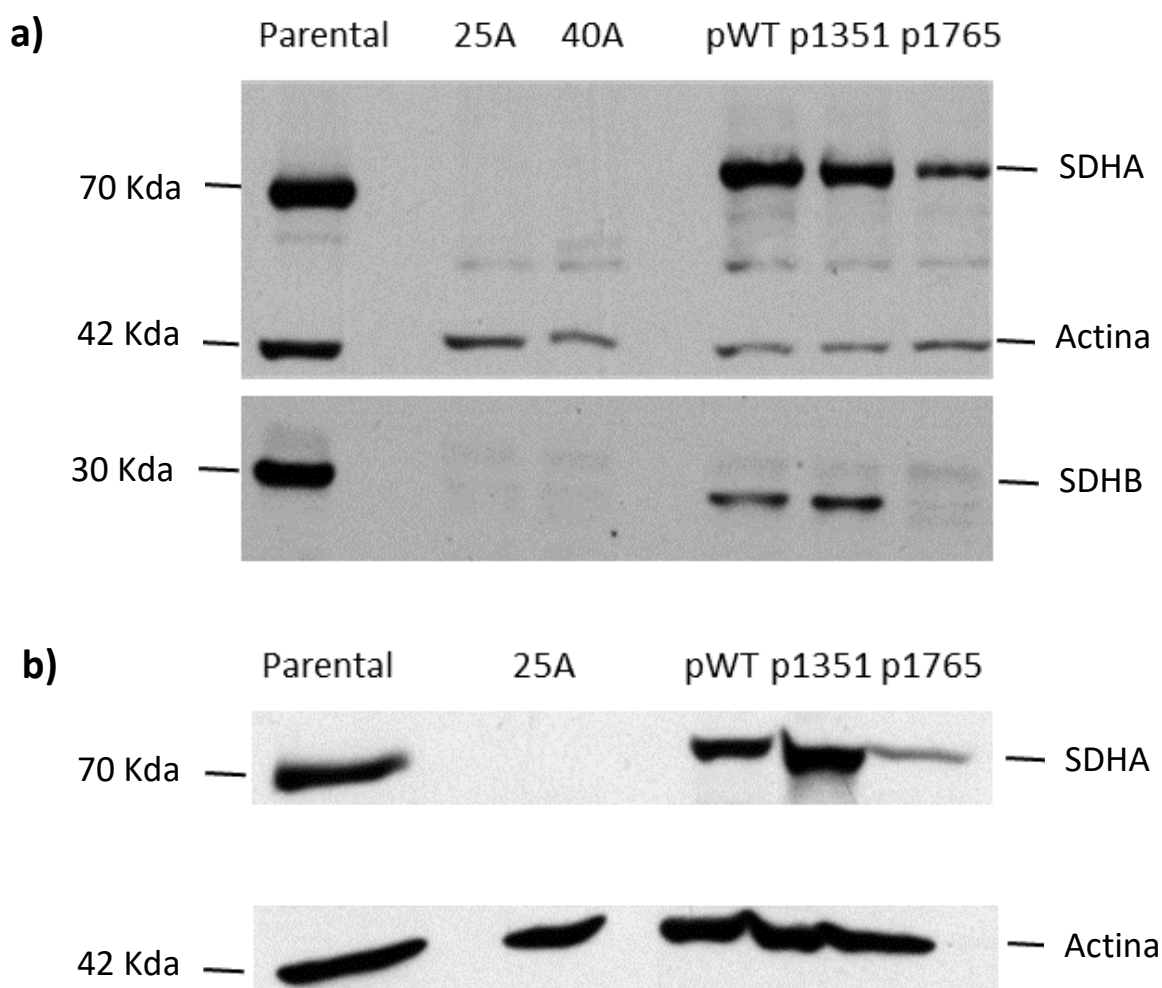


Figura 14: Expresión proteica del SDHA (70kD) y SDHB (30kD) en células U2OS parentales, *SDHA*<sup>-/-</sup> clones 25A y 40A, y *SDHA*<sup>-/-</sup> transfectadas con los plásmidos pSDHA WT (pWT), pSDHA 1351C>T (p1351) y pSDHA 1765C>T (p1765). Se usó la beta-actina (42 kD) como control.



Se estudió la expresión de los complejos I a IV de la cadena respiratoria y el complejo V (ATP sintasa) en el clon 25A con y sin transfectar con los plásmidos pSDHA WT, pSDHA 1351C>T y pSDHA 1765C>T. No se observó una pérdida de expresión del complejo I en el clon 25A (figura 15). En línea con lo observado anteriormente, el clon 25A presentaba una pérdida de expresión del SDHB que no fue recuperada con la transfección del plásmido 1765C>T pero sí con el WT y con el 1351C>T (figura 15). La falta de muestras adicionales impidió realizar la cuantificación y posterior análisis estadístico de la expresión de los otros complejos.

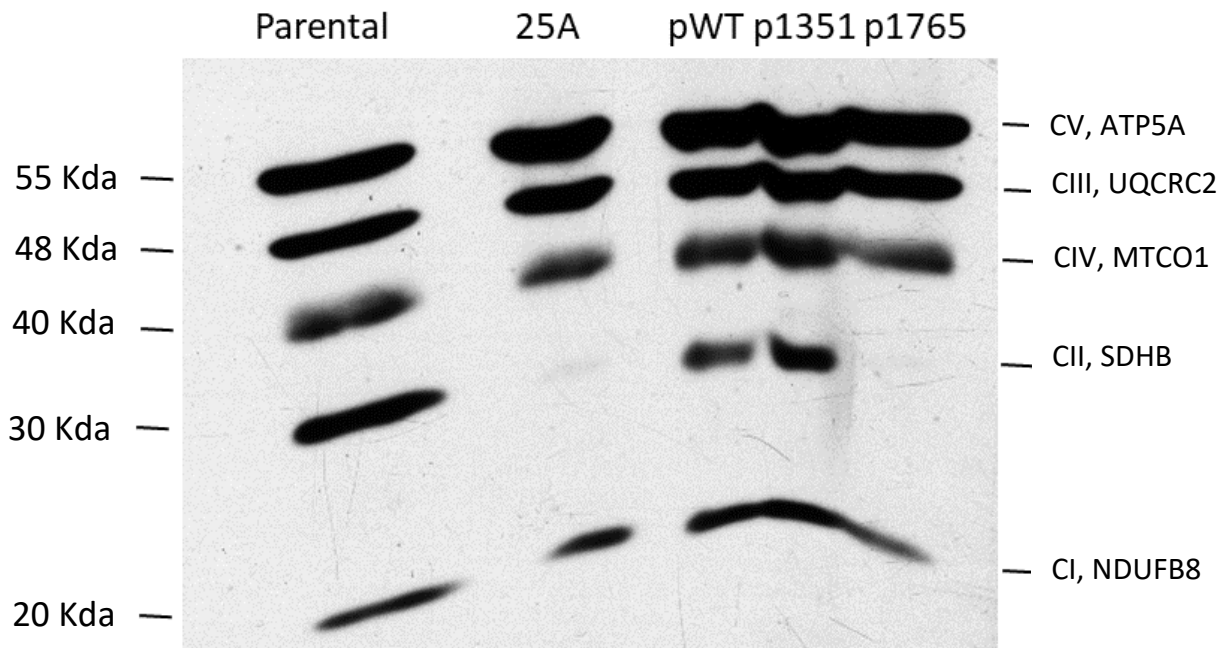


Figura 15: Expresión proteica del complejo V (55kD), complejo III (48kD), complejo IV (40kD), complejo II-SDHB (30 kD) y complejo I (20 kD) en células U2OS parentales, *SDHA*<sup>-/-</sup>, y *SDHA*<sup>-/-</sup> transfectadas con los plásmidos pSDHA WT (pWT), pSDHA 1351C>T (p1351) y pSDHA 1765C>T (p1765). ATP5a: subunidad alfa de la ATPsintasa F1; UQCRC2: ubiquinol-citocromo c reductasa proteína central 2; MTCO1: citocromo c oxidasa I; NDUFB8: NADH reductasa, subcomplejo 1 beta, subunidad 8.

## Discusión

Pese a que diversas mutaciones en *SDHA* han sido detectadas y estudiadas en tejidos de pacientes (20,25–27), hay muchas menos publicaciones acerca de su caracterización en modelos celulares relevantes (20). Este trabajo buscó desarrollar un modelo de expresión transitoria de dos mutaciones clínicamente relevantes en este gen, en células U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup>, con el objeto de poder estudiar sus diferentes efectos en relación con la expresión de la subunidad B de SDH y los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones. Esto es especialmente relevante para entender por qué estas dos mutaciones difieren en sus consecuencias funcionales a nivel celular (20) y en las patologías que generan. Así, mientras que la mutación c.1351C>T/R451C está asociada con patologías degenerativas con afectación muscular, cardíaca, ocular y

nerviosa, principalmente (24,27,31), la mutación c.1765C>T/R589W está asociada a diversos tumores como paragangliomas, o tumores del estroma gastrointestinal (11,12).

A nivel molecular se han observado varias diferencias en cuanto a los efectos de estas mutaciones. En línea con lo observado en el presente trabajo, la mutación R589W en SDHA provocó una pérdida de expresión de la subunidad B, tanto en tejido tumoral como en una línea celular de leucemia mieloide crónica (11,20). Estos dos trabajos también encuentran una pérdida de expresión de la subunidad A con esta mutación. En el trabajo actual, si bien se puede observar una disminución de la expresión de la subunidad A en el Western Blot, la falta de muestras adicionales impide cuantificar y realizar el análisis estadístico correspondiente. En un modelo de células de leucemia mieloide crónica con la mutación R589W se observó, además de una disminución de la expresión de SDHB, una disminución de la expresión de los complejos I, III y IV (20). La disminución de la expresión de los complejos I, III y IV no se observa en nuestro trabajo, ni en las células *SDHA*<sup>-/-</sup> sin transfectar, ni en las transfectadas con el plásmido que introduce la mutación R589W. Aun así, otros experimentos de nuestro laboratorio sí que encuentran una pérdida de expresión del complejo I en células *SDHA*<sup>-/-</sup>, por lo que es necesario repetir estos experimentos para cuantificar y validar los resultados.

El trabajo en células de leucemia mieloide crónica muestra similitudes en el perfil metabólico de las células con la mutación R589W y las células *SDHB*<sup>-/-</sup> (20), el cual es reconocido como gen supresor de tumores. Estas presentaban niveles reducidos del complejo I, pérdida de la respiración celular y cambios en el nivel de múltiples metabolitos. Esto no sucede en las células con la mutación R451C, que presentan niveles normales del complejo I y en las que es necesario inhibir farmacológicamente el complejo I para reproducir los cambios metabólicos de las células *SDHB*<sup>-/-</sup> y en las células con la mutación R589W. Este hallazgo sugiere que: 1) los cambios metabólicos observados en tumores con mutaciones en *SDHA/B* son provocados por la pérdida conjunta del complejo I y II y 2) el efecto de estas mutaciones es dependiente de la pérdida de complejo I. Además, la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de las subunidades A y B no genera estos mismos cambios, lo que sugiere una interacción estructural entre complejo I y II. Esta interacción se vería afectada con la mutación R589W, pero con R451C. La acumulación de succinato se observó en los dos mutantes, pero es atenuada con la pérdida del complejo I y genera un mantenimiento de la respiración celular, a través del metabolismo de la glutamina. Así, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas asociadas a la mutación R451C, se observa acumulación de succinato sin defectos en el complejo I (36,37). Esta acumulación es uno de los posibles mecanismos que vinculan defectos en el complejo II con estas enfermedades (38). Por tanto, estas diferencias metabólicas pueden ser claves en la explicación de por qué las dos mutaciones generan enfermedades diferentes.

Se han propuesto varios modelos para explicar la capacidad supresora de tumores de SDHB-D y también para explicar porque solo algunas mutaciones en *SDHA* están asociadas a la aparición de cáncer (11). Uno de los mecanismos propuestos es la estabilización del factor de transcripción HIF-1, que regula la expresión de genes involucrados en la respuesta a la hipoxia como el metabolismo glucolítico o la angiogénesis, frecuentemente desregulado en varios tumores (39). Varios trabajos apuntan a la acumulación de succinato como un factor que aumenta la traslocación nuclear de HIF-1 (40) o su estabilización a través de la inhibición de las prolihidroxilasas que participan en su degradación (41). Este modelo no resuelve la cuestión de por qué mutaciones como R451C están asociadas a enfermedades neurodegenerativas, pero no a cáncer. Otro posible vínculo entre defectos en la actividad del complejo II con el

cáncer, a través de HIF-1, es la generación de mitoROS, un factor relevante en la estabilización de HIF-1 (42). Este modelo explicaría por qué, mutaciones en SDHB/C y D están asociadas a la formación de tumores. Estas subunidades son imprescindibles para el transporte de electrones desde el FADH2 unido a la subunidad A hacia la ubiquinona, a través de los centros Fe-S y los sitios de unión a la ubiquinona (6,7). Un defecto en la función de estas subunidades generaría estrés oxidativo al alterar este proceso (43,44). Este incremento en la generación de mitoROS sería entonces dependiente de la actividad de la subunidad A, lo que está en aparente contradicción con el hallazgo consistente en que mutaciones como R589W o R31X, que genera un codón de STOP prematuro, están asociadas a cáncer pese a generar una pérdida de expresión de SDHA (11). Este mismo trabajo observa una activación de la vía de HIF en estos tumores que presentan la mutación, pero no exploran los mecanismos. Además, varias publicaciones han observado que la respuesta de pseudohipoxia es independiente de la generación de mitoROS (41,45), cuestionando el modelo anterior.

Varios trabajos recientes cuestionan el efecto independiente de la pérdida de función de SDH en la generación de tumores y apuntan a otros mecanismos como mediadores esenciales en el proceso. Como se ha comentado anteriormente, experimentos en células de leucemia mieloide crónica humana demostraron que la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de SDH no recapitulaba las alteraciones metabólicas observadas en tumores con mutaciones en SDH, sino que la pérdida de expresión de SDHB, mediante un KO de *SDHB* o mediante la mutación R589W, llevaba a la pérdida de expresión del complejo I (20). Esta disminución de la expresión y actividad del complejo I es necesaria para generar los cambios metabólicos descritos, principalmente una disminución de la respiración celular y cambios en los niveles de metabolitos del ciclo de Krebs, aumento del metabolismo de la glutamina, posiblemente dirigido a la producción de precursores de síntesis de macromoléculas necesarias para células proliferativas. Aun así, ese trabajo no excluye la posibilidad de que la pérdida de expresión de SDHB sea responsable de la formación de tumores por sí mismo, ya que la pérdida de SDHB provoca esta pérdida del complejo I y por tanto todos los cambios metabólicos (17,18). Por el contrario, un experimento en ratones con KO condicional de *SDHB* en células cromafines cuestiona la capacidad de esta alteración de provocar tumorigénesis (46). Estos ratones no desarrollaron tumores, ni presentaron aumentos en la expresión de HIF-1, a pesar de la acumulación de succinato. Sin embargo, la pérdida de SDHB en ausencia de *NF1*, que es un regulador negativo de la vía Ras/MPAK y Pi3K, sí se asoció a un aumento en la incidencia de tumores en ratones doble KO condicional *SDHB NF1*. Este estudio no analiza la expresión o actividad del complejo I, aunque menciona un aumento de la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa.

Por tanto, varias mutaciones de pérdida de función en *SDHB*, *SDHC* y *SDHD*, se asocian con la aparición de ciertos tumores, mientras que solo algunas mutaciones de pérdida de función de SDHA, como R589W, lo hacen, probablemente a través de la pérdida de SDHB. Otras mutaciones de pérdida de función en SDHA, como R451C, generan enfermedades neurodegenerativas a través de la acumulación de succinato, en ausencia de pérdida de la respiración celular y otros cambios metabólicos asociados, que sí se dan en mutantes de SDHB, SDHC y SDHD. Estos cambios son mediados en gran parte por la pérdida del complejo I y aunque puedan aumentar el efecto de otras alteraciones oncogénicas, no está claro si son capaces de generar tumores por sí mismos.

Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que vinculan los defectos en el complejo II con diversas enfermedades es importante caracterizar otras mutaciones en SDH. Así, en paralelo a este trabajo, nuestro grupo ha sintetizado plásmidos con otras mutaciones en SDHA descritas en la tabla 1. Además, se ha generado una línea estable U2OS *SDHB*<sup>-/-</sup> para el estudio funcional de mutaciones en esta subunidad.

## Conclusiones

1. Se ha generado una línea celular estable U2OS *SDHA*<sup>-/-</sup> mediante complejos gRNA/Cas9 para su uso en ensayos de rescate.
2. Se ha sintetizado un plásmido de expresión en mamíferos con la secuencia codificante de *SDHA*. Sobre este plásmido se ha realizado mutagénesis dirigida mediante PCR para introducir las mutaciones c.1351C>T y c.1765C>T asociadas a enfermedad neurodegenerativa y a cáncer, respectivamente.
3. Se han realizado los ensayos de rescate y los resultados preliminares están en línea con lo observado con la literatura: la expresión de SDHB (ausente en las células *SDHA*<sup>-/-</sup>) se rescata con el mutante c.1351C>T, asociado a enfermedad neurodegenerativa y no se recupera con el mutante c.1765C>T, asociado a cáncer.
4. El modelo generado pretende servir de base para el estudio de los fenotipos de expresión, de señalización y metabólicos que puedan ayudar a entender por qué las distintas mutaciones de *SDHA* producen tan variadas y distintas patologías.

## Bibliografía

1. Munnich A, Rustin P, Rötig A, Chretien D, Bonnefont JP, Nuttin C, et al. Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis*. 1992;15(4):448–55.
2. Dard L, Blanchard W, Hubert C, Lacombe D, Rossignol R. Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol Aspects Med*. 2020 Feb 1;71:100842.
3. Smeitink JAM, Loeffen JLCM, Triepels RH, Smeets RJP, Trijbels JMF, Van Den Heuvel LP. Nuclear genes of human complex I of the mitochondrial electron transport chain: state of the art. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 16];7(10):1573–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9735378/>
4. Tweedie S, Braschi B, Gray K, Jones TEM, Seal RL, Yates B, et al. Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D939–46.
5. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ* [Internet]. 2019 Aug 13 [cited 2022 Aug 16];7:e7314. Available from: <https://peerj.com/articles/7314>
6. Cecchini G. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain\*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2022 Jul 20];72:77–109. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.72.121801.16>

7. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate Dehydrogenase—Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Mitochondrion* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Jul 20];10(4):393. Available from: [/pmc/articles/PMC2874626/](#)
8. Van Vranken JG, Bricker DK, Dephore N, Gygi SP, Cox JE, Thummel CS, et al. SDHAF4 promotes mitochondrial Succinate dehydrogenase activity and prevents neurodegeneration. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2022 Aug 17];20(2):241–52. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413114002204/fulltext>
9. ROBINSON KM, ROTHERY RA, WEINER JH, LEMIRE BD. The covalent attachment of FAD to the flavoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase is not necessary for import and assembly into mitochondria. *Eur J Biochem*. 1994;222(3):983–90.
10. Sharma P, Maklashina E, Cecchini G, Iverson TM. The roles of SDHAF2 and dicarboxylate in covalent flavinylation of SDHA, the human complex II flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Sep 22 [cited 2022 Aug 17];117(38):23548–56. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2007391117>
11. Burnichon N, Brière JJ, Libé R, Vescovo L, Rivière J, Tissier F, et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010 Aug 8 [cited 2022 Aug 19];19(15):3011. Available from: [/pmc/articles/PMC2901140/](#)
12. Pantaleo MA, Astolfi A, Urbini M, Nannini M, Paterini P, Indio V, et al. Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT&sol;PDGFRA wild-type GIST. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 19];22:32–9. Available from: [www.nature.com/ejhg](http://www.nature.com/ejhg)
13. Bezawork-Geleta A, Wen H, Dong L, Yan B, Vider J, Boukalova S, et al. Alternative assembly of respiratory complex II connects energy stress to metabolic checkpoints. *Nat Commun* 2018 91 [Internet]. 2018 Jun 7 [cited 2022 Aug 19];9(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-04603-z>
14. Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephore N, Bayley JP, Kunst H, et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* (80- ) [Internet]. 2009 Aug 28 [cited 2022 Aug 19];325(5944):1139–42. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1175689>
15. van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, de Bruyn EM, et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2022 Aug 19];10(8):764. Available from: [/pmc/articles/PMC4718191/](#)
16. Fernández-Vizarrá E, Ugalde C. Cooperative assembly of the mitochondrial respiratory chain. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2022 Aug [cited 2022 Aug 20]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000422001876>
17. Cardaci S, Zheng L, Mackay G, Van Den Broek NJF, Mackenzie ED, Nixon C, et al. Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nat Cell Biol*. 2015;17.

18. Favier J, Brière JJ, Burnichon N, Rivière J, Vescovo L, Benit P, et al. The Warburg Effect Is Genetically Determined in Inherited Pheochromocytomas. *PLoS One* [Internet]. 2009 Sep 18 [cited 2022 Aug 20];4(9):e7094. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007094>
19. Saxena N, Maio N, Crooks DR, Ricketts CJ, Yang Y, Wei MH, et al. SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Aug 20];108(1):287. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/108/1/djv287/2457749>
20. Lorendeau D, Rinaldi G, Boon R, Spincemaille P, Metzger K, Jäger C, et al. Dual loss of succinate dehydrogenase (SDH) and complex I activity is necessary to recapitulate the metabolic phenotype of SDH mutant tumors. *Metab Eng*. 2017 Sep 1;43:187–97.
21. Fullerton M, McFarland R, Taylor RW, Alston CL. The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2020;131(1–2):53–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.009>
22. Rustin P, Rötig A. Inborn errors of complex II - Unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2002;1553(1–2):117–22.
23. Desnuelle C, Birch-Machin M, Pellissier JF, Bindoff LA, Ackrell BAC, Turnbull DM. Multiple defects of the respiratory chain including complex II in a family with myopathy and encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1989 Sep 15 [cited 2022 Aug 22];163(2):695–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2551272/>
24. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* [Internet]. 1995 [cited 2022 Aug 22];11(2):144–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7550341/>
25. Horváth R, Abicht A, Holinski-Feder E, Laner A, Gempel K, Prokisch H, et al. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2022 Aug 22];77(1):74–6. Available from: <https://jnnp.bmj.com/content/77/1/74>
26. Alston CL, Davison JE, Meloni F, van der Westhuizen FH, He L, Hornig-Do HT, et al. Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J Med Genet* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2022 Aug 22];49(9):569–77. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/49/9/569>
27. Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BA, Turnbull DM. Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann Neurol*. 2000 Sep;48(3):330-5. PMID: 10976639.
28. Gault MD, Mandelker D, Delair D, Stewart CR, Kemel Y, Sheehan MR, et al. Germline SDHA mutations in children and adults with cancer. *Cold Spring Harb Mol case Stud* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Sep 4];4(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30068732/>
29. Renkema GH, Wortmann SB, Smeets RJ, Venselaar H, Antoine M, Visser G, et al. SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *Eur J Hum Genet* 2015

- 232 [Internet]. 2014 Apr 30 [cited 2022 Sep 4];23(2):202–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/ejhg201480>
30. Belinsky MG, Rink L, Flieder DB, Jahromi MS, Schiffman JD, Godwin AK, et al. Overexpression of insulin-like growth factor 1 receptor and frequent mutational inactivation of SDHA in wild-type SDHB-negative gastrointestinal stromal tumors. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2022 Sep 4];52(2):214–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22023>
  31. Courage C, Jackson CB, Hahn D, Euro L, Nuoffer JM, Gallati S, et al. SDHA mutation with dominant transmission results in complex II deficiency with ocular, cardiac, and neurologic involvement. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Aug 22];173(1):225–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.a.37986>
  32. Levitas A, Muhammad E, Harel G, Saada A, Caspi VC, Manor E, et al. Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase. *Eur J Hum Genet* 2010 1810 [Internet]. 2010 Jun 16 [cited 2022 Sep 4];18(10):1160–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/ejhg201083>
  33. Wagner AJ, Remillard SP, Zhang YX, Doyle LA, George S, Hornick JL. Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2013 262 [Internet]. 2012 Sep 7 [cited 2022 Sep 4];26(2):289–94. Available from: <https://www.nature.com/articles/modpathol2012153>
  34. Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nat* 2014 5167531 [Internet]. 2014 Oct 22 [cited 2022 Sep 1];516(7531):423–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13902>
  35. Site Directed Mutagenesis by PCR [Internet]. [cited 2022 Sep 5]. Available from: <https://blog.addgene.org/site-directed-mutagenesis-by-pcr>
  36. Brockmann K, Bjornstad A, Dechent P, Korenke CG, Smeitink J, Trijbels JMF, et al. Succinate in dystrophic white matter: A proton magnetic resonance spectroscopy finding characteristic for complex II deficiency. *Ann Neurol*. 2002;52(1):38–46.
  37. Bourgeois M, Goutieres F, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J. Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with leigh syndrome. *Brain Dev*. 1992;14(6):404–8.
  38. Andreev AA, Vulfius CA, Budantsev AY, Kondrashova MN, Grishina E V. Depression of neuron responses to acetylcholine by combined application of norepinephrine and substrates of the tricarboxylic acid cycle. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 1986 Dec [cited 2022 Sep 1];6(4):407–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3829103/>
  39. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 1];8(4 SUPPL.). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11927290/>
  40. Brière JJ, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, et al. Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1 $\alpha$  nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2022 Sep 1];14(21):3263–9. Available from:

<https://academic.oup.com/hmg/article/14/21/3263/2355834>

41. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 1];7(1):77–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15652751/>
42. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*. 2005 Jun 1;1(6):409–14.
43. Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2022 Sep 1];28(2):718–31. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.01338-07>
44. Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman PS, Ishii N. A Mutation in the SDHC Gene of Complex II Increases Oxidative Stress, Resulting in Apoptosis and Tumorigenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2022 Sep 1];65(1):203–9. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/65/1/203/517822/A-Mutation-in-the-SDHC-Gene-of-Complex-II>
45. Selak MA, Durán R V., Gottlieb E. Redox stress is not essential for the pseudo-hypoxic phenotype of succinate dehydrogenase deficient cells. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2006 May 1;1757(5–6):567–72.
46. Armstrong N, Storey CM, Noll SE, Margulis K, Soe MH, Xu H, et al. SDHB knockout and succinate accumulation are insufficient for tumorigenesis but dual SDHB/NF1 loss yields SDHx-like pheochromocytomas. *Cell Rep* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Sep 1];38(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35235785/>