

## Biogénesis y Patología Mitocondrial\*

Julio Montoya

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular  
Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza

*Premio a la Investigación de la Academia 2005. Sección de Naturales*

### Abstract

Mitochondria are subcellular organelles devoted mainly to energy production in form of ATP. They contain their own genetic system that codifies a small, but essential, number of proteins of the oxidative phosphorylation system. The other mitochondrial proteins are encoded in the nucleus. Therefore, mitochondrial biogenesis require the coordinated expression of nuclear and mitochondrial genetic systems. The gene organization in human mitochondrial DNA is compact and without introns. The basic mechanisms of replication, transcription of mitochondrial DNA and the main elements involved in these processes have been determined. The mitochondrial coded mRNAs are translated into proteins by a mitochondrial specific protein-synthesizing machinery.

The genetics of the mitochondrial DNA differs from that of the nuclear DNA in several features. In particular, the mitochondrial genome is inherited exclusively from the mother that transmit their mitochondrial DNA to all her offsprings. In the last years, mutations in the human mitochondrial DNA, originating well defined clinical syndromes caused by defects in the oxidative phosphorylation system have been described. The clinical features of these diseases are very heterogeneous affecting in most cases to a great variety of organs and tissues.

Our research group has participated deeply in the generation of knowledge on mitochondrial gene expression and in the study of mitochondrial diseases.

**KEY WORDS:** Mitochondria; Mitochondrial DNA; Gene Expression; Maternal Inheritance; Mitochondrial Diseases

---

\*En la elaboración del presente artículo han participado también Manuel J. López-Pérez, Carmen Díez-Sánchez, Abelardo Solano, Ester López-Gallardo, Yahya Dahmani, María Dolores Herrero y Eduardo Ruiz-Pesini

## Resumen

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares cuya misión principal es la producción de energía en forma de ATP. Estos orgánulos contienen su propio sistema genético que codifica un número pequeño de proteínas que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa. El resto de las proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo. La biogénesis de la mitocondria requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares, el nuclear y el mitocondrial. Los genes están dispuestos en el DNA mitocondrial humano de una forma compacta y no contienen intrones. Se conocen bastante bien los mecanismos básicos de replicación y transcripción del DNA mitocondrial, así como los elementos y proteínas implicadas. La mitocondria posee, asimismo, su propia maquinaria para la síntesis de las proteínas codificadas en su genoma.

La genética del DNA mitocondrial difiere de la del DNA nuclear en una serie de propiedades. En particular, el genoma mitocondrial se hereda exclusivamente de la madre que lo transmite a todos sus hijos. En los últimos años, se han descubierto mutaciones en el DNA mitocondrial que originan enfermedades causadas por defectos en el sistema de fosforilación oxidativa.

Nuestro grupo de investigación ha tenido una participación muy intensa y definitiva en la obtención del conocimiento básico sobre la expresión del genoma mitocondrial y en el estudio de las enfermedades mitocondriales.

**PALABRAS CLAVE:** Mitocondria; DNA mitocondrial; Expresión Genética; Herencia Materna; Enfermedades mitocondriales

## 1 Introducción

Con motivo de la concesión del Premio de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza en su Sección de Naturales, se me ha pedido que escriba una revisión del campo de conocimiento en el que desarrollo mi labor investigadora, la genética mitocondrial. Este campo ha crecido enormemente en un corto espacio de tiempo y es realmente difícil resumirlo. Aquí, nosotros trataremos los aspectos genéticos básicos del DNA mitocondrial (mtDNA), su participación en la patología humana y la introducción y desarrollo de esta disciplina en nuestro país.

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares derivados de la endosimbiosis de un organismo del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias con un ancestro de las células eucariotas que contenía un núcleo. En ellas se llevan a cabo numerosas reacciones importantes en el metabolismo celular, tanto anabólico como catabólico. Sin embargo, la mayor parte de los genes de la protomitocondria original se transfirieron al núcleo y, en los animales, los únicos genes que han permanecido en la mitocondria están asociados a la función de síntesis de energía en forma de ATP, a través del sistema de fosforilación oxidativa (sis-

tema OXPHOS). Desde el punto de vista de su biogénesis, el sistema OXPHOS representa un caso único en la célula ya que requiere la contribución de los dos genomas celulares, nuclear y mitocondrial, para su formación. La mayoría de las proteínas componentes de la mitocondria, incluidas aquellas necesarias para la expresión de su genoma, están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma, generalmente en forma de precursores, y finalmente se importan y procesan en el interior del orgánulo. Por el contrario, el genoma mitocondrial codifica solamente un pequeño número de polipéptidos componentes del sistema OXPHOS y los RNAs necesarios para la síntesis de los mismos.

El genoma mitocondrial presenta una serie de características únicas como son la utilización de un código genético modificado, una alta velocidad de mutación, el estar presentes en poliploidía, y el tener un modo de organización y expresión muy específico. Sin embargo, lo que más llama la atención es el modo de transmisión del mismo. Así, el genoma mitocondrial se hereda exclusivamente por vía materna. Las mitocondrias de los espermatozoides se degradan selectivamente en los primeros estados del desarrollo embrionario permaneciendo solamente las mitocondrias derivadas del óvulo que se utilizan para repoblar el nuevo individuo. Este modo de herencia impide la recombinación de los genomas mitocondriales paternos. Este hecho parece haber contribuido, junto con la tasa de producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en el interior de la mitocondria, a la migración de genes mitocondriales al núcleo, donde podrían sufrir recombinación y eliminar más fácilmente variantes deletéreas.

## **2 El sistema genético mitocondrial humano y la fosforilación oxidativa**

En 1949, trabajando con levaduras, se sugirió la existencia de DNA extracromosómico al observar una serie de fenotipos metabólicos que se transmitían a través de un factor citoplásmico mediante herencia no mendeliana (1). Los indicios más tempranos apuntando la existencia del mtDNA en vertebrados se obtuvieron en 1962 y el propio mtDNA se descubrió en 1963 (2). Con el término de DNA mitocondrial se definen moléculas de DNA circulares, cerradas y superenrolladas presentes en la matriz mitocondrial. El mtDNA humano, tomado como modelo de todos los mamíferos, consta de 16.569 pares de bases, cuya secuencia se conoce en su totalidad (3), y codifica 37 genes: 2 RNA ribosómicos (rRNAs), 22 RNA de transferencia (tRNAs) y 13 polipéptidos integrantes de los complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS, siete (ND1, 2, 3, 4L, 4, 5 y 6) de los 46 polipéptidos del complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa; uno (cytb) de los 11 polipeptidos del complejo III o ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa; tres (COI, II, III) de los 13 del complejo IV o citocromo c oxidasa; y dos (ATP6 y 8) de los 16 de la ATP sintasa (complejo V) (Figura 1). Una zona no codificante de aproximadamente 1.100 bp contiene el origen de replicación de la cadena H ( $O_H$ ), los promotores de la transcripción

y los elementos reguladores de la expresión del mtDNA.

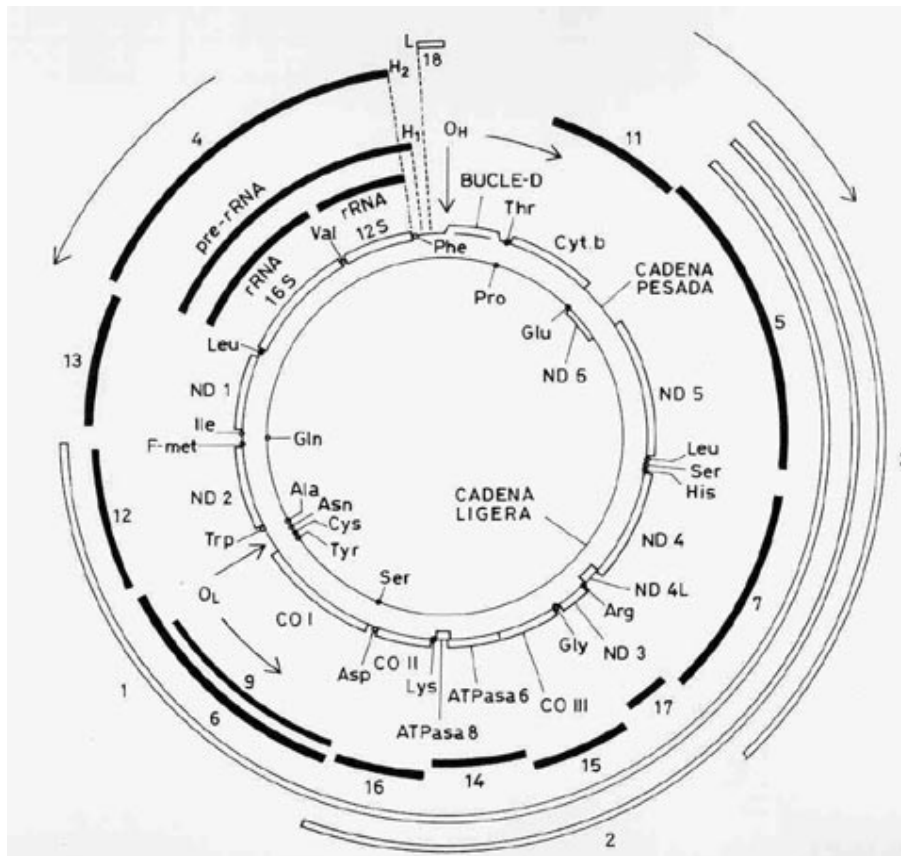


Figura 1.— Mapa genético y de transcripción del DNA mitocondrial humano. Los dos círculos interiores representan las dos cadenas del DNA mitocondrial en las que se indica los genes que codifican: rRNAs (rRNAs 12 S y 16 S), tRNAs, mostrados con la abreviatura del aminoácido que les corresponde, y secuencias codificadoras de proteínas (ND: subunidades de NADH deshidrogenas; cyt b: apocitocromo b; CO: subunidades de la citocromo C oxidasa). Los RNAs que se transcriben se representan en los círculos exteriores con barras negras (transcritos de la cadena pesada) y con barras abiertas (transcritos de la cadena ligera).  $H_1$ ,  $H_2$  y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente.  $O_H$  y  $O_L$  simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada y ligera, de acuerdo con el modelo de desplazamiento de hebra. Las flechas exteriores indican la dirección de la transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente, y las que están al lado de  $O_H$  y de  $O_L$  muestran la dirección de síntesis de la cadena pesada y ligera del DNA.

En general, cada mitocondria contiene varias moléculas de mtDNA y este no se encuentra como moléculas aisladas sino en asociación con proteínas formando unos complejos conocidos como nucleoides que contienen entre 2 y 10 moléculas de mtDNA (4). El factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA o TFAM), la proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB), la helicasa Twinkle y la DNA polimerasa gamma (POLG), además de otras proteínas todavía no identificadas, son parte de estos nucleoides (5). Los nucleoides

de levaduras contienen proteínas que pueden agruparse en cuatro categorías funcionales: metabolismo del mtDNA, importe y biogénesis mitocondrial, oxidación de piruvato-ciclo del ácido cítrico y metabolismo de aminoácidos. Así, numerosas rutas metabólicas celulares podrían interaccionar con el mantenimiento del mtDNA.

La existencia de varias moléculas de mtDNA por mitocondria y de numerosas mitocondrias por célula origina una situación particular, diferente de aquella encontrada en el núcleo, para la dosis de variantes alélicas. Así, una mutación en un mtDNA creará una población mezclada de moléculas de tipo salvaje y mutante. Una situación conocida como heteroplasmia. El porcentaje de mtDNAs mutantes puede variar entre 0% (homoplásmico tipo salvaje) a 100% (homoplásmico mutante). En principio, el reparto de mitocondrias a las células hijas en la división celular es al azar y esto puede provocar variaciones en los porcentajes de mutación a lo largo de las líneas celulares radiantes (segregación replicativa), lo que representa la base de la multisistemia característica de las enfermedades mitocondriales.

¿Por qué ha permanecido un DNA en la mitocondria? No se tiene respuesta a esta pregunta pero se ha sugerido una serie de causas: 1) las proteínas que están codificadas en el genoma mitocondrial presentan un alto grado de hidrofobicidad lo que dificultaría su importe a la mitocondria; 2) estas proteínas podrían ser tóxicas en el citoplasma; 3) la existencia de un genoma en la mitocondria permitiría una regulación local, rápida y más fina de la expresión de los genes que codifica; y 4) es posible que no se haya terminado todavía de transferir toda la información que contiene al núcleo, posiblemente por el código genético diferente que utiliza.

Como se ha mencionado anteriormente, todas las proteínas que codifica el mtDNA forman parte del sistema OXPHOS compuesto por la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria transporta electrones entre los complejos respiratorios para finalmente reducir el oxígeno a agua. A la vez, los protones se translocan desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico que será utilizado por la ATP sintasa, reconduciendo estos protones a la matriz, para producir ATP. Parte de la energía producida por el transporte de electrones se libera en forma de calor y una fracción de los electrones reacciona tempranamente con el oxígeno produciendo ROS. Así, una cadena estrechamente acoplada produciría ATP con mucha eficacia y poco calor. Un cierto desacoplamiento provocado por la filtración de protones por lugares diferentes del canal protónico de la ATP sintasa o por deslizamiento de electrones (cuando el transporte de electrones a través de la cadena no se acompaña de translocación de protones), disminuirá el gradiente electroquímico, lo que se traducirá en una pérdida en la eficacia de producción de ATP y en la necesidad de consumir más sustratos para producir la misma cantidad de ATP. Esto llevará a un aumento en el calor liberado. Además, un cierto desacoplamiento facilita el transporte de electrones a lo largo

de la cadena respiratoria y los intermediarios implicados se encuentran en un estado menos reducido, lo que lleva a una menor producción de ROS.

### 3 Replicación del DNA mitocondrial

#### 3.1 El modelo de desplazamiento de hebra

Este modelo, según el cual la replicación del mtDNA es unidireccional y asimétrica, fue propuesto para explicar los datos obtenidos a partir de estudios de microscopía electrónica (6). El modelo sugiere que las dos hebras del mtDNA se replican, de forma continua, a partir de dos orígenes de replicación ( $O_H$  y  $O_L$ ) ampliamente separados y requiere un desplazamiento extenso de una de las hebras del DNA parental durante la síntesis de la hebra H. Este proceso comenzaría con la síntesis de un RNA cebador por la RNA polimerasa (RNAPol). Para que esta pueda acceder al DNA molde y comience la replicación del mtDNA, se requiere un cambio conformacional en la molécula de DNA que consiste en su inclinación y desenrollado inducido por la unión del factor de transcripción mtTFA (TFAM) al duplex de DNA. La topoisomerasa de tipo I, específica de organelo, relaja entonces el DNA superenrollado rompiendo temporalmente enlaces en el esqueleto del DNA y la helicasa mitocondrial desenrolla la doble hebra, rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen ambas cadenas juntas, para producir moldes de hebra única. Una proteína de unión al DNA de hebra única (mtSSB) mantiene la integridad de los intermediarios replicativos previniendo su renaturalización y acelera la velocidad de síntesis de DNA. Recientemente, se han descrito dos nuevos factores de transcripción (TFMB1 y 2), que forman heterodímeros con la RNAPol activándola (7). Para el cebado de la replicación, RNAPol transcribe un fragmento empezando en el promotor de la hebra L. La transición de RNA a DNA tiene lugar en el origen de replicación de la hebra H ( $O_H$ ) donde el cebador precursor se escinde por una endonucleasa procesadora del RNA mitocondrial (RNase MRP). La elongación de la hebra naciente de DNA se lleva a cabo por la DNA polimerasa gamma (DNAPol gamma - POLG) que consta de dos subunidades, una catalítica con actividades de polimerización 5'-3' y exonucleolítica 3'-5', y una segunda, la subunidad accesoria pequeña (b), que se une al DNA de doble hebra, incrementando la afinidad de la enzima por el DNA confiriéndole procesividad a la subunidad catalítica y, además, está implicada en el reconocimiento del cebador.

La mayoría de eventos de inicio de la síntesis de la hebra H terminan prematuramente después de aproximadamente 700 nucleótidos y tras una secuencia conocida como secuencia asociada a la terminación (TAS). Así, parece que los niveles de terminación de la replicación juegan un papel importante en la regulación del número de copias de mtDNA. La terminación prematura de la replicación provoca la aparición de una estructura conocida como bucle de desplazamiento (D-loop) que consiste de la porción de DNA duplex

recién sintetizada más la hebra H parental desplazada. Cuando la hebra H naciente es capaz de pasar a través de la región de terminación prematura, su elongación continúa de forma unidireccional hasta que, después de recorrer dos tercios de la molécula, desplaza una secuencia de la hebra H parental capaz de establecer una estructura lazo-tallo que constituye el origen de replicación de la hebra L ( $O_L$ ) y sirve como región de reconocimiento de una DNA primasa, específica de mitocondrias, que sintetizará un cebador corto de RNA y después la POLG elongará la cadena de forma unidireccional y en sentido contrario al de la hebra H naciente (8,9). Al final del proceso de replicación, la topoisomerasa de tipo II introduce los superenrollamientos que mantendrán la molécula en un estado funcional (figura 1). En este modelo de replicación asimétrica, la síntesis de DNA es continua en ambas hebras y carece de fragmentos de Okazaki.

### *3.2 El modelo de replicación bidireccional y simétrica*

La investigación sobre los procesos fundamentales que tienen lugar en la mitocondria no se pueden dar por concluidos. Una prueba importante es que, recientemente, se ha puesto en duda el modelo de replicación de desplazamiento de la hebra y que ahora, basándose en una técnica que utiliza geles bidireccionales, se ha propuesto que el mtDNA se replica de un modo bidireccional y simétrico desde un único origen de replicación, a semejanza con el DNA bacteriano (10,11). Este nuevo modelo, que está tomando bastante fuerza, no explica la mayoría de datos que hasta ahora se habían obtenido explicando el modelo anterior.

## **4 Niveles e integridad del mtDNA en la patología mitocondrial**

Las células en cultivo pueden crecer y multiplicarse en ausencia de mtDNA. Estas células se conocen como células rho0 ( $\rho_0$ ). La carencia del sistema OXPHOS en estas células hace que sean dependientes de piruvato y uridina para su crecimiento. El primero es necesario porque se utilizan grandes cantidades en la regeneración de NAD<sup>+</sup> para que continúe la glicólisis, sustrayéndole de procesos anabólicos, y, el segundo, porque la síntesis de novo de uridina requiere de una cadena respiratoria funcional. Sin embargo, la ausencia de mtDNA es incompatible con la vida humana y ya en 1991 se describieron los primeros ejemplos de un tipo nuevo de patología mitocondrial, el síndrome de depleción de mtDNA en el que el número de copias de mtDNA está muy disminuido. Desde entonces, se han descrito más de cien pacientes con esta patología. Muchos se presentan en el periodo neonatal con fallo hepático progresivo y encefalopatía, otros en la infancia presentan miopatía y un tercer grupo sufren de una enfermedad que afecta múltiples tejidos como cerebro, corazón y riñón. En los tres casos, el pronóstico es muy grave y la mayoría de los pacientes suelen morir en el primer año de vida. Estas enfermedades se suelen transmitir

como rasgos autosómicos recesivos y de ahí que probablemente sean debidas a mutaciones en genes nucleares.

Como se ha indicado, en la replicación del mtDNA están implicadas numerosas proteínas y mutaciones en muchas de ellas provocarán un fenotipo molecular de depleción. Así, un defecto en el homólogo de levadura de la RNAPol se ha asociado con depleción de genomas mitocondriales intactos y los ratones que carecen de Tfam mueren de depleción de mtDNA in útero. Otro fenotipo de depleción de mtDNA es el síndrome de Alpers-Huttenlocher, causado por mutaciones en la POLG (12). Además, en levadura se ha observado la pérdida completa del mtDNA debida a mutaciones en genes no requeridos para la replicación del mtDNA.

Interesantemente, un 15% de los pacientes con síndrome de depleción portan mutaciones que alteran la deoxiguanosina kinasa (dGK) o la timidina kinasa 2 (TK2), las dos enzimas limitantes de la velocidad en la ruta de salvamento de nucleótidos mitocondrial. La primera es específica para las purinas y la segunda para las pirimidinas. La depleción de mtDNA es también común en la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) y se debe a mutaciones en la enzima citosólica timidina fosforilasa (TP), también implicada en el metabolismo de nucleótidos (13). Asimismo, se ha visto que mutaciones deletéreas en la subunidad b de la succinil-CoA sintetasa formadora de ADP causan también depleción de mtDNA. Esta enzima del ciclo de Krebs está asociada a la última enzima en la ruta de salvamento de nucleótidos, la nucleósido difosfato kinasa (NDPK), y quizás esta interacción medie en el mecanismo patogenético (14).

Los análogos de nucleósidos utilizados en la terapia antiviral y anticancerosa son drogas que necesitan ser activadas por fosforilación y pueden causar daño al mtDNA. Por ejemplo, pacientes que reciben zidovudina (AZT) pueden desarrollar acidosis láctica y disfunción mitocondrial. En tejidos no mitóticos el AZT es activado por TK2. El acumulo de nucleótidos de AZT resulta en depleción de mtDNA, ya que la DNA polimerasa es particularmente vulnerable a este análogo que, además, compite con la fosforilación de timidina. La toxicidad aumenta posteriormente por la baja eficiencia de defosforilación por la dNT2. Otro análogo de nucleósido, la fialuridina (FIAU), se fosforila eficientemente por TK2 y se incorpora al mtDNA. Las pruebas terapéuticas con este agente antiviral tuvieron que suspenderse a causa de la severa toxicidad mitocondrial y fallo hepático (13).

La identificación a finales de los 80 de deleciones en pacientes con miopatías mitocondriales abrió el campo de la patología mitocondrial (15). Los fenotipos más comunes asociados a deleciones son la oftalmoplejia externa progresiva y crónica (CPEO); síndrome médula/páncreas de Pearson; síndrome de Kearns-Sayre y MNGIE. A veces se ha observado la presencia de deleciones múltiples y depleción en el mismo síndrome. Mutaciones en algunos de los genes anteriormente citados (POLG, helicasa, TP) pueden ser también responsables de las deleciones múltiples, así como en otros implicados en el control de



los niveles mitocondriales de nucleótidos como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Parece pues que cualquier condición que afecta la velocidad de replicación puede ser causante de estos dos fenotipos moleculares.

## 5 Expresión del mtDNA

### 5.1 Transcripción del mtDNA

El modelo de expresión de la información codificada en el mtDNA fue establecido a comienzos de los 80, fundamentalmente en el laboratorio del Dr. Giuseppe Attardi en el Instituto de Tecnología de California (Caltech). En 1979, uno de nosotros (JM) se trasladó a dicho laboratorio para realizar una estancia postdoctoral y allí se encargó del aislamiento y análisis fino de los transcritos mitocondriales concluyendo con el establecimiento del modelo de transcripción y de procesamiento de RNA, denominado por puntuación por tRNAs. De acuerdo con este modelo, la transcripción del mtDNA se inicia a partir de tres promotores diferentes, uno para la cadena ligera (L) y dos para la cadena pesada ( $H_1$  y  $H_2$ ), que darán lugar a tres moléculas policistrónicas largas que se procesarán por cortes endonucleolíticos precisos delante y detrás de los tRNAs, que actuando como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento, al adquirir la configuración en hoja de trébol en las cadenas nacientes de RNA, dan lugar a los rRNAs, tRNAs y mRNAs maduros (16-20) (figura 1).

La cadena ligera se transcribe mediante una única unidad de transcripción que empieza en el lugar de iniciación L, cerca del extremo 5' del RNA 7S (poli(A)-RNA 18) (21), dando lugar a 8 tRNAs y al único mRNA (ND6) codificado en esa cadena. Como se ha indicado en el apartado 3.1., el inicio de la síntesis de DNA depende también de la actividad de esta unidad de transcripción que sintetiza el cebador de la replicación. La poliadenilación de este corto RNA quizás pueda participar en la regulación de la frecuencia de inicio de la síntesis de mtDNA. La cadena pesada se transcribe mediante dos unidades de transcripción solapadas en la región de los rRNAs (19). La primera, que se transcribe muy frecuentemente, comienza en el lugar de iniciación  $H_1$ , situado por delante del gen tRNA<sup>Phe</sup>, termina en el extremo 3' del gen para el rRNA 16S y es responsable de la síntesis de los rRNAs 12S y 16S, del tRNA<sup>Phe</sup> y del tRNA<sup>Val</sup>. Un factor de terminación (mTERF) actúa uniéndose en el gen del tRNA<sup>Leu</sup> en una secuencia inmediatamente posterior al gen del rRNA 16S (22-25). El segundo proceso de transcripción, mucho menos frecuente que el anterior, comienza en el punto de iniciación  $H_2$ , cerca del extremo 5' del gen rRNA 12S, se extiende más allá del extremo 3' del gen rRNA 16S y produce un RNA policistrónico que corresponde a casi la totalidad de la cadena pesada. Los mRNAs de los 12 péptidos y 14 tRNAs, codificados en esta cadena, se originan por procesamiento de este RNA policistrónico. Para llevar a cabo este proceso de transcripción se necesita una RNA

polimerasa específica (h-mtRPOL), codificada en el DNA nuclear (nDNA) (26,27), dos factores de transcripción implicados en la iniciación (mtTFA y mtTFB) (28,29), y uno de terminación (mTERF) (22,24,25), todos ellos codificados en el nDNA.

El modelo de transcripción descrito muestra como la iniciación juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y explica el modo de síntesis diferencial de rRNAs y mRNAs (19). En esta regulación parece jugar también un papel muy importante la fosforilación del factor de terminación mTERF (25,30).

Como se deduce del modelo anterior, las dos cadenas del DNA se transcriben completa y simétricamente (Figura 1) y los productos de transcripción del DNA mitocondrial humano aislados incluyen los 2 rRNAs (rRNA 12S y 16S), su precursor, los tRNAs y 18 RNAs poliadenilados en el extremo 3' (poli(A)-RNAs), la mayoría de los cuales corresponden a los RNA mensajeros (mRNAs) (19). La mayor parte de los RNAs maduros corresponden a un único gen. Sin embargo dos de ellos, los mRNAs de los genes para las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa y ND4 y 4L, contienen dos genes cada uno con el marco de lectura solapado. Los tres poli(A)-RNAs mayores (RNAs 1, 2 y 3) y el menor (RNA 18), así como 8 tRNAs, son productos de transcripción de la cadena ligera del DNA mitocondrial mientras que el resto lo son de la cadena pesada (Figura 1).

El análisis estructural de los RNAs mitocondriales mostró unas características muy únicas. Así, los rRNAs se caracterizan por estar metilados, aunque el grado de metilación es más bajo que el de los rRNAs citoplásmicos, y por estar oligoadenilados en su extremo 3' con 1 a 10 adeninas no codificadas en el DNA (21). Los tRNAs, en general más pequeños que sus homólogos del citoplasma, tienen un tamaño que varía entre 59 y 75 nt y su estructura presenta numerosas desviaciones con respecto al modelo considerado como invariable de los sistemas no mitocondriales. Así, la mayoría de los tRNAs carecen de los nucleótidos constantes y el tamaño del bucle "DHU" varía considerablemente llegando incluso a desaparecer en el tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>. Aparte del CCA del extremo 3', no codificado en el DNA, la única región que ha conservado las características generales de los tRNAs es la región del anticodón. Con la excepción del tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>, todos los tRNAs mitocondriales pueden plegarse en la característica hoja de trébol. Sin embargo, parece que estos tRNAs se estabilizan con menos interacciones terciarias que los tRNAs citoplásmicos.

Los 13 polipéptidos codificados en el mtDNA tienen un tamaño que varía entre 70 y 610 aminoácidos. Los mRNAs que los codifican contienen exclusivamente la secuencia del patrón de traducción y una cola de unos 55 adenosinas en el extremo 3'. Los mRNAs mitocondriales humanos comienzan directamente por el codon de iniciación AUG, AUA o AUU o tienen muy pocos nucleótidos (1 a 3) delante de los mismos. Carecen por tanto de uno de los caracteres típicos de los mRNA de otros sistemas, como es la presencia de un tramo no codificante en el extremo 5' (17). Tampoco contienen la capucha en el extremo

5'. Asimismo, el extremo 3' de la mayor parte de los mRNAs carecen de una región no codificante y finalizan U o UA generándose el codon de terminación completo (UAA) por la poliadenilación postranscripcional (16). Estos mRNAs carecen de una secuencia indicadora de poliadenilación.

## 5.2 Traducción de los mRNAs mitocondriales

Los mRNA mitocondriales se traducen en el interior de las mitocondrias. Estos orgánulos contienen ribosomas específicos con los componentes proteicos (78 proteínas ribosómicas) codificados en el nDNA y los RNA en el mtDNA. La economía genética del mtDNA también ha propiciado otras características especiales en los sistemas de traducción. Los rRNAs son más pequeños que los citosólicos o procarióticos y se han reclutado nuevas proteínas para sustituir las funciones perdidas con los segmentos de rRNA eliminados. Así, los ribosomas mitocondriales son especialmente ricos en proteínas. Por otra parte, el código genético utilizado por la mitocondria es algo diferente del código universal. Así, en la mitocondria humana el codon UGA codifica triptófano en lugar de ser uno de los codones de terminación, los codones AUA y AUU se utilizan, al igual que AUG, como codones de iniciación, y AGA y AGG, codones de arginina en el código universal, son señales de terminación.

Los polipéptidos sintetizados en la mitocondria interactúan con los componentes del sistema OXPHOS codificados en el nDNA, sintetizados en ribosomas del citosol e importados a la mitocondria para producir el sistema OXPHOS. Así, la biogénesis de este sistema depende de la expresión coordinada de los genomas mitocondrial y nuclear.

Muchas proteínas de localización mitocondrial se traducen en polisomas unidos a la membrana externa mitocondrial. Las secuencias 3'-UTR de estos genes contienen señales que dirigen estos mRNAs a la mitocondria. Curiosamente, estos genes tienen mayoritariamente un origen procariótico mientras que los genes traducidos en polisomas libres son de origen eucariótico. De un modo análogo, los mRNAs mitocondriales también parecen que se traducen en ribosomas unidos a la membrana interna mitocondrial. Se ha demostrado que el dominio carboxi terminal de la proteína Oxa1 se une al ribosoma mitocondrial y acopla físicamente el aparato de traducción mitocondrial al complejo de inserción en la membrana interna.

## 6 Patología mitocondrial por mutaciones en genes implicados en la expresión del mtDNA

La primera mutación en genes de los tRNAs o de los rRNAs se describió en 1988. Esta mutación en la posición 8344 en el tRNA<sup>Lys</sup> causa el síndrome MERRF (epilepsia mioclónica y fibras rojo rasgadas). Desde entonces, se han descrito decenas de mutaciones

patológicas en los mt-tRNAs ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Aunque en menor número, también se han descrito mutaciones en el rRNA 12S. En particular, mutaciones en las posiciones 1494 o 1555, que se encuentran enfrentadas inmediatamente adyacentes a una estructura tallo del rRNA, provocan sordera no sindrómica. Esta sordera mitocondrial está asociada al uso de antibióticos aminoglicósidos. La razón parece ser debida a que cualquiera de estas mutaciones reconstruye un par de bases Watson-Crick, alargando el tallo del rRNA y haciéndolo más similar a la estructura bacteriana y por lo tanto más sensible a dichos antibióticos.

Recientemente se han descrito mutaciones en genes nucleares implicados en la expresión de la información del mtDNA (31). Así, un paciente con agénesis del cuerpo caloso, dismorfismo y acidosis láctica neonatal fatal, que presenta una disminución marcada de las actividades del complejo I y IV, de los niveles de rRNA 12S y de la traducción mitocondrial, portaba en homocigosis una mutación sin sentido en el gen para la proteína mitocondrial MRPS16. Dos hermanos con hepatoencefalopatía y un defecto severo en la traducción mitocondrial y niveles reducidos de los complejos respiratorios con subunidades codificadas en el mtDNA, tenían una mutación en el dominio de unión del GTP al factor de elongación G1, un factor de la traducción mitocondrial y mutaciones en la pseudouridina sintasa (PUS1) encargada de la pseudouridilación de los tRNAs se ha asociado con miopatía mitocondrial y anemia sideroblástica (MLASA).

## 7 Regulación de la expresión del mtDNA

A pesar del gran conocimiento que se ha llegado a obtener sobre el mtDNA y su expresión, se tiene muy poca información acerca de la regulación de su expresión y de la coordinación con la expresión del genoma nuclear. Con el fin de avanzar en este conocimiento, al regreso de Estados Unidos, creamos un laboratorio, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, para el estudio de la regulación de la expresión del genoma mitocondrial. Para ello, se puso a punto una metodología de trabajo consistente en utilizar a las mitocondrias aisladas como modelo de trabajo *in vitro*. Esta técnica permitía trabajar con mitocondrias libres de la influencia del núcleo-citoplasma y, por tanto, poder estudiar la acción directa de distintos efectores sobre la transcripción mitocondrial. En primer lugar se comprobó que las mitocondrias aisladas transcriben el mtDNA y procesan el RNA de un modo similar a como sucede *in vivo*. Con este modelo se ha demostrado que las mitocondrias son capaces de mantener su capacidad transcripcional durante varias horas después de ser aisladas de su entorno celular, y de modular la transcripción en respuesta a situaciones fisiológicas tales como la demanda energética celular, la falta de aporte de factores citoplásmicos, u hormonas (32,33). En particular se ha demostrado que las hormonas tiroideas tienen

un efecto directo sobre la transcripción mitocondrial regulando los niveles de mRNA y rRNA mediante la selección del lugar de iniciación de la transcripción en H<sub>1</sub> o H<sub>2</sub> (33). Asimismo, se ha visto que la regulación posttranscripcional de la expresión génica mitocondrial incluye el procesamiento de los transcritos primarios (32,34) y la estabilidad diferencial de los transcritos maduros (32,35). Como se ha indicado, la regulación transcripcional puede realizarse a nivel de iniciación pero también a nivel de terminación del proceso. En este último aspecto, recientemente hemos demostrado que el control de la síntesis de rRNA se verifica también por fosforilación del factor de terminación mTERF y su posible unión a la zona de los promotores (25,30). Así, el factor estaría siempre unido a su secuencia de unión en el tRNA<sup>Leu</sup>, justo después de la región del rDNA, y provocaría la terminación de la unidad de transcripción pequeña cuando estuviera fosforilado, sintetizando fundamentalmente los rRNAs. La desfosforilación del mismo permitiría a la RNA polimerasa avanzar y transcribir la cadena H completa. La unión simultánea, o a través de otras proteínas, de mTERF a la zona de los promotores formando un bucle en el DNA, haría que, en su forma fosforilada, provocase la iniciación en H<sub>1</sub> y terminación en el extremo 3' de la zona de los rRNAs, de este modo, la frecuencia de eventos de la unidad de transcripción pequeña sería más elevada que cuando comienza en H<sub>2</sub> (25,30).

## 8 Enfermedades causadas por mutaciones en el DNA mitocondrial

Como hemos visto anteriormente la biogénesis del sistema OXPHOS así como la replicación y expresión del sistema genético mitocondrial dependen de genes codificados tanto en el genoma mitocondrial como en el nuclear. A lo largo de esta revisión, en la descripción de los procesos que llevan al mantenimiento del mtDNA y a su expresión, se ha hecho hincapié en diversas mutaciones en genes nucleares que causan enfermedades mitocondriales. Sin embargo nada se ha mencionado sobre mutaciones en el genoma mitocondrial. El mtDNA codifica solamente proteínas componentes del sistema OXPHOS y los RNAs necesarios para su expresión. Por tanto, las enfermedades mitocondriales originadas por mutaciones en el mtDNA son un grupo de patologías que tienen en común el estar producidas por un defecto de síntesis de ATP. De este modo, dentro de las enfermedades producidas por defectos del metabolismo mitocondrial, son enfermedades originadas concretamente por defectos de los componentes de los complejos multienzimáticos I, III, IV y/o V del sistema OXPHOS. Las primeras mutaciones en el mtDNA asociadas a enfermedades humanas se describieron en 1988 y desde entonces el número de mutaciones y el espectro de enfermedades por ellas producidas ha crecido enormemente.

Una de las características de la patología mitocondrial es su complejidad. Así, en general son multisistémicas, muchos órganos o tejidos se ven afectados y no es raro que una misma mutación de lugar a fenotipos muy diferentes o que distintas mutaciones

produzcan el mismo fenotipo. A pesar del gran avance conseguido en estos 17 años en el diagnóstico de las mitocondriopatías, muy poco se conoce todavía sobre los mecanismos patogénéticos y menos aun sobre las terapias a emplear.

Las síntomas de estas enfermedades son muy variados y en muchos casos están solapados entre diversos síndromes. Además, muy frecuentemente afectan a niños en los que la determinación de la patología que padecen es, muy a menudo, muy complicada porque no han desarrollado todavía la mayoría de los síntomas que hacen que se puedan encuadrar en un tipo de síndrome determinado. Por ello, es bastante habitual que estas enfermedades se clasifiquen en base a las características genético-moleculares de las mutaciones más que con respecto a los síntomas clínicos, a pesar de que, en algunos casos, como ya se ha mencionado, una misma mutación pueda dar lugar a fenotipos clínicos diferentes. De este modo, las enfermedades producidas por daños en el mtDNA se pueden dividir en tres grandes grupos según estén asociadas a: 1) mutaciones puntuales tanto en genes codificantes de proteínas como en tRNAs y rRNAs; 2) reorganizaciones (deleciones y duplicaciones); y 3) depleción de mtDNA (disminución de número de copias).

Entre las enfermedades causadas por mutaciones puntuales en genes codificantes de proteínas nos encontramos con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), los síndromes de Leigh de herencia materna (MILS), de neuropatía periférica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), de intolerancia al ejercicio, y otros. Las mutaciones puntuales en genes de tRNAs causan mayoritariamente los síndromes de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebro-vasculares), MERRF (Encefalomiopatía mitocondrial con fibras rojo-rasgadas), cardiomiopatías, diabetes de herencia materna con sordera, etc. En los genes codificantes de rRNAs también se han encontrado mutaciones puntuales asociadas fundamentalmente a sordera inducida por aminoglicósidos y sensoneural. Todas estas mutaciones son habitualmente de herencia materna.

Deleciones del mtDNA se han encontrado en síndromes como CPEO (oftalmoplegia, crónica progresiva externa), de Kearns-Sayre, en el de médula y páncreas de Pearson, MNGIE (encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial), etc. Se desconoce como se producen estas deleciones si bien, en algunos casos, se han encontrado de herencia materna y, en otros, parece que se deben a mutaciones en genes nucleares que afectan al metabolismo de nucleótidos mitocondriales.

La disminución del número de copias del mtDNA se ha encontrado en los síndromes de depleción de los que se han descrito fundamentalmente dos tipos, la forma hepatocerebral y la miopática. En ambos casos, como se ha citado en un apartado anterior, parece que esta disminución del número de copias del mtDNA se debe a mutaciones recesivas en genes nucleares que afectan al metabolismo de nucleótidos. Sin embargo, también se han encontrado en el síndrome de Alpers causadas por mutaciones en la DNA polimerasa

gamma que replica el mtDNA.

En la tabla 1, se muestran las mutaciones más importantes asociadas a los síndromes indicados anteriormente.

Las enfermedades mitocondriales, tomadas en su conjunto, son uno de los tipos de enfermedades genéticas más frecuentes. En algún estudio realizado, se ha encontrado que uno de cada 8.000 habitantes padece o es portador de una mutación en el mtDNA. Este número es, posiblemente, muy bajo debido a que estas enfermedades solo se pueden diagnosticar bien en centros especializados y, por tanto, pasan desapercibidas en muchos centros sanitarios. Además, como se ha mencionado en apartados anteriores, las enfermedades del sistema OXPHOS, pueden estar causadas también por mutaciones en genes nucleares, ya que una gran parte de las proteínas de este sistema están codificadas en el genoma nuclear. Así, mutaciones en genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales, de proteínas que participan en el ensamblaje de los complejos respiratorios, de las proteínas implicadas en el importe de las mismas a la mitocondria, etc., pueden dar lugar también a enfermedades mitocondriales y todas estas no están contabilizadas en las cifras de prevalencia antes mencionadas. Por todo ello, se deduce que estas enfermedades genéticas pueden contarse entre las más frecuentes de las enfermedades genéticas metabólicas. De todas las maneras, hay que mencionar que, cada una de ellas, tomadas por separado, presentan una prevalencia baja.

## **9 La patología mitocondrial en España**

En 1988 se describieron las primeras mutaciones en el mtDNA, consistentes en deleciones, mutaciones puntuales en los genes codificantes de proteínas y en tRNAs. Un poco más tarde, en 1991, se describieron los primeros casos de depleción. En 1990, y anticipando la importancia futura de este campo en la medicina, creamos en nuestro laboratorio la primera unidad en España de diagnóstico genético-molecular de enfermedades mitocondriales en la Universidad de Zaragoza. Desde entonces, este servicio ha crecido mucho y, actualmente, se reciben muestras de diversos hospitales que abarcan una amplia zona geográfica de España, de Italia y de diversos países de América latina. En él se realiza el diagnóstico de rutina en patología mitocondrial analizando las mutaciones más comunes asociadas a cada una de las enfermedades. Cuando los resultados son negativos y se tienen todos los indicios de que se trata de una mitocondriopatía, se lleva a cabo un estudio de investigación con el fin de poder encontrar mutaciones nuevas que originen la enfermedad. El hallazgo de una mutación nueva implica que hay que determinar si realmente es patológica. Como el índice de mutación del mtDNA es muy alto, es bastante posible encontrar un gran número de mutaciones puntuales. Sin embargo, la mayoría son mutaciones silenciosas, polimorfismos, que no van a causar ningún tipo de defecto. Para

Tabla 1.— Mutaciones en el DNA mitocondrial y enfermedades asociadas. Una lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos puede encontrarse en MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, 2005 <http://www.mitomap.org>

| <b>Enfermedad</b>                    | <b>Mutación</b>      | <b>Gen</b>               |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------------|
| LHON                                 | G3460A               | ND1                      |
|                                      | G11778A              | ND4                      |
|                                      | T14484C              | ND6                      |
| NARP                                 | T8993G               | ATP6                     |
|                                      | T8993C               | ATP6                     |
| Leigh                                | T8993G               | ATP6                     |
|                                      | T8993C               | ATP6                     |
| MELAS                                | A3243G               | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> |
|                                      | Diversas             | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> |
| MERRF                                | A8344G               | tRNA <sup>Lys</sup>      |
|                                      | G8363A               | tRNA <sup>Lys</sup>      |
|                                      | Diversas             | tRNA <sup>Lys</sup>      |
| Diabetes y Sordera                   | A3243G               | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> |
| Cardiomiopatía (MICM)                | A4269G               | tRNA <sup>Ile</sup>      |
|                                      | A4300G               | tRNA <sup>Ile</sup>      |
| Sordera inducida por aminoglicósidos | A7445G               | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> |
|                                      | 7471insC             | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> |
| Sordera sensoneural                  | T7510C               | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> |
|                                      | T7511C               | tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> |
| Lipomatosis múltiple simétrica       | A8344G               | tRNA <sup>Lys</sup>      |
| CPEO                                 | A3243G               | tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> |
|                                      | G5920A               | COI                      |
| Intolerancia al ejercicio            | G11832A              | ND4                      |
|                                      | G12334A              | tRNA <sup>Leu(CUN)</sup> |
|                                      | Diversas             | Citocromo b              |
|                                      | T9176C               | ATPase 6                 |
|                                      | T14487C              | ND6                      |
| Necrosis Bilateral del estriado      | G14457A              | ND6                      |
| Pearson                              | Deleción única       |                          |
| Kearns-Sayre                         | Deleción única       |                          |
| MNGIE                                | Deleciones múltiples |                          |



que una mutación pueda ser considerada como patogénica requiere que cumpla los siguientes criterios: 1) estar presente solamente en pacientes y nunca en individuos controles; 2) afectar a poblaciones étnicas diferentes; 3) encontrarse en líneas mitocondriales diferentes; 4) existencia de una correlación entre el porcentaje de la mutación y el fenotipo; 5) segregarse junto con el fenotipo; 6) afectar a una base muy conservada evolutivamente; 7) afectar a dominios funcionales importantes; 8) presencia de un porcentaje mayor de la mutación en fibras cox negativas (ver más adelante); y 9) transmisión del defecto molecular a líneas celulares transmitocondriales. Sin embargo, no siempre se cumplen todos estos criterios y puede tratarse de mutaciones patológicas.

En muchos casos, para poder demostrar que la mutación tiene un efecto fenotípico, se procede a la utilización de modelos celulares con híbridos transmitocondriales. Estas líneas celulares se construyen mediante fusión de células rho cero, que carecen de mtDNA, con plaquetas del paciente que portan mitocondrias con el mtDNA mutado. Después de una selección de las líneas de interés, se realizan estudios de medida de respiración, de actividades de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa, de crecimiento, etc, para ver si la mutación ha originado una deficiencia de actividad. Una mutación en un gen codificante de proteínas suele crear líneas celulares con defectos en el complejo del cual forma parte el polipéptido mutado. En el caso de mutaciones en tRNAs, es la síntesis de proteínas mitocondriales lo que se ve afectada, con una disminución de la síntesis total de las mismas y la consiguiente disminución de la actividad de varios complejos respiratorios. Esta disminución de la síntesis de proteínas por mutaciones en tRNAs puede estar originada por muchas causas, entre ellas se ha descrito una disminución de la aminoacilación de los tRNAs, es decir, de unión del aminoácido al extremo 3' del tRNA. Las mutaciones en los rRNAs también afectarán a la síntesis de proteínas, pero esto está menos estudiado.

A pesar del gran avance conseguido en estos 17 años en el diagnóstico de las mitocondriopatías, muy poco se conoce todavía sobre los mecanismos patogénicos y menos aun sobre las terapias a emplear.

En estos años, nuestro servicio ha analizado más de 1.700 muestras, entre pacientes y familiares relacionados por vía materna, y se ha encontrado que solamente alrededor de un 16% de los mismos presentan alguna de las mutaciones conocidas. Se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevas mutaciones asociadas a enfermedades o nuevas enfermedades que puedan estar causadas por mutaciones en el mtDNA. Así, en nuestro laboratorio se ha encontrado numerosas deleciones nuevas asociadas a los clásicos síndromes de CPEO, Kearns-Sayre y Pearson (36), y mutaciones puntuales nuevas como la T14487C asociada a necrosis bilateral del estriado y distonía, o mutaciones en el tRNA<sup>Lys</sup> asociadas a lipomatosis múltiple simétrica (37-39) o a otras enfermedades que cursan con esta sintomatología como una más de las características de las mismas. Con todos estos resultados se han

presentado cuatro Tesis Doctorales sobre patología mitocondrial y se han publicado más de 50 artículos en revistas científicas.

El apogeo de las enfermedades mitocondriales ha llevado a otros grupos en España a establecer otros centros de diagnóstico, fundamentalmente en Madrid y Barcelona, si bien nuestro servicio es el que más muestras recibe. Desde hace tres años, estos y otros centros se han reunido en una red temática de investigación cooperativa sobre enfermedades del sistema OXPHOS (Red Mitoespaña) con el fin de aunar esfuerzos, unificar protocolos de diagnóstico clínico, histoquímico, bioquímico y genético, y de, si es posible, enfrentar una terapia de las mismas.

Además, desde finales de los años 90, se viene observando que la variación genética poblacional en el mtDNA es un factor importante en el desarrollo de las enfermedades multifactoriales asociadas a la edad y en la longevidad y recientemente se están acumulando evidencias acerca del papel de las mutaciones en el mtDNA y el desarrollo del cáncer. Nuestro grupo también ha sido pionero en el desarrollo de este campo. Así a mediados de los 90, se comenzó a estudiar la influencia de estos polimorfismos mitocondriales en distintos fenotipos y se pudo detectar que el haplogrupo T está sobre representado en la astenozoospermia moderada (40).

Nuestro trabajo de más de 15 años en mitocondriopatías y fenotipos multifactoriales nos está permitiendo plantearnos retos más ambiciosos como la farmacogenómica mitocondrial y el sistema OXPHOS como diana farmacológica en las enfermedades multifactoriales y el cáncer.

## **Agradecimientos**

Parte de los trabajos aquí descritos han sido subvencionados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI04-0009), Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC 2001-2421), Diputación General de Aragón (Grupo Consolidado B33) y por Redes de Enfermedades Mitocondriales (Mitoespaña) y de Ataxias del Instituto de Salud Carlos III (G03-011 y G03-056.)

## Referencias

- [1] Ephrussi, B, Hottinguer, H, Tavlitzki, J: 1949 “Action de l’acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant “petite colonie”.” *Ann. Ins. Pasteur* **76**, 351-367.
- [2] Nass, MMK, Nass, S: 1963 “Intramitochondrial fibers with DNA characteristics”. *J. Cell. Biol.* **19**, 593-629.
- [3] Anderson, S, Bankier, AT, Barrell, BG, de-Bruijn, MHL, Coulson, AR, Drouin, J, Eperon, IC, Nierlich, DP, Roe, BA, Sanger, F, Schreier, HP, Smith, AJH, Stader, R, Young, IG: 1981 “Sequence and organization of the human mitochondrial genome”. *Nature* **290**, 427-465.
- [4] Legros, F, Malka, F, Frachon, P, Lombes, A, Rojo, M: 2004 “Organization and dynamics of human mitochondrial DNA”. *J Cell Sci* **Pt.**
- [5] Garrido, N, Griparic, L, Jokitalo, E, Wartiovaara, J, van der Blik, AM, Spelbrink, JN: 2003 “Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids”. *Mol Biol Cell* **14**, 1583-1596.
- [6] Robberson, DL, Kasamatsu, H, Vinograd, J: 1972 “Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 713-741.
- [7] Shoubridge, EA: 2002 “The ABCs of mitochondrial transcription”. *Nat Genet* **31**, 227-228.
- [8] Kasamatsu, H, Vinograd, J: 1974 “Replication of circular DNA in eukaryotic cells”. *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 695-719.
- [9] Clayton, DA: 1982 “Replication of animal mitochondrial DNA”. *Cell* **28**, 693-705.
- [10] Bowmaker, M, Yang, MY, Yasukawa, T, Reyes, A, Jacobs, HT, Huberman, JA, Holt, IJ: 2003 “Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone”. *J Biol Chem*
- [11] Yasukawa, T, Yang, MY, Jacobs, HT, Holt, IJ: 2005 “A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA”. *Mol Cell* **18**, 651-662.
- [12] Davidzon, G, Mancuso, M, Ferraris, S, Quinzii, C, Hirano, M, Peters, HL, Kirby, D, Thorburn, DR, Dimauro, S: 2005 “POLG mutations and Alpers syndrome”. *Ann Neurol* **57**, 921-923.
- [13] Saada, A: 2004 “Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity”. *DNA Cell Biol* **23**, 797-806.

- [14] Elpeleg, O, Miller, C, HersHKovitz, E, Bitner-Glindzicz, M, Bondi-Rubinstein, G, Rahman, S, Pagnamenta, A, Eshhar, S, Saada, A: 2005 “Deficiency of the ADP-Forming Succinyl-CoA Synthase Activity Is Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial DNA Depletion”. *Am J Hum Genet* **76**, 1081-1086.
- [15] Holt, IJ, Harding, AE, Morgan-Hughes, JA: 1988 “Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies”. *Nature* **331**, 717-719.
- [16] Ojala, D, Montoya, J, Attardi, G: 1981 “tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria.” *Nature* **290**, 470-474.
- [17] Montoya, J, Ojala, D, Attardi, G: 1981 “Distinctive features of the 5′-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs.” *Nature* **290**, 465-470.
- [18] Montoya, J, Christianson, T, Levens, D, Rabinowitz, M, Attardi, G: 1982 “Identification of Initiation Sites for Heavy Strand and Light Strand Transcription in Human Mitochondrial DNA.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7195-7199.
- [19] Montoya, J, Gaines, GL, Attardi, G: 1983 “The Pattern of Transcription of the Human Mitochondrial rRNA Genes Reveals Two Overlapping Transcription Units.” *Cell* **34**, 151-159.
- [20] Fernández-Vizarra, E, Fernandez-Silva, P, López-Pérez, MJ, Montoya, J: 2005. Advances in mammalian mitochondrial DNA transcription. En: (Eds) Advances in mammalian mitochondrial DNA transcription Villarroya, F. Kerala, India Research Signpost 1-19
- [21] Dubin, DT, Montoya, J, Timk, KD, Attardi, G: 1982 “Sequence Analysis and Precise Mapping of the 3′-ends of HeLa Cell Mitochondrial Ribosomal RNAs.” *J. Mol. Biol.* **157**, 1-19.
- [22] Kruse, B, Narasimhan, N, Attardi, G: 1989 “Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination.” *Cell* **58**, 391-397.
- [23] Daga, A, Micol, V, Hess, D, Aebersold, R, Attardi, G: 1993 “Molecular Characterization of the Transcription Termination Factor from Human Mitochondria”. *J Biol Chem* **268**, 8123-8130.
- [24] Fernandez-Silva, P, Martínez-Azorin, F, Micol, V, Attardi, G: 1997 “The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions”. *EMBO J* **16**, 1066-1079.
- [25] Prieto-Martin, A, Montoya, J, Martínez-Azorin, F: 2004 “Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA”. *Nucleic Acids Res* **32**, 2059-2068.

- [26] Tiranti, V, Savoia, A, Forti, F, D'Apollito, MF, Centra, M, Racchi, M, Zeviani, M: 1997 "Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database". *Hum Mol Genet* **6**, 615-625.
- [27] Prieto-Martín, A, Montoya, J, Martínez-Azorín, F: 2001 "A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein". *Febs Lett* **503**, 51-55.
- [28] Fisher, RP, Clayton, DA: 1985 "A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase". *J Biol Chem* **260**, 11330-11338.
- [29] Falkenberg, M, Gaspari, M, Rantanen, A, Trifunovic, A, Larsson, NG, Gustafsson, CM: 2002 "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA". *Nat Genet* **31**, 289-294.
- [30] Prieto-Martín, A, Montoya, J, Martínez-Azorín, F: 2004 "New DNA-Binding Activity of Rat Mitochondrial Transcription Termination Factor (mTERF)". *J Biochem (Tokyo)* **136**, 825-830.
- [31] Jacobs, HT, Turnbull, DM: 2005 "Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease". *Trends Genet* **21**, 312-314.
- [32] Enríquez, JA, Fernandezsilva, P, Pérezmartos, A, Lópezpérez, MJ, Montoya, J: 1996 "The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP". *Eur J Biochem* **237**, 601-610.
- [33] Enríquez, JA, Fernandez-Silva, P, Garrido-Pérez, N, López-Pérez, MJ, Pérez-Martos, A, Montoya, J: 1999 "Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone". *Mol Cell Biol* **19**, 657-670.
- [34] Enríquez, JA, Lópezpérez, MJ, Montoya, J: 1991 "Saturation of the Processing of Newly Synthesized rRNA in Isolated Brain Mitochondria". *FEBS Lett* **280**, 32-36.
- [35] Ostronoff, LK, Izquierdo, JM, Cuezva, JM: 1995 "mt-mRNA stability regulates the expression of the mitochondrial genome during liver development". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1094-1098.
- [36] Solano, A, Gámez, J, Carod, FJ, Pineda, M, Playán, A, López-Gallardo, E, Andreu, AL, Montoya, J: 2003 "Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA". *J Med Genet* **40**, e86.
- [37] Gámez, J, Playán, A, Andreu, AL, Bruno, C, Navarro, C, Cervera, C, Arbós, MA, Schwartz, S, Enríquez, JA, Montoya, J: 1998 "Familial multiple symmetric lipomatosis associated with the A8344G mutation of mitochondrial DNA". *Neurology* **51**, 258-260.

- [38] Solano, A, Roig, M, Vives-Bauza, C, Hernández-Pena, J, García-Arumi, E, Playan, A, López-Pérez, MJ, Andreu, AL, Montoya, J: 2003 “Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene”. *Ann Neurol* **54**, 527-530.
- [39] Pineda, M, Solano, A, Artuch, R, Andreu, AL, Playan, A, Vilaseca, MA, Colomer, J, Briones, P, Casademont, J, Montoya, J: 2004 “Peripheral Neuropathy with Ataxia in Childhood as a Result of the G8363A Mutation in Mitochondrial DNA”. *Pediatr Res* **56**, 55-59.
- [40] Ruiz-Pesini, E, Lapeña, AC, Díez-Sánchez, C, Pérez-Martos, A, Montoya, J, Álvarez, E, Diaz, M, Urries, A, Montoro, L, López-Pérez, MJ, Enríquez, JA: 2000 “Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa”. *Am J Hum Genet* **67**, 682-696.