

ALTERACIONS DEL DNA MITOCONDRIAL IMPLICADES EN PATOLOGIA HUMANA

VIRGINIA NUNES¹, MONTSE GÓMEZ¹ I JORDI CASADEMONT²

¹*Centre de Genètica Mèdica i Molecular-IRO. Hospital Duran i Reynals.*

²*Grup d'Investigació Muscular. Departament de Medicina. Hospital Clínic, IDIBAPS i Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Virginia Nunes. Centre de Genètica Mèdica i Molecular-IRO. Hospital Duran i Reynals. Autovia de Castelldefels, Km 2,7. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. Tel.: 93 260 77 75. Fax: 93 260 77 76. adreça electrònica: vnunes@iro.es.

Paraules claus: DNA, mitocondris, patologia mitocondrial, mutació puntual, deleció

Key words: DNA, mitochondria, mitochondrial pathology, point mutation, deletion.

INTRODUCCIÓ

La majoria dels gens humans es localitzen al nucli de la cèl·lula i s'hereten d'ambdós progenitors. N' existeixen d'altres que es troben al citoplasma, concretament a l'interior dels mitocondris, i són d'origen exclusivament matern. Aquests formen el genoma mitocondrial humà. És a partir de l'any 1988, any en el qual es descobreixen les primeres mutacions al DNA mitocondrial (mtDNA) responsables de malaltia humana, que s'inicia l'estudi de la genètica de les malalties mitocondrials (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988a). D'aleshores ençà, i mitjançant la utilització de la genètica molecular, s'ha pogut establir que les mutacions del mtDNA poden ser responsables de moltes síndromes clíniques fins fa poc no suficientment caracteritzades, i s'ha obert la possibilitat d'entendre'n, si més no parcialment, la patogènesia.

MITOCONDRI, DNA MITOCONDRIAL I CADENA RESPIRATÒRIA

Els mitocondris són petits orgànuls (0,5-1 µm) que es localitzen al citoplasma de totes les cèl·lules eucariotes. Presenten una membrana interna i una d'externa, que delimiten diferents compartiments funcionals (figura 1). La membrana interna conté les subunitats proteiques de la cadena respiratòria mitocondrial, via metabòlica que proporciona aproximadament el 90 % del total d'ATP necessari per al manteniment de les funcions vitals de la cèl·lula. Aquesta

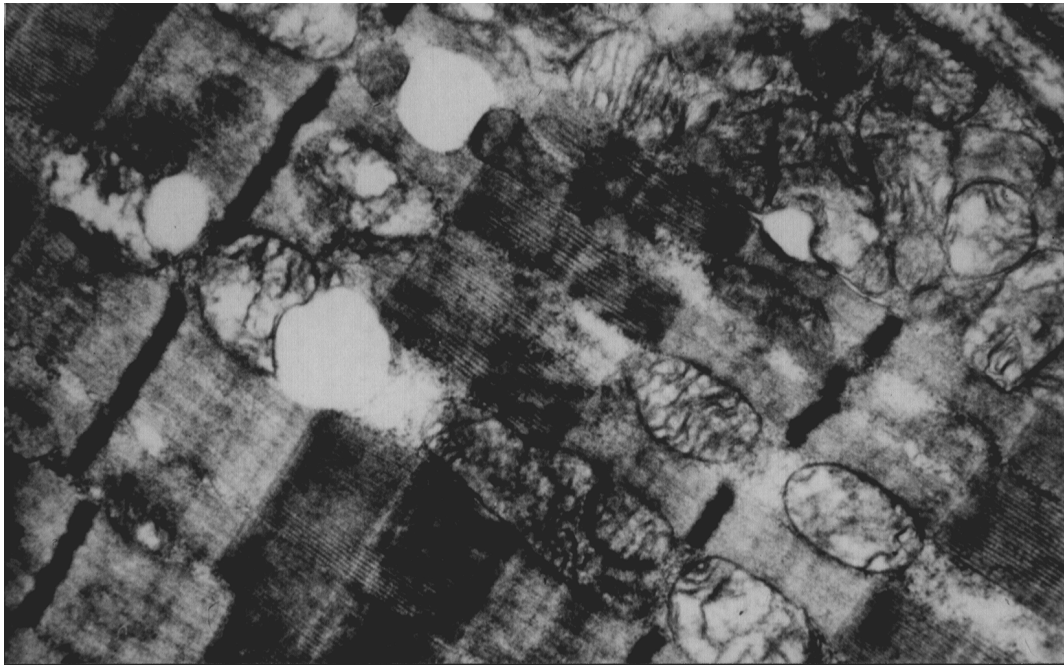


FIGURA 1. Teixit muscular humà normal on s'aprecien diversos mitocondris situats entre les miofibril·les i, ocasionalment, en contacte amb vacúols lipídics. MET x 10.000.

cadena respiratòria està formada per cinc complexos multienzimàtics que funcionen com a transportadors d'electrons: el complex I (NADH-CoQ reductasa, constituït aproximadament per quaranta subunitats), el complex II (succinat-CoQ reductasa, quatre subunitats), el complex III (ubiquinona citocrom *c* reductasa, deu subunitats), el complex IV (citocrom *c* oxidasa, vuit subunitats), i finalment el complex V o ATPasa (atorze subunitats), que garanteix la síntesi d'ATP a partir d'ADP i de fosfat inorgànic.

El nombre de mitocondris per cèl·lula pot variar àmpliament des de desenes fins a diversos milers, segons els requeriments energètics de cada teixit. Així, el cervell i el múscul esquelètic, que són teixits molt dependents de la fosforilació oxidativa per obtenir energia, són molt rics en mitocondris.

Cada mitocondri posseeix de dues a deu còpies de mtDNA. El mtDNA és una petita molècula circular de doble cadena, de 16,5 kb, localitzada en la matriu mitocondrial (Anderson *et al.*, 1981) (figura 2). El mitocondri, probablement descendent de cèl·lules procariotes que en una fase molt inicial de l'evolució sobre la terra entraren en simbiosi amb les cèl·lules eucariotes primitives, ha perdut bona part de l'autonomia com a conseqüència de la disminució de la mida del seu genoma, que ha passat al nucli cel·lular (Lang *et al.*, 1997). Les dues cadenes de DNAm_t difereixen en la seva composició de bases. La cadena pesada (HS, *heavy strand*) posseeix més residus de guanina; la cadena lleugera (LS, *light strand*) posseeix més residus citosina (figura 2). El DNAm_t està molt compactat i gairebé tot és seqüència codificant. Conté trenta-set gens

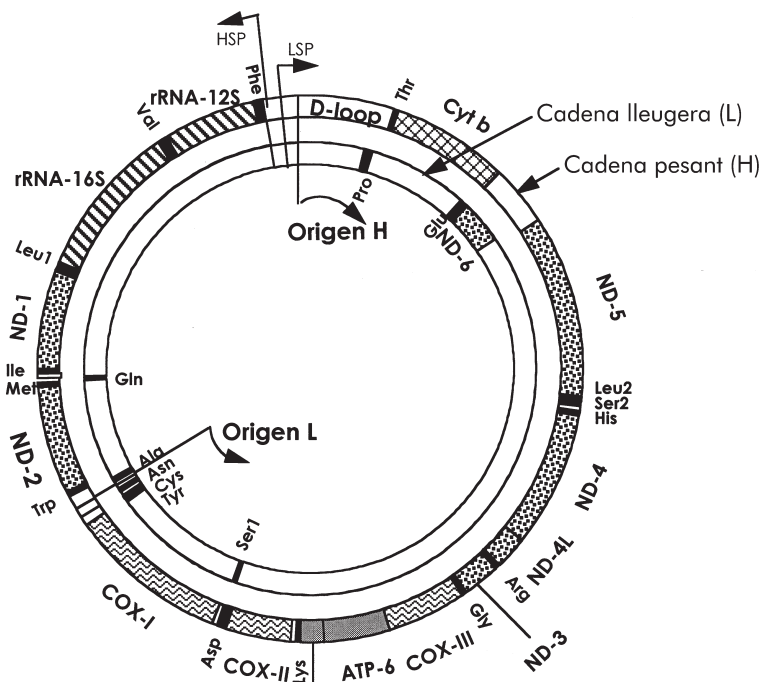


FIGURA 2. El mtDNA humà. Se n'indiquen la cadena pesada i la lleugera, juntament amb els gens que es transcriuen a partir de cadascuna. Origen H i Origen L són els orígens de replicació de la cadena pesada i de la lleugera, respectivament. LSP és el promotor per a la transcripció de la cadena lleugera. HSP és el promotor per a la cadena pesada. D-loop, bucle de desplaçament. ATPasa 6 i ATPasa 8 són els gens que codifiquen a l'ATPasa/ATP sintasa. Cyt b, citocrom b del complex III. COX I a COX III són gens que codifiquen a subunitats del complex IV. ND1 a ND6 són gens que codifiquen a subunitats del complex I.

que codifiquen: tretze proteïnes, totes elles subunitats de la cadena respiratòria, set gens del complex I o NADH deshidrogenasa (ND1 a ND6), un gen del complex III (citocrom b), tres gens del complex IV o citocrom *c* oxidasa (COXI a COXIII), dos gens del complex V o ATPasa (A6 i A8), vint-i-dos tRNA i dos rRNA (figura 2). Els gens estan repartits entre les dues cadenes, però la majoria es localitzen sobre la cadena pesada. La presència de gens en les dues cadenes implica que ambdues són transcrites. Les seqüències no codificants són escasses: la més llarga és el bucle de desplaçament (D-loop) que té al voltant d'1 kb i conté diverses regions que regulen la replicació i transcripció del genoma mitocondrial

(Clayton, 1982). La resta de pèptids del mitocondri són codificats pel DNA nuclear, sintetitzats en el citoplasma de la cèl·lula i transferits al mitocondri per un sistema d'import específic (Pfanter *et al.*, 1994). Per tant, cal tenir present que el mitocondri és dependent de proteïnes codificades pel genoma nuclear per a la majoria de les seves funcions.

CARACTERÍSTIQUES DEL mtDNA

Existeixen tota una sèrie de característiques que diferencien el mtDNA del nuclear: a) el mtDNA s'hereta de manera gairebé exclusiva de la mare, ja que l'òvul aporta

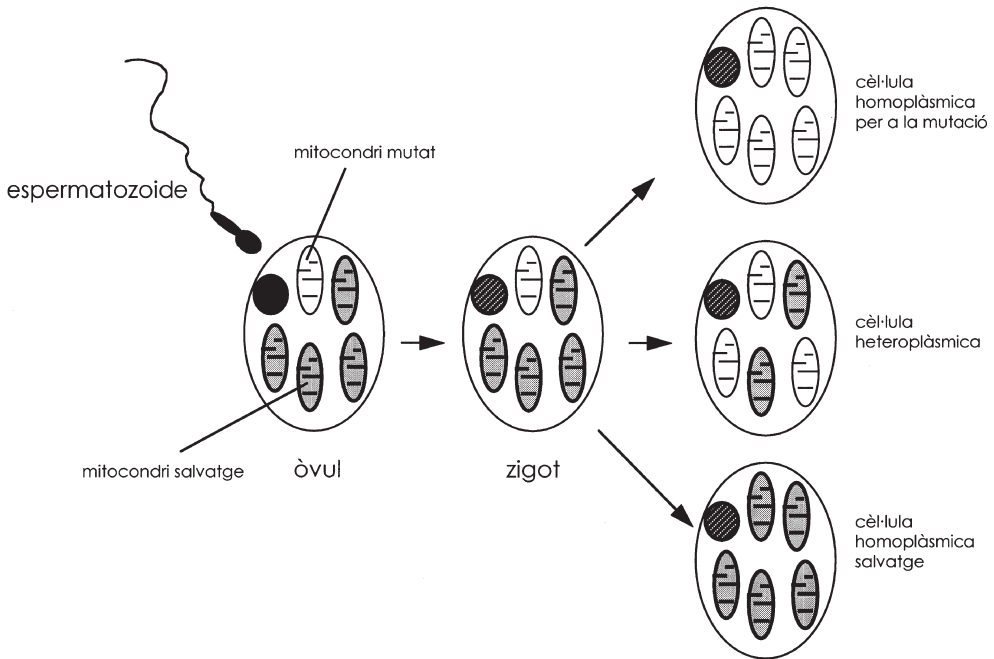


FIGURA 3. Segregació a l'atzar dels mitocondris. En el moment de la fecundació és l'òvul qui aporta pràcticament la totalitat dels mitocondris al zigot. En els subsegüents processos de divisió cel·lular, els mitocondris es distribueixen a l'atzar en les cèl·lules filles.

pràcticament tot el citoplasma del zigot en formació; *b*) no es replica de manera sincrònica amb la divisió cel·lular; *c*) posseeix un codi genètic diferent; *d*) presenta una alta taxa de mutació, de deu a cent vegades superior a la del genoma nuclear, possiblement per causa de la manca d'histones que confereixen una certa protecció, i possiblement també per la falta d'un sistema efectiu i precís de reparació (Richter *et al.*, 1988). En els casos de les malalties genètiques degudes a mutacions al DNA nuclear en què la mutació és present a cada una de les cèl·lules d'un individu, els pacients amb malalties mitocondrials rarament presenten un únic tipus de mtDNA. Generalment, per tant, es troben en coexistència en una mateixa cèl·lula molècules normals (salvatges) amb molècules mutades, estat anome-

nat d'*heteroplàsmia*, en contraposició a la situació normal anomenada d'*homoplàsmia*. Quan hi ha heteroplàsmia, la proporció d'ambdós tipus de molècules varia entre teixits i cèl·lules al llarg de la vida i permet una distribució a l'atzar dels mitocondris durant la divisió cel·lular (Wallace, 1986) (figura 3). Cada teixit requereix una proporció diferent de molècules de mtDNA mutades perquè el fenotip patològic es manifesti (efecte llindar) (Boulet *et al.*, 1992). Les mutacions que tenen una repercussió severa o letal en la fosforilació oxidativa són únicament viables en heteroplàsmia. En contraposició, moltes de les mutacions més lleus, de canvi d'un nucleòtid en el mtDNA en regions de gens que codifiquen per a proteïnes, poden ser homoplàsmiques.

REPLICACIÓ DEL mtDNA

La replicació del mtDNA és unidireccional i asimètrica. Requereix un origen de replicació per a la síntesi de la cadena pesada (O_H) localitzat al bucle de desplaçament (*D-loop*), i un altre per a la síntesi de la cadena lleugera (O_L) situat entre els gens del tRNA^{Cys} i tRNA^{Asn}. La regió *D-loop* conté també els promotors de la transcripció de les dues cadenes i les seqüències de regulació (Montoya *et al.*, 1982) (figura 2). La replicació s'inicia en un únic origen a la cadena pesada (O_H). El *D-loop* és una regió de triple cadena que posseeix permanentment un fragment de cadena pesada (DNA 7S) complementari a la cadena lleugera. Aquest DNA 7S se sintetitza a partir d'un petit RNA transcrit a nivell del promotor de transcripció de la cadena pesada i representa al voltant d'uns set-cents nucleòtids. La síntesi de la cadena pesada comença al DNA 7S i va avançant al llarg de la molècula de DNAm_t en el sentit de les agulles del rellotge, utilitzant 7S com a encebador per a l'acció d'una DNA polimerasa. La cadena filla va desplaçant la cadena parental formant el bucle de desplaçament i continua de forma unidireccional al voltant de tot el DNA. La síntesi de la cadena lleugera requereix una primasa específica i comença quan l'origen de replicació (O_L) es troba en forma de cadena senzilla, com a conseqüència del desplaçament de la cadena H, i continua en direcció oposada (Chang *et al.*, 1987).

TRANSCRIPCIÓ DEL mtDNA

La transcripció es fa de manera asimètrica a partir dels dos promotors, un per a cadascuna de les cadenes (HSP, *H-strand promoter* i LSP, *L-strand promoter*), situats al *D-loop* (Clayton, 1982) (figura 2). Els dos promotors de transcripció tenen orienta-

cions oposades. La cadena pesada es transcriu en el sentit contrari a les agulles del rellotge. Es requereix una RNA polimerasa mitocondrial, el factor de transcripció A (*h-mtTFA*) (*human mitochondrial transcription factor A*) i altres factors addicionals. La proteïna *h-mTFA* s'uneix a l'inici de la regió de cadascun dels promotors i activa la transcripció (Shadel *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1992). La transcripció dona lloc a un transcrit primari corresponent a la totalitat del genoma, que és posteriorment tallat a la regió dels tRNA per alliberar els mRNA, els rRNA i els tRNA. Seguidament, els missatgers són poliadenilats (Montoya *et al.*, 1983), fet que posteriorment permet crear els codons de terminació. No tots els gens es transcriuen en la mateixa quantitat. Així, la transcripció dels rRNA finalitza just després del gen que codifica el rRNA 16S, i és de quinze a seixanta vegades més freqüent que la transcripció de la cadena H completa (Attardi *et al.*, 1989). En aquest procés de terminació de la transcripció a l'extrem 3' del rRNA 16S intervé una proteïna, el factor de terminació (*mtTER*), que s'uneix a una seqüència situada al gen del tRNA^{Leu} (Kruse *et al.*, 1989; Daga *et al.*, 1993). La terminació de la segona unitat de transcripció es produeix a l'extrem 3' del tRNA^{Thr}.

TRADUCCIÓ

Els mRNA mitocondrials tradueixen el seu missatge dins dels mitocondris en ribosomes específics. Els components d'aquests ribosomes són codificats pels dos sistemes genètics de la cèl·lula. Els rRNA són codificats pel DNA mitocondrial mentre que les proteïnes requerides ho són pel genoma nuclear (figura 4). El coeficient de sedimentació dels ribosomes mitocondrials és de 55S amb subunitats de 28S i 39S que contenen trenta-tres i cinquanta-dues proteïnes res-

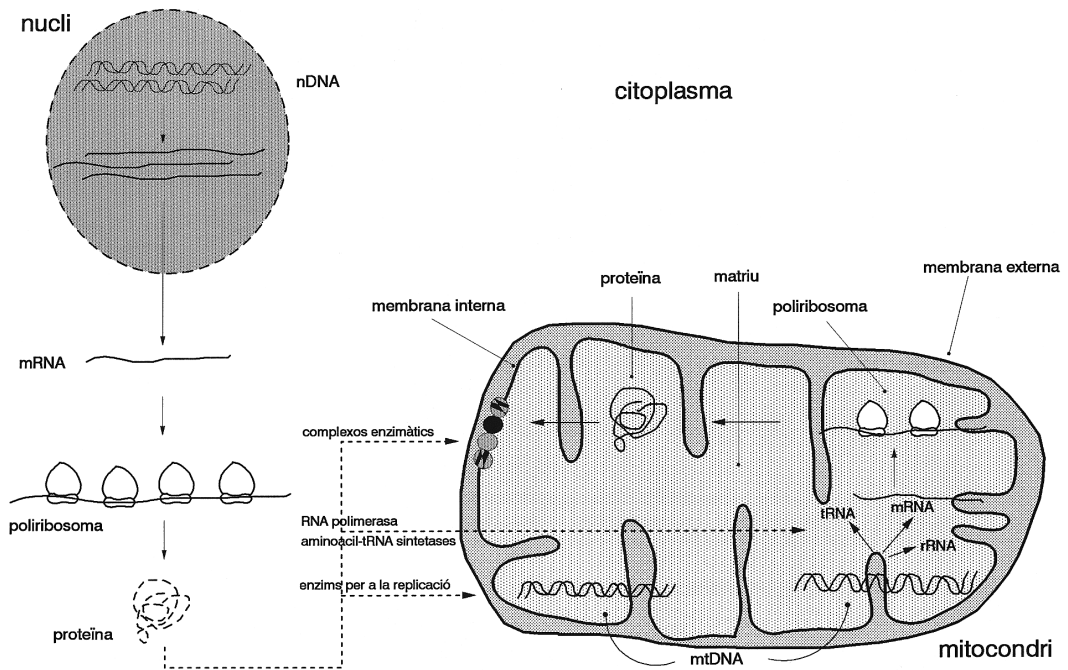


FIGURA 4. Biogènesi del mitocondri. El DNAm_t es troba unit per algun punt a la membrana interna (per facilitar l'esquema s'ha representat en forma lineal, tot i la seva estructura circular). Es transcriu en tres tipus de RNA: ribosòmic, missatger i de transferència. Polipèptids codificats pel mtDNA i polipèptids codificats pel DNA nuclear s'associen per a formar els complexos de la cadena respiratòria. La major part de proteïnes que formen els mitocondris i les necessàries per a l'expressió del mtDNA són codificades per gens del nucli, se sintetitzen al citoplasma i són transportades a l'interior del mitocondri. Mutacions a qualsevol d'aquestes etapes podrien provocar una malaltia mitocondrial.

pectivament (Matthews *et al.*, 1982). El codi genètic dels mitocondris és lleugerament diferent del codi universal. El codó UGA codifica l'aminoàcid triptòfan, en lloc de per un codó de terminació; AUA és un codó per metionina i no per isoleucina. AUA i AUU funcionen com a codons d'iniciació, AUG, AGA i AGG són codons de finalització, en lloc de codificar per arginina (Barrell *et al.*, 1979). Una altra característica del sistema genètic mitocondrial és que utilitza un model de reconeixement de codons inusual que li permet llegir el codi genètic amb tan sols els vint-i-dos tRNA codificats pel genoma mitocondrial.

MALALTIES MITOCONDRIALS

Tradicionalment les malalties mitocondrials han estat definides com a processos morbosos heretables causats per la deficiència de proteïnes del mitocondri (McKusick, 1992; Wallace, 1992). D'una manera més selectiva, però, hi ha una tendència a reservar aquest nom per als trastorns que afecten l'últim pas de les vies metabòliques mitocondrials, concretament la cadena respiratòria. Recentment s'ha demostrat que aquest tipus de defectes poden ser adquirits i tenir un paper en algunes malalties degeneratives (Wallace, 1992). Una de les característiques de

les malalties mitocondrials és la gran varietat de símptomes clínics amb què es poden manifestar. Els òrgans més freqüentment afectats són el sistema nerviós central, el múscul esquelètic i el cor, però altres òrgans hi poden estar implicats, ja sigui aïlladament o bé en conjunció amb altres per donar lloc a síndromes multisistèmiques (figura 5).

Les malalties mitocondrials es poden classificar segons les característiques clíniques i/o bioquímiques, però una de les classificacions més utilitzades en els darrers anys és la basada en els defectes genètics, que individualitza tres grans grups: A) malalties degudes a defectes primaris del mtDNA; B) malalties degudes a defectes genètics nuclears, i C) malalties per problemes en la comunicació nucli-mitocondri.

A) Malalties degudes a defectes primaris del mtDNA. Inclouen la presència de reordenaments i de mutacions puntuals.

A.1. Reordenaments. Els reordenaments també es poden subdividir en dos tipus: delecions i duplicacions.

A.1.1. Les delecions s'han descrit en moltes malalties mitocondrials esporàdiques i la majoria de dones que les posseeixen no les transmeten a la descendència (Larsson *et al.*,1992). Són delecions de gran mida, superiors a 1,5 kb, úniques, i es troben sempre en heteroplàsmia. La proporció de molècules delecionades en els diferents teixits d'un individu és molt variable. Aquesta distribució tissular i la segregació durant el desenvolupament i la vida adulta són factors importants per determinar el fenotip del malalt.

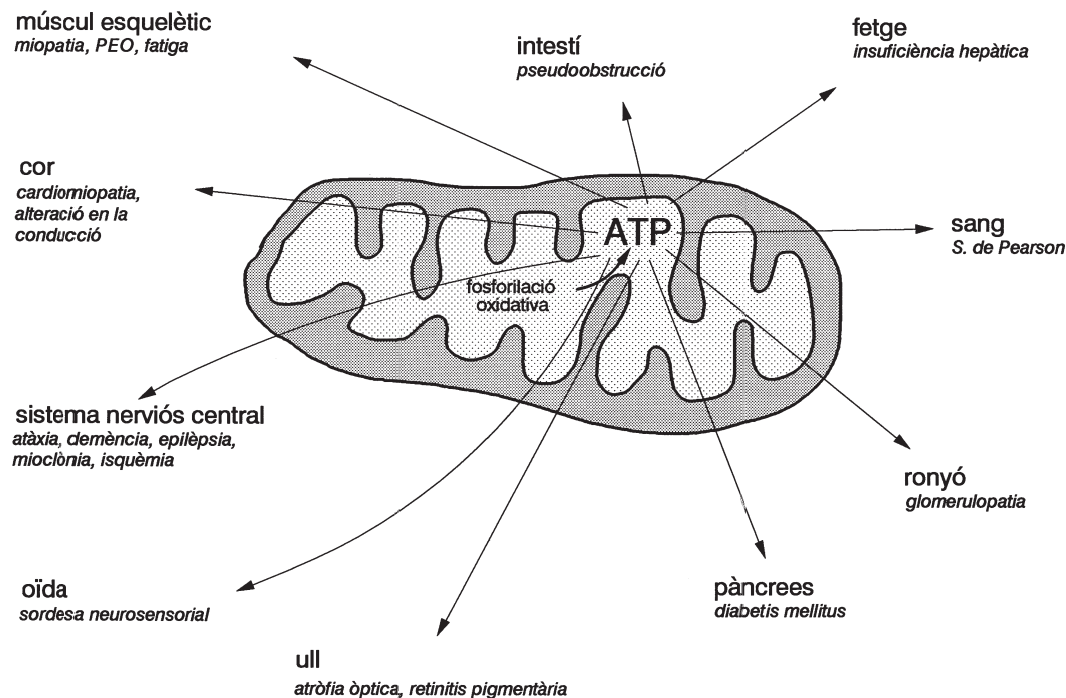


FIGURA 5. Implicacions mitocondrials en diverses patologies humanes. Tots els òrgans o teixits indicats depenen en major o menor grau de l'ATP que es produeix en el procés de fosforilació oxidativa mitocondrial. Un dèficit en la producció d'ATP té efectes deleters en diversos sistemes i òrgans, i dona lloc a algunes formes dels trastorns indicats.

Aquest tipus de reordenament es va descriure per primera vegada el 1988 (Holt *et al.*, 1988). L'expressió fenotípica de la malaltia és diferent en nens que en adults. En la infantesa la malaltia es presenta freqüentment com un defecte multiorgànic (Cormier *et al.*, 1994; Rötig *et al.*, 1989; Tulinius *et al.*, 1995). Els pacients adults, en canvi, habitualment presenten oftalmoplegia externa progressiva (PEO), ja sigui de manera aïllada, ja sigui com a part de la síndrome de Kearns-Sayre, que es caracteritza per la presència d'oftalmoplegia, ptosi, retinitis, atàxia, blocatges de la conducció cardíaca i una elevada concentració de proteïnes en el líquid cerebrospinal (Holt *et al.*, 1988; Lestienne *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1989; Barrientos *et al.*, 1995a). Les diferències entre nens i adults es poden explicar, en part, per la distribució de les delecions en els teixits. Una alta proporció de molècules delecionades en els teixits implica un desenvolupament ràpid de la malaltia, que afectarà múltiples òrgans. Al llarg del temps es poden acumular en teixits postmitòtics nivells baixos de molècules delecionades, fet que propiciaria un inici tardà de la malaltia que afectaria especialment cervell i teixit muscular, però que pot afectar, també, altres estructures (Barrientos *et al.*, 1997).

En edat perinatal, les delecions del mtDNA de vegades causen la síndrome de Pearson, que es caracteritza per anèmia sideroblàstica severa, trombocitopènia, neutropènia i disfunció pancreàtica exocrina (Rötig *et al.*, 1989). La majoria dels nascuts amb síndrome de Pearson moren en el primer any de vida, però alguns es recuperen i després desenvolupen una síndrome de Kearns-Sayre (Larsen *et al.*, 1990).

En tots els casos de delecions del mtDNA esporàdiques s'ha detectat un únic tipus de delecio per a cada malalt, que coexisteix amb les molècules de mtDNA normal. La mida i localització de les delecions varia d'un ma-

lalt a l'altre, si bé existeix una delecio molt freqüent, present en aproximadament un terç dels malalts, denominada per aquest motiu «delecio comuna». Aquesta delecio, d'un 4,9 kb, està flanquejada per dues repeticions de tretze parells de bases que representen «llocs calents» per a la formació de delecions en el mtDNA humà (Holt *et al.*, 1989; Schon *et al.*, 1989). Sobre la base de les repeticions flanquejants, s'han classificat delecions en classe I (repeticions directes perfectes) i classe II (no perfectes) (Mita *et al.*, 1990). En tots els casos les delecions impliquen la pèrdua de gens que codifiquen subunitats de la cadena respiratòria, per a tRNA i, menys freqüentment, per a rRNA. El dèficit enzimàtic que es produeix pot tenir tres orígens: a) l'existència d'una proteïna quimèrica resultat d'un transcrit de fusio creat per la delecio; b) un defecte en la síntesi proteica degut a la delecio, c) un defecte de síntesi proteica degut a la disminucio del nombre de tRNA o rRNA i/o dels mRNA que codifiquen subunitats de la cadena respiratòria.

El mecanisme molecular que produeix les delecions úniques no és clar. Una possibilitat seria el lliscament de la DNA polimerasa durant la replicacio de la molècula de mtDNA quan les cadenes de DNA es troben en fase monocatenària, fet que es veuria afavorit per la presència de seqüències repetitives que flanquegen la delecio (Shoffner *et al.*, 1989; Schon *et al.*, 1989). Una altra possibilitat seria en processos de recombinacio homòloga (Mita *et al.*, 1990). Les delecions descrites no impliquen el O_H, O_L ni l'LSP, elements imprescindibles per a la replicacio del mtDNA. S'han publicat delecions que afecten l'HSP que comporten una pèrdua completa dels transcrits de la cadena pesada, mentre que els corresponents a la cadena lleugera es troben en nivells normals (Moraes *et al.*, 1991).

A.1.2. Les duplicacions es presenten

sempre en heteroplàsmia (Poulton *et al.*, 1989). En diverses famílies s'ha descrit la transmissió materna de molècules de mtDNA duplicades (Ballinger *et al.*, 1992, 1994; Dunbar *et al.*, 1993; Rötig *et al.*, 1992). Els pacients presentaven diferents símptomes: atàxia, sordesa, diabetis *mellitus*, oftalmoplegia, tubulopatia i síndrome de Kearns-Sayre. Una duplicació de 6,1 kb en una família amb diabetis i sordesa en un primer moment erròniament reportada com una deleció de 10,4 kb (Ballinger *et al.*, 1992, 1994). Les duplicacions parcials i les delecions úniques poden coexistir de manera que s'ha suggerit que les primeres no són més que estats transitoris cap a les segones (Larsson *et al.*, 1995; Cormier *et al.*, 1994; Clayton, 1982; Barrientos *et al.*, 1996a).

A.1.3. Existeixen delecions i duplicacions de regions no codificants del mtDNA.

Aquesta afirmació es fonamenta en l'observació que els cultius cel·lulars de teixits humans heteroplàsmics per a polimorfismes de longitud de seqüència dins de la regió de seqüència conservada (CSB II, *conserved sequence box*) no impedeixen un acurat inici de la transcripció *in vitro* (Hauswirth *et al.*, 1985). També s'ha descrit un polimorfisme de longitud d'una petita regió no codificant entre el gen de la subunitat II de la COX i el gen *tRNA^{Lys}* (Wrischnick *et al.*, 1987; Barrientos *et al.*, 1995).

A.2. Mutacions puntuals del mtDNA. S'han trobat en gens que codifiquen per a proteïnes, en gens que codifiquen per a tRNA o en gens que codifiquen per a rRNA.

A.2.1. S'han descrit diferents mutacions puntuals en gens que codifiquen proteïnes estructurals en famílies amb citopaties mitocondrials de transmissió materna. Entre

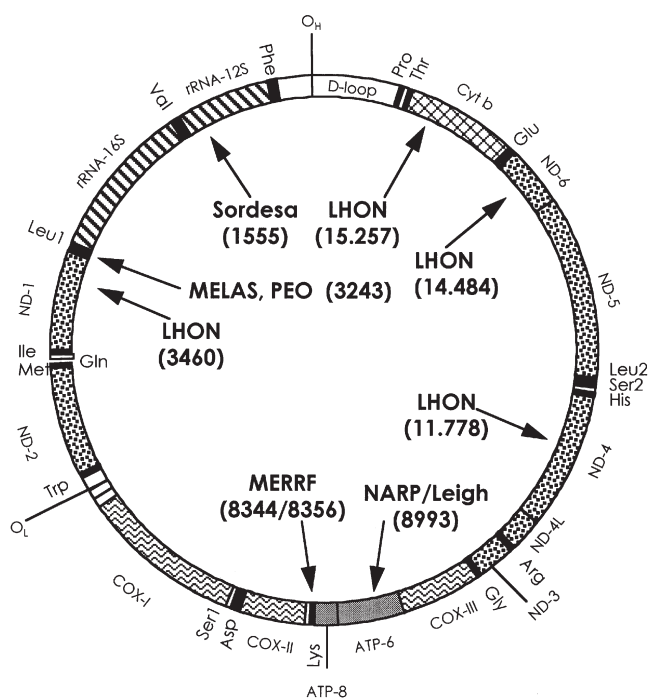


FIGURA 6. Posició en el mtDNA de les mutacions puntuals més comunes. Entre parèntesis s'indica el nucleòtid exacte en què té lloc la mutació. Les malalties estan detallades en el text.

les més freqüents hi ha les associades a atrofia òptica de Leber (LHON). Les mutacions considerades com a primàries, és a dir responsables del fenotip LHON sense la necessitat de la concurrència d'altres factors mal caracteritzats de caire genètic, mediambiental o tòxic, són tres: una transició G→A en el nucleòtid 3460, una transició G→A en el nucleòtid 11778 i una transició T→C en el nucleòtid 14484 (Howell *et al.*, 1994). La primera que es va descriure i la més freqüent, G1178A, es localitza al gen *ND4* (la subunitat 4 de la NADH deshidrogenasa) (Wallace *et al.*, 1988) (figura 6). Aquestes mutacions es troben en el 70-90 % dels malalts LHON i no han estat mai trobades en individus control. Es presenten gairebé sempre en homoplàsmia, si bé en algunes famílies s'han observat en heteroplàsmia amb ràpida segregació del DNAm mutats (Vilki *et al.*, 1990). Freqüentment són mutacions amb una baixa penetrància, de manera que la presència de la mutació en una família afecta només al voltant del 50 % del homes i del 10 % de les dones relacionats per via materna (Larsson *et al.*, 1995). S'han descrit altres mutacions que afecten gens dels complexos I, III i IV i poden tenir importància primària o, més probablement, secundària en el desenvolupament de la LHON. El caràcter secundari d'aquestes mutacions se sospita perquè s'han trobat en baixa proporció en individus control (Howell *et al.*, 1994; Wallace *et al.*, 1988). Alguns dels pacients LHON mostren imatges radiològiques de desmielinització del SNC, la qual cosa ha suggerit que mutacions al complex I podrien donar lloc a nous antígens que provocarien una resposta immune susceptible de desencadenar la neuropatia òptica i altres símptomes que poden recordar una esclerosi múltiple (Harding *et al.*, 1992).

Una altra mutació puntual «estructural» és la que afecta la subunitat 6 del complex V, concretament el nucleòtid 8993 (figura 6).

Inicialment aquest defecte es va descriure en malalts afectes d'atrofia muscular neurogènica, retinitis pigmentària i atàxia, associació coneguda amb l'acrònim NARP per les seves sigles en anglès (Holt *et al.*, 1990) (figura 6). Posteriorment s'ha observat que aquesta mutació pot donar lloc a manifestacions molt variades, que comprenen des d'una simple retinitis pigmentària fins a una síndrome de Leigh, malaltia de molt mal pronòstic, caracteritzada per una necrosi dels ganglis basals encefàlics en edat infantil. La gravetat del fenotip sembla relacionar-se clarament amb el percentatge de DNAm mutats (Tatuch *et al.*, 1992).

A.2.2. Mutacions en els tRNA

A.2.2.1. L'associació d'epilèpsia mioclònica i fibres roges rompudes (RRF) defineix la síndrome de MERRF. Aquests malalts amb freqüència presenten, a més, demència, atàxia, atrofia muscular i altres símptomes (Fukuhara *et al.*, 1980). En la majoria de pacients amb MERRF es troba una transició A→G al nucleòtid 8344 (figura 6). Aquesta mutació altera una base altament conservada del T ψ C *loop* del tRNA per la lisina. S'ha demostrat que es requereix com a mínim d'un 85 % a un 90 % de molècules de mtDNA mutades perquè aparegui una disfunció de la cadena respiratòria (Larsson *et al.*, 1992). Això fa que els familiars materns dels pacients amb MERRF portadors de la mutació normalment n'estiguin menys greument afectats, o fins i tot estiguin sans (Larsson *et al.*, 1992; Wallace *et al.*, 1988). S'ha demostrat que la mutació A8344G provoca una aminoacilació del tRNA^{Lys} defectiva i la terminació prematura de la traducció mitocondrial (Enriquez *et al.*, 1995). Aquesta mutació no es transmet sempre de mare a fill. El risc de transmissió depèn de la proporció de molècules de DNAm mutades a la mare. S'ha observat que en cal prop d'un 35-40 % perquè es doni la transmissió (Larsson *et al.*, 1992). S'ha descrit

també una segona mutació heteroplàsmica menys freqüent al tRNA^{Lys}. Es tracta d'una transició T→C al nucleòtid 8356. També en aquest cas s'ha demostrat que es pot inhibir la síntesi de proteïnes mitocondrials i l'activitat de la cadena respiratòria (Masucci *et al.*, 1995).

A.2.2.2. La síndrome de MELAS es caracteritza per la coexistència de miopatia, encefalopatia, acidosi làctica i accidents vasculars cerebrals. Al 80 % dels casos s'ha trobat una mutació puntual en estat heteroplàsmic al nucleòtid 3243, al gen que codifica per al tRNA de la leucina (Goto *et al.*, 1990) (figura 6). Aquesta mutació inactivaria el factor de terminació de la transcripció que es fixa al tRNA^{Leu}. La mutació MELAS pot així tenir dues conseqüències: un defecte en la traducció pel fet d'haver modificat el tRNA i una modificació de la relació rRNA/mRNA. Aquesta mutació MELAS també es troba en aproximadament un 20 % de pacients amb PEO (Moraes *et al.*, 1993) i en una petita proporció de malalts amb diabetis *mellitus* (Kodowaki *et al.*, 1994; Reardon *et al.*, 1992; Van den Ouweland *et al.*, 1992).

La mutació MELAS A3243G es troba en una alta proporció en les RRF musculars (Moraes *et al.*, 1992; Petruzzella *et al.*, 1994). S'han descrit, molt menys freqüentment, altres mutacions al tRNA^{Leu} en pacients amb MELAS i amb altres fenotips. Aquestes mutacions es localitzen fora de la seqüència de terminació de la transcripció i no afecten la terminació de la transcripció *in vitro* (Shang *et al.*, 1994).

A.2.2.3. Mutacions en gens d'altres tRNA. S'han descrit diverses mutacions puntuals en altres gens que codifiquen per a tRNA. El problema que plantegen és que no sempre és evident si es tracta d'una mutació patogènica o no. S'han proposat els següents criteris per atribuir patogènica a una variació en la seqüència nucleotídica mitocondrial normal: a) la mutació afecta una base alta-

ment conservada; b) la mutació no s'ha trobat en controls; c) la mutació s'ha descrit en diverses famílies amb un fenotip similar; d) hi ha correlació entre els nivells de mtDNA mutat i la gravetat dels símptomes; e) la mutació es dóna sempre en heteroplàsmia, fet que suposa que la homoplàsmia és incompatible amb la vida; i f) hi ha correlació entre la quantitat de molècules mutades i el grau de disfunció de la cadena respiratòria. Malgrat aquests criteris, no existeix un consens de com establir si una mutació a un tRNA és patològica o no. La prova definitiva probablement no es podrà tenir fins que no es desenvolupi un sistema que permeti la introducció de mtDNA mutat en animals d'experimentació (Larsson *et al.*, 1995).

A.2.3. Mutacions a gens que codifiquen per rRNA. En una gran família amb sordesa congènita no sindròmica es va descriure una mutació homoplàsmica A→G al nucleòtid 1555 del gen que codifica per al rRNA 12S (Prezant *et al.*, 1993) (figura 6), mutació que posteriorment s'ha observat en altres famílies amb sordesa induïda per aminoglicòsids. Aquesta mutació es dóna en una regió altament conservada del gen per al rRNA 12S i ha resultat ser molt freqüent a la població espanyola. En un estudi realitzat a setanta famílies, aquesta mutació es va trobar en dinou grups familiars amb sordesa progressiva transmesa per via materna. Dotze d'aquestes famílies havien estat tractades amb aminoglicòsids (Estivill *et al.*, 1998). El clo-ramfenicol inhibeix selectivament la síntesi proteica i s'han trobat diverses mutacions al gen que codifica per al rRNA 16S del mtDNA, que confereixen resistència al clo-ramfenicol en cèl·lules de mamífers (Blanch *et al.*, 1981; Kearsey *et al.*, 1981)

B) Malalties degudes a defectes genètics nuclears

Des d'un punt de vista teòric, hauria de ser el grup més nombrós de malalties mito-

condrials, ja que la majoria de les proteïnes mitocondrials són codificades al nucli. És possible que la majoria d'aquestes mutacions siguin incompatibles amb la vida, fet que explicaria que fins a l'actualitat se n'hagin descrit molt poques i, en tot cas, no relacionades amb proteïnes de la cadena respiratòria mitocondrial (Brown *et al.*, 1989; Bourgeron *et al.*, 1994). Per aquest motiu no seran objecte d'atenció especial en aquesta revisió. El defecte, monoenzimàtic, pot ser teixit específic o generalitzat, i la forma de transmissió típicament mendeliana (Brown *et al.*, 1989).

C) Malalties degudes a problemes en la comunicació nucli-mitocondri

Per bé que separats, els genomes nuclear i mitocondrial treballen coordinadament, aparentment sota control nuclear (figura 4). Les mutacions que afectin aquest control, d'origen nuclear i per tant amb transmissió mendeliana, poden provocar trastorns en la replicació i transcripció del mtDNA, en el processament i traducció dels transcrits mitocondrials i en l'import proteic mitocondrial. Des del punt de vista de la genètica molecular s'han descrit dos grans tipus de defectes en el mtDNA deguts a una disfunció en la comunicació nucli-mitocondri:

C.1. Delecions múltiples en el mtDNA. El que s'hereta no són les mutacions pròpiament, sinó el defecte d'algun factor que tindria com a missió impedir que durant la replicació del DNAm se sintetitzessin genomes anòmals, amb delecions. Els pacients presenten múltiples delecions, que varien amb el temps i els teixits estudiats. La forma més freqüent, d'herència autosòmica dominant, ha estat descrita en diverses famílies amb PEO, ptosi, debilitat muscular i RRF (Cormier *et al.*, 1991; Shouldbridge *et al.*, 1990; Zeviani *et al.*, 1989). El gen nuclear responsable d'aquest fenotip s'ha localitzat al braç llarg del cromosoma 10 (10q 23.3-24.3) en una família fina (Suomalainen *et*

al., 1995). Posteriorment s'ha descrit lligament amb el cromosoma 3 en famílies italianes (Kakunen *et al.*, 1996). També s'han descrit altres fenotips amb un patró d'herència autosòmic dominant que cursen, fonamentalment, amb anèmia sideroblàstica i per tant estarien més pròxims a la síndrome de Pearson (Casademont *et al.*, 1994).

La presència de delecions múltiples també s'ha vist associada a un patró d'herència autosòmica recessiva, concretament en algunes famílies amb la síndrome de Wolfram. Aquesta és una malaltia neurodegenerativa de curs progressiu que es caracteritza per la presència de diabetis insípida, diabetis *mellitus*, atròfia òptica i sordesa (Wolfram *et al.*, 1938). En molts casos es troba associada a altres símptomes neurològics i psiquiàtrics com atàxia, neuropatia perifèrica, atonia del tracte urinari, depressió i demència (Cremers *et al.*, 1997; Borgna-Pignatti *et al.*, 1989; Swift *et al.*, 1990; Swift *et al.*, 1991). Mitjançant estudis de lligament es va localitzar el gen al braç curt del cromosoma 4 (Polymeropoulos *et al.*, 1994). L'any 1993 Rötig va suggerir que algunes formes de la síndrome podrien tenir origen mitocondrial i va descriure el cas d'un pacient que presentava la malaltia associada a una delecio en heteroplàsmia, en aquest cas única, de 7,6 kb (Rötig *et al.*, 1993). Casos semblants van ser descrits posteriorment per altres autors (Barrientos *et al.*, 1996b). El nostre grup va demostrar per estudis de lligament i prenent la presència de delecions múltiples com a marcador, que el gen nuclear localitzat a la regió 4p16 predisposa a l'aparició de delecions del mtDNA. El model d'herència seria semidominant; els heterozigots presentarien alteracions en el mtDNA mentre que els homozigots pel defecte nuclear mostrarien la síndrome completa. Aquesta va ser la primera prova directa de la implicació entre el genoma nuclear i el mitocondrial en el cas d'una malaltia autosòmica recessiva

(Barrientos *et al.*, 1996c). Els resultats obtinguts apunten la possibilitat que el gen a la regió 4p16 codifiqui un factor relacionat amb la biogènesi mitocondrial. Alguns gens implicats a la biogènesi ja s'han descartat com a candidats perquè no estan localitzats en el cromosoma 4 (Hsiesh *et al.*, 1990; Tiranti *et al.*, 1995). Podrien també considerar-se com a candidats gens codificants per a factors implicats en el recanvi del mtDNA o en la regulació del metabolisme oxidatiu (Barrientos *et al.*, 1996c).

C.2. Depleció del mtDNA. La depleció o disminució de la quantitat de molècules de mtDNA s'ha descrit en alguns nens amb miopatia i deficiència en citocrom *c* oxidasa de múscul, i en alguns nens amb hepatopatia i nefropatia (Moraes *et al.*, 1991). L'evidència per implicar un gen nuclear com a responsable de la depleció del mtDNA es basa en el fet que la seqüenciació de la regió reguladora del bucle D, així com de la petita regió no codificant que inclou el O₁, no ha demostrat cap mutació en individus afectes (Larsson *et al.*, 1992; Moraes *et al.*, 1991) i, a més, en el fet que la complementació de cultius de cèl·lules de pacients amb depleció amb gens nuclears recupera els nivells normals de mtDNA (Bodnar *et al.*, 1993). També s'ha descrit una depleció de mtDNA, en aquest cas adquirida, en la miopatia tòxica induïda per l'antiretroviral zidovudina (ZDV) en malalts amb sida (Arnaudo *et al.*, 1991; Casademont *et al.*, 1996). En alguns casos de depleció del mtDNA hi ha nivells disminuïts de mtTFA en les fibres musculars, però es desconeix si aquest fenomen és primari o secundari (Larsson *et al.*, 1994).

CONCLUSIONS I PERSPECTIVES FUTURES

El coneixement de la seqüència completa del mtDNA humà (Anderson *et al.*, 1981), i

també localitzar la gran quantitat de variacions en aquesta seqüència, han estat crucials per a la comprensió del paper patogènic que tenen les mutacions del mtDNA. De tota manera estem encara molt a l'inici del camí per comprendre'n bé tots els vessants, i hi ha moltes àrees de treball mal conegudes. La intervenció dels dos genomes, el nuclear i el mitocondrial, per formar els diferents complexos de la cadena respiratòria, com també la comunicació intergenòmica i les reaccions requerides per l'import de les proteïnes a l'interior del mitocondri, ofereixen tota una gamma de situacions susceptibles de ser degudes a defectes genòmics. En aquest sentit les síndromes amb herència autosòmica dominant o recessiva associades a delecions múltiples són un molt bon exemple de defectes en la intercomunicació nucli-mitocondri i són àrees molt actives d'investigació (Soumalainen *et al.*, 1995; Barrientos *et al.*, 1996c). El paper de les mutacions al mtDNA en moltes malalties neurodegeneratives com ara l'esclerosi múltiple, les malalties de Parkinson i Alzheimer, i la miopatia amb cossos d'inclusió, és actualment objectiu de diversos grups de recerca. Aquests treballs estan molt lligats, també, a la comprensió del paper que tenen les alteracions mitocondrials en processos tan diversos com l'envelliment, l'apoptosi i l'exposició a factors que provoquin un desequilibri en l'homeostasi de l'estrès oxidatiu.

Per altra banda, aquests treballs han permès anar desenvolupant proves per al diagnòstic de les malalties mitocondrials. L'establiment inequívoc del diagnòstic d'una malaltia mitocondrial és un prerrequisit per a un adequat consell genètic i un eventual tractament. Si bé hi ha moltes mutacions en el mtDNA que s'han associat a fenotips corresponents a malalties humanes, només en unes poques ocasions se n'ha pogut demostrar el paper causal, mentre que en moltes altres es desconeix si són causa o

efecte. És possible que el diagnòstic d'una malaltia mitocondrial requereixi sempre la concurrència de paràmetres de genètica molecular, però conjuntament amb estudis clínics, histològics i bioquímics.

Conèixer les bases moleculars d'aquests defectes ha de ser útil no només per entendre el paradigma general de les malalties mitocondrials, sinó també per poder desenvolupar estratègies de «rescat genètic» (resabliment del fenotip salvatge) que puguin ser útils per als pacients. Donada la dificultat inherent a l'estudi dels processos biològics en mostres de teixits humans i el nombre limitat de malalts per a cada una d'aquestes malalties, un punt bàsic per poder aprofundir en aquest camp serà disposar de models animals per estudiar les malalties mitocondrials. En aquest sentit, i donat el coneixement actual de l'estructura i funció del mtDNA de ratolí i del fet que algunes de les seves propietats són semblants en les dues espècies, és possible pensar en un futur model murí (Larsson *et al.*, 1995).

Per acabar, un camp en què s'està treballant molt activament és en l'intent d'establir protocols de terapèutica gènica per a malalties mitocondrials. El genoma mitocondrial i el seu sistema d'expressió autònom ofereixen la possibilitat d'una estratègia de terapèutica gènica alternativa a l'habitual: la introducció de seqüències de gens nuclears al genoma mitocondrial per a la seva expressió utilitzant el sistema d'expressió mitocondrial. Aquesta aproximació, a més del seu potencial en terapèutica gènica, pot ser de moment una eina de gran valor per comprendre l'expressió del genoma mitocondrial i la seva regulació (Collombe *et al.*, 1998).

AGRAÏMENTS

El nostre treball referenciat en aquesta revisió ha estat finançat per l'Institut Català

de la Salut i per ajuts del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS94/1563), per la Direcció General de Recerca (1997SGR00085) i de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, SAF95-191 i SAF96-0227).

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, S.; A. T. BANKIET; B. G. BARREL; M. H. L. DE BRUIJN; A. R. COULSON (1981). «Sequence and organization of the human mitochondrial genome». *Nature*, núm. 290, pàg. 457-65.
- ARNAUDO, E.; M. DALAKAS; S. SHANSKE; C. T. MORAES; S. DIMAURO; E. A. SCHON (1991). «Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy». *Lancet*, núm. 337, pàg. 508-10.
- ATTARDI, G.; A. CHOMIN; M. P. KING; B. KRUSE; P. L. POLOSA; N. N. MURDTER (1989). «Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells». *Biochem. Soc. Trans.*, núm. 18, pàg. 509-513.
- BALLINGER, S. W.; J. M. SHOFFNER; S. GEBHART; D. A. KOONTZ; D. C. WALLACE (1994). «Mitochondrial diabetes revisited». *Nat. Genet.*, núm. 7, pàg. 458-59.
- BALLINGER, S. W.; J. M. SHOFFNER; E. V. HEDAYA; I. TROUNCE; M. A. POLAK; D. C. WALLACE (1992). «Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion». *Nat. Genet.*, núm. 1, pàg. 11-15.
- BARRELL, G.; A. T. BANKIER; J. DROUIN (1979). «Different genetic code in human mitochondria». *Nature*, núm. 282, pàg. 189-194.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; A. SOLANS; P. MORAL; F. CARDELLACH; A. URBANO-MÁRQUEZ; X. ESTIVILL; V. NUNES (1995). «The 9bp deletion in the region V of mitochondrial DNA: evidence for mutation recurrence». *Human Genet.*, núm. 96, pàg. 225-228.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; J. M. GRAU; J. MONTOYA; F. CARDELLACH; X. ESTIVILL; A. URBANO-MÁRQUEZ; V. NUNES (1995a). «Síndrome de Kearns-Sayre: Caracterización molecular de 6 casos». *Med Clin (Barcelona)*, núm. 105, pàg. 180-184.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; D. GENIS; F. CARDELLACH; J. M. FERNÁNDEZ-REAL; J. M. GRAU; A. URBANO-MÁRQUEZ; X. ESTIVILL; V. NUNES (1997). «Sporadic heteroplasmic single 5.5 kb mitochondrial DNA deletion associated with cerebellar ataxia, hypogonadotropic hypogonadism, choroidal dystrophy, and mitochondrial respiratory chain complex I deficiency». *Hum. Mutat*, núm. 10, pàg. 212-216.
- BARRIENTOS, A.; V. VOLPINI; J. CASADEMONT.; D. GENIS; J. M. MANZANARES; I. FERRER; J. CORRAL; F. CARDELLACH;

- A. URBANO-MÁRQUEZ; X. ESTIVILL; V. NUNES (1996c). «A nuclear defect in the 4p16 region predisposes to multiple mitochondrial DNA deletions in families with Wolfram Syndrome». *J. Clin. Invest.*, núm 997, pàg. 1570-1576.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; A. SAIZ; F. CARDELLACH; V. VOLPINI; E. TOLOSA; A. URBANO-MÁRQUEZ; X. ESTIVILL; V. NUNES (1996b). «Autosomal recessive Wolfram syndrome associated with an 8.5-kb mtDNA single deletion». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 58, pàg. 963-970.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; V. NUNES (1996a). «Reordenamientos del ADN mitocondrial en el síndrome de Kearns-Sayre: ¿es necesario diferenciar las deleciones de las duplicaciones o multimerizaciones?». *Neurología.*, núm. 11, pàg. 257-260.
- BARRIENTOS, A.; J. CASADEMONT; D. GENIS; F. CARDELLACH; J. M. FERNÁNDEZ-REAL; J. M. GRAU; A. URBANO-MÁRQUEZ; X. ESTIVILL; V. NUNES (1997). «Sporadic heteroplasmic single 5.5 kb mitochondrial DNA deletion associated with cerebellar ataxia, hypogonadotropic hypogonadism, choroidal dystrophy, and mitochondrial respiratory chain complex I deficiency». *Hum. Mutat.*, núm. 10, pàg. 212-216.
- BLANC, H.; C. T. WRIGHL; M. J. BIBB; D. C. WALLACE; D. A. CLAYTON (1981). «Mitochondrial DNA of chloramphenicol resistant mouse cells contains a single nucleotide change in the region encoding the 3' end of The large ribosomal RNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 78, pàg. 3789-93.
- BROWN, R. M.; H. DAHL; G. K. BROWN (1989). «X-chromosome localization of the functional gene for the E1 subunit of the human pyruvate dehydrogenase complex». *Genomics*, núm. 4, pàg. 174-181.
- BOURGERON, T.; D. CHRETIEN; J. POGGI BACH; S. DOONAN; D. RABIER; P. LETOUZÉ; A. MUNNICH; A. RÖTIG; P. LANDRIEU; P. RUSTIN (1994). «Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency». *J. Clin. Invest.*, núm. 93, pàg. 2514-8.
- BODNAR, A. G.; I. M. COOPER; I. J. HOL; J. V. LEONARD; A. H. V. SCHAPIRA (1993). «Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 53, pàg. 663-69.
- BORIGNA-PIGNATTI, C.; P. MARRADI; L. PINELLI; N. MONETTI; C. PATRINI (1989). «Thiamine-responsive anaemia in DIDMOAD syndrome». *J. Pediatr.*, núm. 114, pàg. 405-410.
- BOULET, L.; G. KARPATI; E. A. SHOULBRIDGE (1992). «Distribution and threshold expression of the tRNA^{Lys} mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF)». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 51, pàg. 1187-200.
- BOURGERON, T.; P. RUSTIN; D. CHRETIEN; M. BIRCH-MACHINE; M. BOURGEOIS; EVIEGAS PEQUIGNOT; A. MUNNICH; A. RÖTIG (1995). «Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency». *Nature*, núm 11, pàg. 144-149.
- CASADEMONT J.; A. BARRIENTOS; F. CARDELLACH; A. RÖTIG; J. M. GRAU; J. MONTOYA; B. BELTRÁN; F. CERVANTES; C. ROZMAN; X. ESTIVILL; A. URBANO-MÁRQUEZ; V. NUNES (1994). «Multiple deletions of mtDNA in two brothers with sideroblastic anemia and mitochondrial myopathy, and in their asymptomatic mother». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 3, pàg. 1945-1949.
- CASADEMONT, J.; A. BARRIENTOS; J. M. GRAU; E. PEDROL; X. ESTIVILL; A. URBANO-MÁRQUEZ; V. NUNES (1996). «The effect of Zidovudine on skeletal muscle mtDNA in HIV-1 infected patients with mild or no muscle dysfunction». *Brain*, núm. 119, pàg. 1357-1364.
- CHANG, D. D.; D. A. CLAYTON (1987). «A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA». *Science*, núm. 235, pàg. 1178-84.
- CLAYTON, D. A.; C. A. SMITH (1975). «Complex mitochondrial DNA». *Int. Rev. Exp. Pathol.*, núm 14, pàg. 1-67.
- CLAYTON, D. A.; J. VINOGRAD (1967). «Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes». *Nature*, núm. 216, pàg. 652-57.
- CLAYTON, D. A. (1982). «Replication of animal mitochondrial DNA». *Cell*, núm. 28, pàg. 693-705.
- CLAYTON, D. A. (1984). «Transcription of the mammalian mitochondrial genome». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 53, pàg. 573-94.
- COLLOBET, J. M.; CH. COUTELLE (1998). «Towards gene therapy of mitochondrial disorders». *Mol. Med today*, january, pàg. 3331-38.
- CORMIER, V.; A. RÖTIG; M. TARDIEU; M. COLONNA; J. M. SAUDUBRAY; A. MUNNICH (1991). «Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 48, pàg. 643-48.
- CORMIER DAIRE, V.; J. P. BONNEFONT; P. RUSTIN; C. MAURAGE; H. OGLER; J. SCHMITZ; C. RICOUR; J. M. SAUDUBRAY; A. MUNNICH; A. RÖTIG (1994). «Mitochondrial DNA rearrangements with onset as chronic diarrhea with villous atrophy». *J. Pediatr.*, núm. 124, pàg. 63-70.
- CREMERS, C. W.; P. G. WIJDEVELD; A. J. PINCKERS (1997). «Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome): a review of 88 cases from the literature with personal observations on three new patients». *Acta Paediatr. Scand.*, núm. 2664, pàg. 1-16.
- DAGA, A.; V. MICOL; D. HESS; R. AEBERSOLD; G. ATTARDI

- (1993). «Molecular characterization of the Transcription Termination Factor from Human Mitochondria». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 8123-8130.
- DUNBAR, D. R.; P. A. MOONIE; R. J. SWINGLER; D. DAVIDSON; R. ROBERTS; I. J. HOLT (1993). «Maternally transmitted partial direct tandem duplication of mitochondrial DNA associated with diabetes mellitus». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 2, pàg. 1619-24.
- ENRIQUEZ, J. A.; A. CHOMYN; G. ATTARDI (1995). «MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA^{lys} and premature translation termination». *Nat. J. Genet.*, núm. 10, pàg. 47-55.
- ESTIVILL, X.; N. GOVEA; A. BARCELÓ; E. PERELLÓ; C. BADENAS; E. ROMERO; L. MORAL; R. SCOZZARI; L. D'URBANO; M. ZEVIANI; A. TORRONI (1998). «Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides». *Am. J. Human Genet.*, núm. 1, pàg. 27-35.
- FISHER, R. P.; T. LISOWSKY; M. A. PARISI; D. A. CLAYTON (1992). «DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, pàg. 3358-67.
- FUKUHARA, N.; S. TOKIGUCHI; K. SHIRAKAWA; T. TSUBAKI (1980). «Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome?». *J. Neurol. Sci.*, núm. 47, pàg. 117-33.
- GOTO, Y.-I.; I. NONAKA; S. HORAI (1990). «A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondria's encephalomyopathies». *Nature*, núm. 348, pàg. 651-53.
- HARDING, A. E.; M. G. SWEENEY; D. H. MILLER.; C. L. MUMFORD; H. KELLAR-WOOD; D. MENARD; W. I. MCDONALD; D. A. S. COMPSTON (1992). «Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation». *Brain*, núm. 115, pàg. 979-89.
- HAUSWIRTH, W. W.; D. A. CLAYTON (1985). «Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA». *Nucleic Acids Res.*, núm. 13, pàg. 8093-104.
- HIRANO, M.; G. SILVESTRI; D. M. BLAKE; A. LOMBES; C. MINETTI; E. BONILLA; A. P. HAYS; R. E. LOVELACE; I. BUTLER; T. E. BERTORINI (1994). «Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder». *Neurology*, núm. 44, pàg. 721-27.
- HOLT, I. J.; A. E. HARDING; J. A. MORGAN-HUGHES (1988). «Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies». *Nature*, núm. 331, pàg. 717-19.
- HOLT, I. J.; A. E. HARDING; J. A. MORGAN-HUGHES (1989). «Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies: sequence analysis and possible mechanisms». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 4465-69.
- HOLT, I. J.; A. E. HARDING; R. K. H. PETTY; J. A. MORGAN-HUGHES (1990). «A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 46, pàg. 428-433.
- HOWELL, N. (1994). «Primary LHON mutations: trying to separate "fruity" from "chaf"». *Clin. Neurosci.*, núm. 2, pàg. 130-37.
- HSIEH, C. L.; T. A. DONLON; B. T. DARRAS; D. D. CHANG; J. N. TOPPER; D. A. CLAYTON (1990). «The gene for the RNA component of the mitochondrial RNA-processing RNA endoribonuclease is located on human chromosome 9p and on mouse chromosome 4». *Genomics*, núm. 6, pàg. 540-544.
- KADOWAKI, T.; H. KADOWAKI, Y. MORI; K. TOBE; R. SAKUTA; Y. SUZUKI; Y. TANABE; H. SAKURA; T. AWATA; Y. GOTO; T. HAYAKAWA; K. MATSUOKA; R. KAWAMORI; T. KAMADDDA; S. HORAI; I. NONAKA; R. HAGURA; Y. AKANUMA; Y. YAYAZAKI (1994). «A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA». *New Engl. J. Med.*, núm. 330, pàg. 962-68.
- KAUKONEN, J. A.; P. AMATI; A. SOUMULAINEN; A. RÖTIG; M. PISCAGLIA; F. SALVI; J. WEISSENBACH; G. FRATTA; G. COMMI, L. PELTONEN; M. ZEVIANI (1996). «An autosomal locus predisposing to multiple deletions of mtDNA on chromosome 3p». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 58, pàg. 7763-769.
- KEARSEY, S. E.; I. W. CRAIG (1981). «Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance». *Nature*, núm. 290, pàg. 607-81.
- KRUSE, B.; N. NARASIMHAN; G. ATTARDI (1989). «Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination». *Cell*, núm. 58, pàg. 391-397.
- LANG, B. F.; G. BURGER; C. J. O'KELLY; R. CEDERGREN; G. B. GOLDING; C. LEMIEUX; D. SANKOFF; M. TURMEL; M. W. GRAY (1997). «An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature». *Nature*, núm. 387, pàg. 493-497.
- LARSSON, N.-G.; H. G. EIKEN; H. BOMAN; E. HOLME; A. OLDFORS; M. H. TULINIUS (1992). «Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome to her child». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 50, pàg. 360-363.
- LARSSON, N.-G.; E. HOLME; B. KRISTIANSSON; A. OLDFORS; M. TULINIUS (1990). «Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome». *Pediatr. Res.*, núm. 28, pàg. 131-36.
- LARSSON, N.-G.; A. OLDFORS; E. HOLME; D. A. CLAYTON (1994). «Low levels of mitochondrial transcription

- factor A in mitochondrial DNA depletion». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 200, pàg. 1374-81.
- LARSSON, N.-G.; M. H. TULINIUS; E. HOLME; A. OLDFORS; O. ANDERSEN; J. WAHLSTROM; J. AASLY (1992). «Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA^{Lys} A->G⁽⁸³⁴⁴⁾ mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 51, pàg. 1201-12.
- LARSSON, N.-G.; D. A. CLAYTON (1995). «Molecular genetics aspects of human mitochondrial disorders». *Annu. Rev. Genetics*, núm 29, pàg. 151-178.
- LESTIENNE, P.; G. PONSOT (1988). «Kearns Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion». *Lancet*, núm.1, pàg. 885.
- LINNANE A. W.; S. MARZUKI; T. OZAWA; M. TANAKA (1989). «Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases». *Lancet*, núm. 1, pàg. 642-45.
- MCKUSICK, V. A. (1992). *Mendelian Inheritance in Man*. 10th ed., Johns Hopkins University Press.
- MASUCCI, I. P.; M. DAVIDSON; Y. KOGA; S. DIMAURO; E. A. SCHON; M. P. KING (1995). «In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene: two genotypes produce similar phenotype». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 15, pàg. 2872- 81.
- MATTHEWS, D. E.; R. A. HESSLER; N. D. DENSLow; J. S. EDWARDS; T. W. OBRIEN (1982). «Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome». *J. Biol. Chem.*, núm. 257, pàg. 8788-94.
- MITA, S.; R. RIZZUTO; C. T. MORAES; S. SHANSKE; E. ARNAUDO; G. FABRIZI; Y. KOGA; S. DIMAURO (1990). «Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA». *Nucleic. Acids. Res.*, núm. 18, pàg. 561-67.
- MONTOYA, J.; G. L. GAINES; G. ATTARDI (1983). «The pattern of transcription of human mitochondrial rRNA genes reveal two overlapping transcription units». *Cell.*, núm. 34, pàg. 151-159.
- MORAES, C. T.; F. CIACCI; G. SILVESTRI; S. SHANSKE; M. SCIACCO; M. HIRANO; E. A. SCHON; E. BONILLA; S. DIMAURO (1993). «Atypical clinical presentation associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA». *Neuromusc. Disord.*, núm. 3, pàg. 43-50.
- MORAES, C. T.; S. DIMAURO; M. ZEVIANI; A. LOMBES; S. SHANSKE; A. F. MIRANDA; H. NAKAASE; E. BONILLA; L. C. WERNECK; S. SERVIDEI; I. NONAKA; Y. KOGAA; A. J. SPIRO; A. K. W. BROWNELL; B. SCHIMDT; D. L. SCHOOTLAND; M. ZUPANC; D. C. DEVIVO; E. A. SCHON; L. P. ROWLAND (1989). «Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome». *New Engl. J. Med.*, núm. 320, pàg. 1293-99.
- MORAES, C. T.; E. RICCI; E. BONILLA; S. DIMAURO; E. A. SCHON (1992). «The mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 50, pàg. 934-49.
- MORAES, C. T.; E. RICCI; V. PETRUZZELLA; S. SHANSKE; S. DIMAURO; E. A. SCHON; E. BONILLA (1992). «Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions». *Nat. Genet.*, núm. 1, pàg. 359-67.
- MORAES, C. T.; S. SHANSKE; H.-L. TRITSEHLER; J. R. APRILLE; F. ANDREITTA; E. BONILLA; E. A. SCHON; S. DIMAURO (1991). «mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 48, pàg. 492-501.
- PETRUZZELLA, V.; C. T. MORAES; M. C. SANO; E. BONILLA; S. DIMAURO; E. A. SCHON (1994). «Extremely high levels of mutant mtDNA co-localize with cytochrome c oxidase-negative ragged-red fibers in patients harboring a point mutation at nt 3243». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 3, pàg. 449-54.
- PFANNER N.; E. A. CRAIG; M. MEIJER (1994). «The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 19, pàg. 368-372.
- POLYMERPOULOS, M. H.; R. G. SWIFT; M. SWIFT (1994). «Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on the short arm of chromosome 4». *Nature Genet.*, núm. 8, pàg. 95-97.
- POULTON, J.; M. E. DEADMAN; L. BINDOFF; K. MONEN; J. LAND; G. BROWN (1993). «Families of mtDNA rearrangements can be detected in patients with mtDNA deletions: duplications may be a transient intermediate form». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 2, pàg. 23-30.
- POULTON, J.; M. E. DEADMAN; R. M. GARDINER (1989). «Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy». *Lancet*, núm.1, pàg. 236-40.
- PREZANT, T. R.; J. V. AGAPIAN; M. C. BOHLMAN; X. BU; S. OZTAS; W. QIU; K. S. ARNOS; G. A. CORTOPASSI; L. JABER; J. I. ROTTER; M. SHOHAT; N. FISCHEL-GHODSIAN (1993). «Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness». *Nat. Genet.*, núm. 4, pàg. 289-294.
- REARDON, W.; R. R. I. M. OSS; M. G. SWEENEY; L. M. LUXON; M. PEMBREY; A. E. HARDING; R. C. TREMBATH (1992). «Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA». *Lancet*, núm. 340, pàg. 1376-79.
- RICHTER, C.; J. W. PARK; B. N. AMES (1988). «Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 85, pàg. 6465-6467.
- RÖTIG, A.; M. COLONA; J. P. BONNEFONT; S. FISCHER; A. SAUDUBRAY; A. MUNNICH (1989). «Mitochondrial DNA deletions in Perason's marrow/pan-

- creas syndrome». *Lancet*, núm. 1, pàg. 902-903.
- RÖTIG, A.; L.-L. BESSIS; N. ROMERO; V. CORMIER; J.-M. SAUDUBRAY; P. NARCY; P. LENOIR; P. RUSTIN; A. MUNNICH (1992). «Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus, and cerebellar ataxia». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 50, pàg. 364-70.
- RÖTIG, A.; V. CORMIER; S. BLANCHE; J.-P. BONNEFONT; F. LEDEIST; N. ROMERO; J. SCHMITZ; P. RUSTIN; A. FISHER; J. M. SAUDUBRAY; A. MUNNICH (1990). «Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy». *J. Clin. Invest.*, núm. 86, pàg. 1601-1608.
- RÖTIG, A.; V. CORMIER; P. CHATELAIN; R. FRANCOIS; J. SAUDUBRAY; P. RUSTIN; A. MUNNICH (1993). «Deletion of mitochondrial DNA in a case of early-onset diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (Wolfram syndrome. MIM 222300)». *J. Clin. Invest.*, núm. 91, pàg. 1095-1098.
- SCHON, E.; R. RIZZUTO; C. T. MORAES; H. NAKASE; M. ZEVIANI; S. DIMAURO (1989). «A direct repeat is a hot spot for large scale deletion of human mitochondrial DNA». *Science*, núm. 244, pàg. 346-349.
- SHADEL, G. S.; D. A. CLAYTON (1993). «Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 16083-16086.
- SHANG, J.; D. A. CLAYTON (1994). «Human mitochondrial transcription termination exhibits RNA polymerase independence and biased bipolarity in vitro». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 29112-29120.
- SHOFFNER, J. M.; M. T. LOTT; A. OLJAVEC; S. A. SOUEIDAN; D. A. COSTIGAN; D. C. WALLACE (1989). «Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 7952-7956.
- SHOFFNER, J. M.; R. L. WATTS; J. L. JUNCOS; A. TORRONI; D. C. WALLACE (1991). «Mitochondrial oxidative phosphorylation defects 142 in Parkinson's disease». *Ann. Neurol.*, núm. 30, pàg. 332-339.
- SHOULBRIDGE, E. A.; G. KARPATI; K. E. M. HASTINGS (1990). «Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease». *Cell*, núm. 62, pàg. 43-49.
- SUOMALAINEN, A.; J. KAUKONEN; P. AMATI; R. TIMONEN; M. HALTIA; M. WEISSENBACH; M. ZEVIANI; H. SOMER; L. PELTONEN (1995). «An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA». *Nat. Genet.*, núm. 9, pàg. 146-51.
- SWIFT, R. G.; D. B. SADLER; M. SWIFT (1990). «Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes». *Lancet*, núm. 336, pàg. 667-669.
- SWIFT, R. G.; D. O. PERKINS; C. L. CHASE; D. B. SADLER; M. SWIFT (1991). «Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome». *Am. J. Psychiatry*, núm. 148, pàg. 775-779.
- TATUCH, Y.; J. CHRISTODOULOU; A. FEIGENBAUM; J. T. CLARKE; J. WHERRETT; C. SMITH; N. RUDD; R. PETROVA-BENEDICT; B. H. ROBINSON (1992). «Heteroplasmic mtDNA mutation (T→G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 50, pàg. 852-858.
- TIRANTI, V.; E. ROSSI; A. RUIZ-CARRILLO; G. ROSSI; M. ROCCHI; S. DIDONATO; O. ZUFFARDI; M. ZEVIANI (1995). «Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis». *Genomics*, núm. 25, pàg. 559-564.
- TULINIUS, M. H.; M. HOUSHMAND; N. G. LARSSON; E. HOLME; A. OLDFORS; E. HOLMBERG; J. WAHLSTRÖM (1995). «De novo mutation in the mitochondrial ATP synthase subunit 6 gene (T8993G) with rapid segregation resulting in Leigh syndrome in the offspring». *Hum. Genet.*, núm. 96, pàg. 290-294.
- VAN DEN OUWELAND, J. M. W.; H. H. P. J. LEMKES; W. RUITENBEEK; L. A. SANDKUIJL; M. F. P. DE VIJLDER; A. A. STUYVENBERG; J. J. P. VAN DEN KAMP; J. A. MAASSEN (1992). «Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness». *Nat. Genet.*, núm. 1, pàg. 368-71.
- VILKKI, J.; M. L. SAVCONTAUS; E. K. NIKOSKELAINEN (1990). «Segregation of mitochondrial genomes in a heteroplasmic lineage with Leber hereditary optic neuropathy». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 47, pàg. 95-100.
- WALLACE, D. C. (1986). «Mitotic segregation of mitochondrial DNA in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance». *Somatic Cell. Mol. Genet.*, núm. 12, pàg. 41-49.
- WALLACE, D. C.; G. SINGH; M. T. LOTT; J. A. HODGE; T. G. SCHURR; A. M. LEZZA; L. J. ELSAS; E. K. NIKOSKELAINEN (1988a). «Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy». *Science*, núm. 242, pàg. 1427-30.
- WALLACE, D. C.; X. ZHENG; M. T. LOTT; J. M. SHOFFNER; J. A. HODGE; R. I. KELLEY; C. M. EPSTEIN; L. C. HOPKINS (1988). «Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease». *Cell*, núm. 55, pàg. 601-610.
- WALLACE, D. C. (1992). «Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative disease?». *Science*, núm. 256, pàg. 628-632.
- WOLFRAM, D. J.; H. P. WAGENER (1938). «Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases». *Mayo Clin. Proc.*, núm. 13, pàg. 715-718.

WRISCHNIK, L. A.; R. G. HIGUCHI; M. STONEKING; H. A. ERLICH; N. ARNHEIM; A. C. WILSON (1987). «Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA». *Nuc. Ac. Res.*, núm. 2, pàg. 529-542.

ZEVIANI, M.; S. SERVIDEI; C. GELLERA; E. BERTIN; S. DIMAURO; S. DIDONATO (1989). «An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region». *Nature*, núm. 339, pàg. 309-11.